

**ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE LOS GENES DC-SIGN, TNF- α Y
FC γ RIIA Y LA SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR DENGUE**

SHIRLY JULIETH PARRA ALVAREZ

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ, COLOMBIA
2017**

**ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DE LOS GENES DC-SIGN, TNF- α Y
FC γ RIIA Y LA SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR DENGUE**

SHIRLY JULIETH PARRA ALVAREZ

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

MSC. CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR (A):

CAROLINA CORONEL RUIZ, M.Sc.

CODIRECTOR (A):

FELIX GIOVANNI DELGADO TIRIA M.Sc.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

VIROLOGÍA

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

FACULTAD DE CIENCIAS

BOGOTÁ, COLOMBIA

2017

NOTA DE SALVEDAD

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y justicia”

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco al grupo de Virología de la Universidad el Bosque, especialmente a su director Dr. Jaime Eduardo Castellanos Parra por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y permitir realizar dentro del grupo mi tesis de grado. Agradezco a mi directora de tesis Carolina Coronel Ruiz por su orientación, comprensión y constante colaboración para lograr los objetivos propuestos, a mi codirector Giovanni Delgado Tiria y a la Dra. Myriam Lucia Velandia Romero por la ayuda y colaboración brindada, adicionalmente, agradezco a cada uno de los integrantes del grupo de virología por su compañía en este proceso.

Agradezco a mis padres Gabriel Parra y Silenia Alvarez, a mis hermanas Neyireth Parra y Angie Parra, a mis amigos y compañeros por el apoyo, fortaleza y ánimo incondicional, que fue de vital importancia para la culminación de la tesis.

RESUMEN

El dengue es una arbovirosis ampliamente distribuida en países tropicales y subtropicales, la cual es transmitida por artrópodos del género *Aedes*. La infección puede cursar de forma asintomática o presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas que pueden tener un desenlace fatal. Las características genéticas del hospedero pueden influenciar su respuesta inmunológica y por tanto la susceptibilidad a la infección y la severidad de la enfermedad. El presente estudio estableció la relación de los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en los genes DC-SIGN (rs4804803), FcγRIIa (rs1801274) y TNF-α (rs1800629) con la infección por dengue en niños entre 4 y 14 años residentes en una zona endémica de Colombia.

Se analizaron 230 muestras de los municipios de Anapoima, Apulo y Girardot del departamento de Cundinamarca, las cuales se caracterizaron por serología y detección de ARN viral. Lo anterior permitió la selección de tres grupos de estudio: el grupo control (n=37), el grupo de infecciones asintomáticas (n=138) y el grupo de infecciones sintomáticas (n=55) conformado por pacientes con DCSA (n=48) y DG (n=7)

Los tres SNPs cumplieron el equilibrio de Hardy-Weinberg, la presencia del SNP para DC-SIGN, no presentó asociación con la susceptibilidad a la infección o la enfermedad. El SNP del gen FcγRIIa, se identificó como factor protector en el grupo de infecciones asintomáticas respecto al grupo control (OR=0.51, $p=0.010$), y como factor de riesgo al comparar el grupo de infección sintomática respecto a las asintomáticas (OR=1.73, $p=0.018$). La presencia del SNP del TNF-α (rs1800629), se relacionó como factor de riesgo al comparar tanto las infecciones asintomáticas como sintomáticas con el grupo control OR=4.60 ($p<0.0001$) y OR=2.95 ($p=0.003$), respectivamente.

Se identificaron 17 combinaciones genotípicas, en el grupo control se encontró con mayor frecuencia la presencia de un SNP, a diferencia de los grupos de infección en los que se observaron dos o los tres SNPs. La combinación de los SNPs DC-SIGN y FcγRIIa se asoció con protección a la infección por DENV (OR=0.21, $p=0.028$). Por el contrario, la presencia conjunta de los polimorfismos en DC-SIGN y TNF-α se asoció como factor de riesgo para desarrollar síntomas durante la infección por DENV (OR=12.92, $p=0.0005$). Estos

resultados muestran la asociación entre la presencia de los polimorfismos en los tres genes evaluados y la susceptibilidad a la infección.

ABSTRACT

Dengue is an arthropod-borne viral disease widely distributed in tropical and subtropical countries, which is transmitted by *Aedes* genus mosquitoes. Dengue infection has a broad spectrum of clinical manifestations that could have a fatal outcome.

Host genetic background can influence the immune response, and therefore the susceptibility to the infection or disease severity. The aim of this study was to determine the association of functional single nucleotide polymorphisms in DC-SIGN (rs4804803), FcγRIIa (rs1801274) and TNF-α (rs1800629) genes with dengue infection in children (4 to 14 years old) who live in endemic municipalities in Cundinamarca, Colombia.

Two hundred and thirty samples (n=230) were analyzed from three Cundinamarca municipalities: Anapoima, Apulo and Girardot. Samples were characterized by serology and viral RNA detection tests. These results allowed the selection of three study groups: control group (n=37), asymptomatic infection (n=138), and symptomatic infection, presenting both severe dengue (n=7) and dengue with warning signs (n=48).

Each SNP met Hardy-Weinberg equilibrium. There was not association between the polymorphism in DC-SIGN gene (rs4804803) and dengue infection susceptibility and severity of disease. The SNP in FcγRIIa (rs1801274) gene was identified more frequently in the control group regarding asymptomatic infection group (protective to infection, OR=0.51, $p=0.01$), and it was identified as a risk factor to have symptoms during infection (asymptomatic vs. symptomatic infection, OR=1.73, $p=0.018$). Polymorphism in TNF-α gene (rs1800629) was related as a risk factor to DENV infection (asymptomatic infections vs control group (OR = 4.6, $p = <0.0001$) and also was a risk factor to present symptoms (OR = 2.95 $p = 0.003$).

This study identified 17 genotypic combinations, but most of individuals of the control group had only one SNP (56,8%), while symptomatic (32,6%) and asymptomatic infections (36,4%) groups had two or all three SNPs. DC-SIGN plus FcγRIIa genotypic combination was associated as protective factor to dengue infection (OR=0.21, $p=0.028$). In contrast, the DC-SIGN plus TNF-α SNPs combination was associated with a thirteen more likelihood to develop symptoms during dengue infection (OR=12.92, $p=0.0005$).

These results proved the association between SNPs in the three immune genes analyzed and susceptibility to dengue infection in Colombian children population.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO	16
1.1. Virus	16
1.2. Epidemiología	17
1.3. Patogénesis	19
1.4. Polimorfismos	20
1.4.1. El receptor DC-SIGN	20
1.4.2. El receptor Fc gamma	21
1.4.3. Factor de necrosis tumoral alfa	23
2. PREGUNTA PROBLEMA	26
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo principal	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. HIPÓTESIS	27
4.1. Hipótesis alterna	27
4.2. Hipótesis nula	27
5. METODOLOGÍA	27
5.1. Tipo de estudio	27
5.2. Población y muestra	27
5.3. Selección de voluntarios e ingreso al estudio	27
5.4. Captación de individuos	28
5.4.1. Espectro clínico de la infección por virus dengue en una cohorte de niños de 5 a 14 años de dos municipios de Cundinamarca (Estudio A)	28
5.4.2. Algoritmo de laboratorio para la confirmación de casos de dengue en muestras de individuos con síndrome febril atendidos en instituciones de salud de Cundinamarca (Estudio B)	29
5.5. Criterios de inclusión de la población de estudio	30
5.6. Criterios de exclusión	31
5.7. Procesamiento de las muestras	31
5.7.1. Pruebas de diagnóstico rápido de dengue (PDR)	31
5.7.2. Pruebas de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	31

5.7.3.	Pruebas virológicas	33
5.7.4.	Caracterización polimórfica.....	34
5.7.5.	Almacenamiento y análisis de datos	35
5.8.	Consideraciones éticas.....	35
6.	RESULTADOS.....	37
6.1.	Características sociodemográficas de la muestra poblacional	37
6.2.	Resultados de las pruebas serológicas.....	38
6.3.	Detección de NS1 y serotipos de DENV	39
6.4.	Calculo del equilibrio de Hardy Weinberg	41
6.5.	Frecuencias genotípicas de los SNPs en los grupos de interés	41
6.5.1.	Frecuencia genotípica del SNP DC-SIGN (rs4804803).....	41
6.5.2.	Frecuencia genotípica del SNP FcγRIIa (rs1801274)	42
6.5.3.	Frecuencia genotípica del SNP TNF-α (rs1800629).....	43
6.6.	Frecuencias alélicas de los SNPs	43
6.6.1.	Frecuencia alélica de SNP DC-SIGN (rs4804803).....	43
6.6.2.	Frecuencia alélica de SNP FcγRIIa (rs1801274).....	44
6.6.3.	Frecuencia alélica de SNP TNF-α (rs1800629).....	44
6.7.	SNPs en las infecciones sintomáticas.....	45
6.7.1.	SNP en el receptor DC-SIGN (rs4804803) en infecciones sintomáticas	45
6.7.2.	SNP del receptor FcγRIIa (rs1801274) en infecciones sintomáticas	46
6.7.3.	SNP TNF-α (rs1800629) en infecciones sintomáticas.....	46
6.8.	Combinaciones genotípicas presentes en los grupos de estudio	47
7.	DISCUSIÓN	50
8.	CONCLUSIONES	59
9.	RECOMENDACIONES	60
	BIBLIOGRAFÍA.....	61
	ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de clasificación de infecciones en individuos asintomáticos	30
Tabla 2. Primers utilizados en RT-PCR anidada para serotipificación de DENV	33
Tabla 3. Caracterización de los SNPs.....	35
Tabla 4. Características sociodemográficas de los grupos de estudio	37
Tabla 5. Pruebas de diagnóstico rápido en infección sintomática	38
Tabla 6. Presencia de IgM e IgG en los grupos de estudio	38
Tabla 7. Infecciones primarias y secundarias en los grupos de estudio	39
Tabla 8. Detección de la proteína viral NS1 y del ARN de DENV.....	40
Tabla 9. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	41
Tabla 10. Distribución genotípica del SNP DC-SIGN (rs4804803)	42
Tabla 11. Distribución genotípica del SNP FcγRIIa (rs1801274).....	42
Tabla 12. Distribución genotípica del SNP TNF-α (rs1800629).....	43
Tabla 13. Distribución alélica del SNP DC-SIGN (rs4804803)	44
Tabla 14. Distribución alélica del SNP FcγRIIa (rs1801274)	44
Tabla 15. Distribución alélica del SNP TNF-α (rs1800629)	45
Tabla 16. Distribución genotípica del SNP DC-SIGN (rs4804803)	45
Tabla 17. Distribución alélica del SNP DC-SIGN (rs4804803)	46
Tabla 18. Distribución genotípica del SNP FcγRIIa (rs1801274).....	46
Tabla 19. Distribución alélica del SNP FcγRIIa (rs1801274)	46
Tabla 20. Distribución genotípica del SNP TNF-α (rs1800629).....	47
Tabla 21. Distribución alélica del SNP TNF-α (rs1800629)	47
Tabla 22. Combinaciones genotípicas en los grupos de interés.....	48
Tabla 23. Comparación de las combinaciones genotípicas.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Serotipos de DENV en las infecciones asintomáticas y sintomáticas	40
Figura 2. Número de SNPs en las combinaciones genotípicas	48
Figura 3. Gel de identificación de los SNPs	80

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ADE	Amplificación Dependiente de Anticuerpos
CD	Células Dendríticas
CMH II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
DCSA	Dengue con signos de alarma
DC-SIGN	Proteína de membrana tipo-II con un dominio extracelular de lectina tipo C (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin)
DENV	Virus Dengue
DENV-1	Virus Dengue serotipo 1
DENV-2	Virus Dengue serotipo 2
DENV-3	Virus Dengue serotipo 3
DENV-4	Virus Dengue serotipo 4
DG	Dengue grave
DSSA	Dengue sin signos de alarma
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
TGF	Factor de Crecimiento Transformante (Transforming Growth Factor)
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
FD	Fiebre de dengue
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue
IFN γ	Interferón gamma
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
IL12p40	Subunidad p40 de la interleucina 12
INS	Instituto Nacional de Salud
IP-10	Proteína 10 inducible por IFN γ
ITAM	Región basada en tirosina

FcγR	Receptores para la fracción Fc gamma de las inmunoglobulinas G
FcγRII	Isoforma CD32 del Receptor Fc gamma
LT	Linfocitos T
NK	Natural Killer
OMS	Organización Mundial de Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (Single nucleotide polymorphism)
NS1	Proteína no estructural NS1 de DENV
NS2A	Proteína no estructural NS2A de DENV
NS2B	Proteína no estructural NS2B de DENV
NS3	Proteína no estructural NS3 de DENV
NS4A	Proteína no estructural NS4A de DENV
NS4B	Proteína no estructural NS4B de DENV
NS5	Proteína no estructural NS5 de DENV
WT	Wild Type
SIVIGILA	Sistema de Vigilancia en Salud Pública

INTRODUCCIÓN

El dengue es una arbovirosis ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales, transmitida por la picadura de un mosquito del género *Aedes*. La infección se produce por la interacción entre el vector, el virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) y el hospedero, en el que la infección puede manifestarse de forma asintomática o con signos y síntomas que pueden estar asociados a mortalidad (1–5). Varios factores favorecen la infección: los factores macrodeterminantes que involucran características ambientales, sociales y culturales que permiten la persistencia y diseminación del vector, y los factores microdeterminantes que consideran las características del hospedero, el virus y el vector que direccionan el curso de la infección (6).

Dentro de las características del hospedero, se encuentran algunos aspectos involucrados en la respuesta inmunológica, siendo responsables de que se presente o no sintomatología clínica. Estudios realizados a nivel mundial han evidenciado asociaciones entre componentes genéticos del huésped con la susceptibilidad a la infección y la patogénesis de la enfermedad (1). Un polimorfismo de nucleótido único (SNP), es una variación en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) que involucra una sola base, esta debe estar presente en al menos el 1% de la población; cuando la variación está relacionada con un cambio en el aminoácido codificante se denomina no sinónima, de lo contrario se denomina sinónima (7). Estudios desarrollados en países como Taiwán, Tailandia, Brasil, Venezuela, Cuba y Honduras, han relacionado los SNPs con la severidad de la infección por DENV, sin embargo, las asociaciones encontradas no coinciden entre los diferentes estudios. Debido a las diferencias en los diseños metodológicos, las poblaciones analizadas y los criterios para la definición de los casos, se dificultan la comparación de los mismos. Por lo anterior, la información de los estudios incluidos en el análisis de este trabajo, se presentó siguiendo los parámetros de definición de casos de dengue descritos en el artículo original.

En Colombia, el vector *A. aegypti* se encuentra distribuido en más del 90% del territorio nacional, en municipios situados por debajo de los 2.200 msnm que presentan condiciones ambientales favorables para la transmisión y circulación de los cuatro serotipos virales (8,9). La población de la región Centro-Oriente conformada por los departamentos de Boyacá, Santander, Norte de Santander, Tolima, Huila y Cundinamarca presenta la mayor incidencia de la infección. De acuerdo a los informes del Instituto Nacional de Salud (INS), los niños menores de 14 años, son los más afectados por dengue y dengue grave (8–10). Sin

embargo, existe poca información sobre la incidencia o prevalencia de las infecciones asintomáticas, las cuales contribuyen en la persistencia de la infección en las zonas endémicas.

Por lo anterior, se hace necesario la caracterización de las frecuencias polimórficas de los SNP en los genes de DC-SIGN (rs4804803), TNF- α (rs1800629) y Fc γ RIIa (rs1801274) en niños de los municipios de Anapoima, Apulo y Girardot, del departamento de Cundinamarca, con el objetivo de identificar si existe una relación entre la presencia de los SNPs y la susceptibilidad a la infección o la enfermedad.

1. MARCO TEÓRICO

El dengue es una enfermedad viral ampliamente distribuida a nivel mundial que afecta principalmente a la población pediátrica residente en países tropicales y subtropicales. Las manifestaciones clínicas del dengue, pueden ser inaparentes hasta fatales (2,3). Según la OMS el 90% de las infecciones primarias cursan de forma asintomática, sin embargo, en una infección secundaria, por un serotipo diferente del virus, la respuesta inmune no neutraliza la infección, produciendo un aumento en la intensidad de los síntomas que se relaciona con la severidad de la enfermedad (2). Algunos estudios han identificado características propias del hospedero, el virus y el vector que favorecen la infección por DENV.

1.1. Virus

El serocomplejo dengue (DENV) pertenece al género *Flavivirus*, de la familia *Flaviviridae*, conformado por cuatro serotipos (DENV-1 a DENV-4). El virus se transmite por artrópodos o mosquitos del género *Aedes*, el cual requiere para su diseminación la interacción mosquito-humano-mosquito (11–13).

El DENV es un virus icosaédrico de aproximadamente 50 nm, conformado por una membrana lipídica, sobre la cual se insertan las proteínas de membrana y de envoltura (5,14). El interior del virus contiene un complejo riboproteico conformado por la proteína de la cápside y el genoma viral que consiste en una única hebra de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva que codifica para un polipéptido único, dando origen a tres proteínas estructurales: cápside, envoltura y membrana, y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5 (14).

1.2. Epidemiología

La incidencia de dengue en el mundo ha aumentado considerablemente en los últimos 50 años, debido a los procesos de migración de la población que han conducido a la urbanización desordenada, la deficiencia en el suministro de agua potable y servicios básicos, así como la interacción de fenómenos como la globalización, las variaciones climáticas generadas por el calentamiento global. Se estima que anualmente se presentan entre 50 a 100 millones de infecciones en más de 100 países del mundo, la mayoría de ellas en países ubicados en áreas tropicales y subtropicales, y un porcentaje de estas infecciones se han reportado en zonas en las que anteriormente no se presentaba la enfermedad (2,15). El 50% de la población mundial se encuentra en riesgo de padecer la infección, de la cual 824 millones de personas residen en zonas urbanas y 763 millones en zonas peri-urbanas (16).

En Colombia el dengue es un problema prioritario de salud pública, las condiciones ambientales y socioeconómicas favorecen la presencia de los vectores (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*) y la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus que producen un aumento en la incidencia y transmisión de la enfermedad. (8,17,18). Los departamentos ubicados en la región Centro Oriente como Cundinamarca, Tolima, Huila, Boyacá, Santander y Norte de Santander contribuyen con el mayor porcentaje de casos de dengue que se notifican al sistema de vigilancia. En los últimos años se ha identificado que el 30% de los casos de dengue y el 52% de los casos de dengue grave se concentra en población menor de 14 años(18–21).

A pesar de que en Colombia el dengue es una enfermedad de notificación obligatoria, la dificultad en la identificación temprana de los casos, el diagnóstico, el subregistro en la notificación, la ausencia de una herramienta para la detección y vigilancia de las infecciones asintomáticas dentro del sistema de vigilancia epidemiológica, la convierten en un tema de interés en salud pública debido a la necesidad de conocer la incidencia real y prevalencia de la misma en la población. La incidencia de dengue en Colombia en la última década ha presentado una tendencia creciente, durante la cual se registró la mayor epidemia (Octubre de 2009 a Noviembre de 2010) y un comportamiento fluctuante de la enfermedad entre 2010 y 2016, ubicándose dentro del canal endémico entre la zona de alarma y zona de brote (18–20).

El año 2014, se notificaron en el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) 110.473 casos totales de dengue, 107.696 (97.5%) de dengue y 2.777 (2.5%) de dengue grave (19). En dengue y dengue grave el 47% de los casos se presentaron en mujeres y el 53% en hombres, los grupos de edad más afectados por dengue fueron el de 5 a 9 años y el de 10 a 14 años, mientras que en dengue grave el grupo de edad más afectado fue el de 5 a 9 años seguido por el de 10 a 14 años (17).

El año 2015 se notificaron en el país 94.916 casos de dengue, el 98,6 % corresponde a dengue y el 1,4 % a dengue grave (20). El año siguiente (2016) se presentó un número superior de casos, notificando 103.822 casos de dengue, el 50.0% sin signos de alarma, el 40% con signos de alarma y el 1.0% de dengue grave (22). Para la semana epidemiológica 21 del año 2017, se notificaron al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) 13.104 casos de dengue, 7.813 casos (59,6 %) sin signos de alarma, 5.161 casos (39,4 %) con signos de alarma y 130 casos (1,0%) de dengue grave (21).

En el departamento de Cundinamarca, la incidencia de dengue ha mostrado un aumento significativo en los últimos diez años, ubicándose dentro de los principales departamentos con notificación activa de la enfermedad. Estudios realizados en los municipios de Anapoima y La Mesa, identificaron la presencia de tres serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-4 en Anapoima, y la circulación de los cuatro serotipos en la Mesa (8,23). Un estudio previo realizado en nuestro grupo encontró una seroprevalencia de anticuerpos IgG contra DENV superior al 80% en una población pediátrica asintomática residente en zona endémica (24).

En el presente estudio se analizaron muestras recolectadas el año 2014 en el departamento de Cundinamarca, el cual tiene una alta prevalencia de la enfermedad, presentando una letalidad superior a la nacional (17). Este estudio incluyó muestras de los municipios de Anapoima, Apulo y Girardot, de acuerdo al censo general de 2005 del DANE, el municipio de Anapoima cuenta con 11.503 habitantes de los cuales el 50.9% son hombres y el 49.1% mujeres, Apulo posee 7.822 habitantes de los cuales, 48.1% son hombres y 51.9% mujeres mientras el municipio de Girardot cuenta con 97.889 habitantes (47.6% hombres) (25–27).

1.3. Patogénesis

La infección por dengue puede cursar de forma asintomática o tener una presentación clínica variable. Se estima que solo el 20% de los individuos infectados presentan signos y síntomas, dentro de los cuales se pueden identificar diferentes tipos: individuos que desarrollan la enfermedad leve y no asisten a las instituciones de salud para recibir atención, individuos que asisten pero se diagnostican como síndrome febril indiferenciado, individuos con diagnóstico clínico a los que se les realiza manejo y tratamiento de la enfermedad pero no se reportan al sistema de vigilancia y los individuos a los cuales se les realiza confirmación del diagnóstico y la notificación del caso, que corresponden a un porcentaje muy pequeño de la población que presenta la enfermedad (11).

La infección por uno de los serotipos de virus dengue genera una inmunidad homotípica de larga duración pero no proporciona inmunidad protectora cruzada a los otros serotipos del virus(13). En una primera infección, el virus puede infectar las células de Langerhans inmaduras, a través del receptor DC-SIGN. Las células infectadas secretan citocinas, inician su maduración y migran hacia los nódulos linfáticos, donde entregan el virus y hacen presentación del antígeno a los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺. A partir de este momento se inicia la respuesta inmune adquirida, en la que ocurre la activación de las células, la expansión clonal, y el desarrollo de su función efectora mediante secreción de citocinas, la producción de anticuerpos, y un porcentaje de estas se diferencian como células de memoria (1,28–31). Durante la activación de los linfocitos, simultáneamente se presenta citólisis de las células infectadas por acción de las células NK, proceso en el que también se induce la secreción de citocinas proinflamatorias (28).

La infección secundaria, producida por un serotipo heterólogo, al responsable de la primoinfección, se encuentra relacionada con el aumento en la probabilidad de presentar manifestaciones clínicas características de dengue grave. Se ha propuesto que en esta segunda infección se presenta un proceso denominado “Pecado Original Antigénico”, en el cual los linfocitos T de memoria generados durante la primera infección, tienen menor avidez por los epítopes del nuevo serotipo de DENV dificultando el control de la infección (28,32–35). Por otro lado, en estas infecciones se ha descrito el fenómeno de amplificación dependiente de anticuerpos (ADE), en el que los anticuerpos producidos en la infección primaria reconocen pero no neutralizan el virus heterólogo, permitiendo la interacción del

complejo antígeno-anticuerpo con los receptores Fc γ de los monocitos y macrófagos, favoreciendo la entrada del virus a la célula y la propagación de la infección (28,32,35,36).

El perfil genético del virus, del vector y del hospedero constituyen tres componentes esenciales para explicar la heterogeneidad en la presentación clínica y establecer el desenlace de la infección (15,34,37–42). Los SNP pueden influir en la regulación y/o codificación a través de tres mecanismos: la expresión cuantitativa de receptor, afinidad a su ligando o capacidad de señalización (43). Dentro de los polimorfismos más estudiados en genes del hospedero durante la infección por DENV se encuentran los antígenos leucocitarios humanos (HLA) clase I HLA-A, HLA-B (44,45), la quinasa Janus 1 (JAK1) (39), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α)(34,45,46), Factor de Crecimiento Transformante (TGF)-B1 (34), Linfotoxina alfa (LTA) (45), fenotipos del sistema ABO(47), isoforma CD32 del receptor Fc γ (Fc γ RIIa) (48,49) y la proteína de membrana tipo-II con un dominio extracelular de lectina tipo C (DC-SIGN) (50).

1.4. Polimorfismos

1.4.1. El receptor DC-SIGN

El receptor DC-SIGN (Proteína de membrana tipo-II con un dominio extracelular de lectina tipo C), es un receptor de membrana tipo II, compuesto por 3 dominios, el N-terminal localizado en el citoplasma, otro transmembranal y un tercer dominio extracelular conformado por una región de siete repeticiones altamente conservadas de 23 aminoácidos junto con el dominio carbohidrato para unión a patógenos (37,51). El receptor está presente en macrófagos, células dendríticas (CD) inmaduras de la periferia, CD maduras de tejidos linfoides, y su expresión es regulada por la interleucina 4 (IL-4) (52). DC-SIGN media la migración de CDs en el endotelio por interacción con ICAM-2, su unión al ligando induce la internalización endosomal para el procesamiento y presentación de antígeno por complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II); además participa en procesos de fagocitosis, adhesión celular, activación intracelular y secreción de citocinas (1,37,52).

Las CD son unas de las primeras células en infectarse, en las cuales la internalización del virus está mediada, en parte, por el receptor DC-SIGN. Un polimorfismo en éste receptor, podría afectar la entrada, replicación y respuesta inmune a la infección por DENV (37,51,53–55).

El gen CD209 localizado en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13.3) codifica para el receptor DC-SIGN. El SNP en la posición -336 (rs4804803) tiene efecto en la expresión de la proteína y se ha encontrado una relación con la infección por DENV (37,38,56). El primer reporte se realizó en el año 2005, en el cual Sakuntabhai *et al*, caracterizaron 40 polimorfismos en todo el gen *CD209* en una población tailandesa, identificando que la presencia del alelo G en la posición -336 proporcionaba protección dominante contra la fiebre de dengue (FD), pero no contra la fiebre hemorrágica de dengue (FHD). Lo anterior se explicó porque en los individuos con dengue los genotipos GG y AG aumentaron el riesgo de evolucionar hacia dengue hemorrágico (56). A diferencia de ello, Silva *et al* (2010), no encontraron relación entre el polimorfismo de este gen y la infección por DENV en población de Salvador, en Brasil (39). Sin embargo, el estudio de Wang *et al*, en 2011 identificó la misma asociación propuesta en el año 2005, respecto a los genotipos GG y AG, adicionalmente lo relacionaron con mayor producción de TNF- α , IL12p40 y IP-10 y la disminución en la replicación viral, mientras que la presencia del genotipo AA se describió como factor protector para desarrollar FHD (51).

Xavier-Carvalho *et al* (2013), identificaron que la presencia del genotipo GG tiene un efecto protector para dengue severo (55). Sin embargo, estudios realizados en poblaciones de India occidental, Honduras y Pará en Brasil, no encontraron asociación del polimorfismo y el desenlace de la infección (37,38,40). En este caso, se describió un menor número de manifestaciones clínicas cuando se presentó el alelo G comparado con el genotipo AA (38). Por otro lado, en el año 2011, Noecker *et al* reportaron una asociación entre la presencia del alelo G con presentación de síntomas durante la infección, en habitantes de Morales, México. Un resultado similar fue propuesto en el año 2015 por Dettogni *et al*, quienes encontraron en población brasilera, una asociación entre la presencia del alelo A y la no persistencia de la sintomatología (57,58). Como se evidencia en estos trabajos, la información sobre la correlación de este SNP con infección o severidad es contradictoria y depende al parecer de otras condiciones genéticas de los pacientes o de los diagnósticos usados.

1.4.2. El receptor Fc gamma

Los receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas G (Fc γ R) tienen un rol importante en el mantenimiento del equilibrio del sistema inmune, las variaciones en este receptor pueden favorecer la patogénesis de enfermedades (43). El receptor Fc se

encuentra en las células efectoras, internalizando complejos inmunes e iniciando la respuesta inmune celular y humoral (1,59,60). Los receptores, se componen de tres dominios, un dominio extra citoplasmático, un dominio transmembrana y un dominio de activación/inhibición, el cual posee una región basada en tirosina (ITAM), que actúa como unidad central para la transmisión de señales (1,59,60). La isoforma FcγRII (CD32), presenta cuatro variantes alélicas entre ellas FcγRIIa (única en humanos) cuya secuencia ITAM se encuentra en la cadena de unión a su ligando IgG. Este receptor se encuentra expresado en la superficie de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, células dendríticas y de Langerhans (59).

Los receptores Fc expresados en las células presentadoras de antígeno (CPA) internalizan los inmunocomplejos antígeno-anticuerpo que se generan en las infecciones secundarias por DENV fenómeno denominado ADE (1,28,32). Algunos estudios han centrado sus ensayos en la caracterización de los receptores Fc, dentro de los cuales el más estudiado es el FcγRIIa. El gen de este receptor se ubica en el brazo largo del cromosoma 1 (1q23), en el que un cambio en la posición 519 (A/G) da lugar a la sustitución de una histidina (H) por una arginina (R) en el residuo 133 en la proteína madura FcγRIIa, y modifica su capacidad de unión a las subclases de inmunoglobulinas IgG (57,61). La presencia del nucleótido A, codifica H que produce una unión más eficiente con la subclase IgG₂ (43), mientras que el nucleótido G, que codifica para R, presenta una mayor afinidad con las subclases IgG₁ e IgG₃ (57,62–65). Adicionalmente, en pacientes con FHD se han encontrado niveles bajos de anticuerpos IgG₂ anti-dengue comparados con fiebre de dengue y síndrome de choque por dengue (57,66).

En un estudio en niños vietnamitas, se encontró que los individuos con fenotipo R/R presentan una menor probabilidad de desarrollar FHD (64), este hallazgo coincide con los obtenidos en los estudios realizados en población cubana, en los que se ha analizado el polimorfismo rs1801274. Por ejemplo el fenotipo H/H es más frecuente en pacientes con diagnóstico de FD o FHD en comparación con aquellos con infecciones subclínicas o inaparentes (67). En trabajos posteriores, se reportó la persistencia de manifestaciones clínicas, altos títulos de IgG en individuos con este fenotipo y el desarrollo de manifestaciones hemorrágicas (68–70).

Rodríguez *et al* (2013), identificaron que la presencia del fenotipo H/R en población hondureña, está relacionada con mayor riesgo de padecer dengue severo (40). Por otro lado, en población mexicana, la presencia del alelo A (histidina) se asoció con protección, ya que estos individuos tuvieron una menor probabilidad de desarrollar manifestaciones clínicas, adicionalmente, los pacientes portadores del genotipo AA fueron menos propensos a desarrollar dengue grave (57). Estos hallazgos son similares a los obtenidos por Dettogni *et al*, quienes asociaron la presencia del alelo A con menos días de síntomas, a diferencia del fenotipo R/H que fue relacionado con la persistencia de síntomas en infecciones secundarias por dengue (58).

Las características de receptor FcγRIIIa y su interacción con las subclases de inmunoglobulinas, influyen la producción de citocinas proinflamatorias, que pueden favorecer la aparición de manifestaciones clínicas por DENV (68,71). Gran variedad de estudios realizados reportan un aumento de estas citocinas en población pediátrica con dengue grave (55,71–75).

1.4.3. Factor de necrosis tumoral alfa

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) es una citocina secretada predominantemente por monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales en dos formas, una precursora unida a membrana y otra soluble (76–78). El TNF-α regula diferentes procesos biológicos como la activación de leucocitos, la liberación de citocinas y quimiocinas, y la producción de especies reactivas de oxígeno e intermediarios de nitrógeno, por lo que se ha involucrado en la disfunción endotelial a través de la inducción de genes involucrados en la inflamación y quimio-atracción (77,78).

El gen que codifica TNF-α se encuentra en el locus del HLA clase III, específicamente en el brazo corto del cromosoma 6 (6p21.3). La presencia de polimorfismos en la región no codificante tiene un efecto en la transcripción del gen causando una variación en la síntesis de la citoquina (1,46,73,79). Estudios de casos y controles desarrollados en diferentes poblaciones revelan asociaciones entre los polimorfismos del promotor de TNF-α y la susceptibilidad o protección a enfermedades infecciosas como periodontitis(80), nefritis lúpica (81), leishmaniasis (82), sepsis(83), dengue (84) entre otras. La pérdida de plasma característica en dengue grave, puede ser producto de una disfunción endotelial relacionada a TNF-α, por lo que se han dirigido investigaciones para establecer la

asociación entre el polimorfismo -308 de la región no codificante del TNF- α y el desarrollo de dengue grave (32,34,85).

El trabajo realizado por Loke *et al* (2002), no encontró relación entre los polimorfismos de la región no codificante del TNF- α y el diagnóstico de FHD en niños vietnamitas (64). Contrario a lo anterior, Fernández *et al* (2004), identificaron en una población venezolana, una asociación de este polimorfismo con el aumento en los niveles de esta citoquina, en individuos que cursaban con FHD (46). Por otro lado, el estudio de Vejbaesya *et al* (2009), no encontró asociación del polimorfismo -308 con FHD, pero sí lo relacionaron con la presencia del alelo A en la posición -238, en niños del grupo étnico Thais, estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en el estudio de Gracia *et al* en población mexicana (45,86).

El estudio realizado en Cuba en el año 2010 por Pérez *et al*, encontró mayor frecuencia del alelo A en pacientes con FHD que cursaban una infección secundaria cuando la secuencia de infección era DENV-1/DENV-2; adicionalmente, se asoció el genotipo G/G con protección (34). Resultados similares se describieron en población Tailandesa, en la que se asoció la presencia del alelo A con un riesgo mayor de sangrado, proponiendo su uso como marcador predictor de severidad en la infección por DENV (84). De igual manera, Sam *et al* (2015), evidenciaron en pacientes con FHD/SSD de Malasia una frecuencia mayor del alelo A y el genotipo A/G; este mismo año en población brasileña, Dettogni *et al*, evidenció una asociación entre el genotipo A/G y con mayor tiempo de sintomatología en individuos con infección secundaria, mientras que la presencia del alelo A se relacionó con menor tiempo de duración de los síntomas (58,75).

Los estudios mencionados anteriormente evidencian resultados contradictorios respecto a la presencia de los polimorfismos en los tres genes, y su asociación con la severidad o el desenlace la infección por DENV. Varios estudios explican que esta diversidad puede ser producto de la infección, las características genéticas de los grupos poblacionales, los factores de riesgo a los que se encuentran expuestos y la virulencia de los serotipos circulantes. Los autores sugieren que las diferencias propias del diseño de los estudios y la metodología aplicada dificultan la comparación de la influencia de los polimorfismos en la infección. Sin embargo, resaltan la importancia de desarrollar estudios que asocien

múltiples genes en poblaciones distintas, así como estudios de haplotipos de estos genes (37–39,51,57).

En Colombia es estudio de Avendaño *et al.*, evaluó la asociación entre las variantes de tres polimorfismos en los genes rs1800750 (TNF- α), rs2069843 (IL-6) y rs2069705 (INF- γ) con la severidad del dengue en pacientes de Antioquia y Chocó, encontrando una asociación de la presencia del alelo A en el polimorfismo de la IL-6 con casos de DH en afro-colombianos, adicionalmente, identificaron una asociación de las combinaciones alélicas “GGT” y “GAC” de los SNPs rs1800750, rs2069843 y rs2069705, en pacientes con FHD (87,88). Cabe destacar que en nuestro país no se han realizado estudios que relacionen los polimorfismos rs4804803 (DC-SIGN), rs1800629 (TNF- α) y rs1801274 (Fc γ RIIa) con la infección por DENV, sin embargo, la identificación de polimorfismos en estos genes si se han analizado en otras patologías.

En el año 2006, el estudio de Gómez *et al.*, no encontró diferencias estadísticamente significativas entre la presencia del polimorfismo en el receptor DC-SIGN (rs4804803) y el desarrollo de tuberculosis en personas del noroeste colombiano (89). Por otro lado, el receptor Fc se ha relacionado con enfermedades autoinmunes, Magnusson *et al.* en el año 2004, asociaron la presencia de SNP con un mayor riesgo de Lupus Eritematoso Sistémico (LES), debido a que encontraron una mayor frecuencia del SNP Fc γ RIIa-131R en familias con casos múltiples de LES (65).

En el país se ha incrementado el interés en el estudio del polimorfismo -308 por los altos niveles de TNF- α en procesos neoplásicos y enfermedades autoinmunes. El estudio de Torres *et al.* (2004), no encontró asociación entre el polimorfismo con la susceptibilidad o riesgo de padecer cáncer gástrico en población de Cauca (90). Por otro lado, Guarnizo *et al.*, en el año 2007 relacionaron la presencia del alelo A con susceptibilidad de desarrollar LES en población colombiana (91). En este mismo año, Rojas *et al.*, indicia que el polimorfismo de TNF- α (rs1800629) no puede ser empleado como predictor de enfermedades cardiovasculares (ECV) en pacientes con artritis reumatoide (AR) (92). Por otro lado, la presencia del alelo A fue encontrada en mayor frecuencia en pacientes con espondiloartritis (SpA), en el estudio reportado por Romero *et al.*, en el año 2012 (93). Finalmente, en los resultados de un estudio realizado en el año 2013 por Amaya *et al.*, no

encontró relación entre el polimorfismo rs1800629 y el desarrollo de dos formas clínicas de la periodontitis apical (AP): supurativa aguda y crónica no supurativa (80).

2. PREGUNTA PROBLEMA

¿Existe una asociación entre la presencia de los polimorfismos DC-SIGN (rs4804803), TNF- α (rs1800629) y Fc γ RIIa (rs1801274) y la susceptibilidad a la infección por virus dengue en una población pediátrica residente en una zona endémica de Colombia?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo principal

Establecer una asociación entre la presencia de polimorfismos de los genes para DC-SIGN (rs4804803), Fc γ RIIa (rs1801274) y TNF- α (rs1800629), con la susceptibilidad a la infección por dengue en una población pediátrica de una zona endémica en Colombia.

3.2. Objetivos específicos

1. Describir las frecuencias genotípicas de los SNP en los genes DC-SIGN (rs4804803), Fc γ RIIa (rs1801274) y TNF- α (rs1800629) en cada uno de los grupos de estudio.
2. Comparar las frecuencias alélicas de los SNP en los genes DC-SIGN (rs4804803), Fc γ RIIa (rs1801274) y TNF- α (rs1800629), en niños con infección por dengue sintomática o asintomática.
3. Determinar las características genotípicas y alélicas presente en grupo de niños sintomáticos de acuerdo al grado de severidad de la enfermedad.
4. Identificar las combinaciones genotípicas de los tres polimorfismos en cada uno de los grupos de estudio.

4. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis alterna

Existe una asociación entre la presencia de los polimorfismos rs4804803 (DC-SIGN), rs1800629 (TNF- α) y rs1801274 (Fc γ RIIa) y la susceptibilidad de la infección por virus dengue en una población pediátrica de Colombia.

4.2. Hipótesis nula

No existe una asociación entre la presencia de los polimorfismos rs4804803 (DC-SIGN), rs1800629 (TNF- α) y rs1801274 (Fc γ RIIa) y la susceptibilidad de la infección por virus dengue en una población pediátrica de Colombia

5. METODOLOGÍA

5.1. Tipo de estudio

Descriptivo, el cual realiza la evaluación de las muestras de individuos sintomáticos y asintomáticos evaluación de los individuos siguiendo las características de un estudio de corte transversal

5.2. Población y muestra

Población pediátrica entre 4 y 14 años, residentes en una zona endémica para dengue del departamento de Cundinamarca, dentro de los que se incluirán niños sin antecedente serológico detectable de infección por DENV, y niños infectados que cursen la infección tanto sintomática como asintomática.

5.3. Selección de voluntarios e ingreso al estudio

Los individuos del presente estudio fueron seleccionados de dos proyectos realizados por el Grupo de Virología de la Universidad El Bosque. El primero de ellos denominado: “Espectro clínico de la infección por virus dengue en una cohorte de niños de 5 a 14 años de dos municipios de Cundinamarca”, enfocado a estudiantes de instituciones educativas de los municipios de Anapoima y Apulo, municipios ubicados en la provincia del Tequendama. El segundo estudio titulado: “Algoritmo de laboratorio para la confirmación de casos de dengue en muestras de individuos con síndrome febril atendidos en instituciones de salud de Cundinamarca”, se realizó con individuos que consultaron por síndrome febril al Hospital Universitario de La Samaritana - Unidad Funcional Girardot, ubicado en el

municipio de Girardot. A continuación, se describe el proceso de captación de los individuos y de procesamiento de las muestras de los estudios descritos anteriormente, cuya metodología y resultados proporcionaron los parámetros para establecer los criterios de inclusión y de exclusión del presente estudio.

5.4. Captación de individuos

5.4.1. Espectro clínico de la infección por virus dengue en una cohorte de niños de 5 a 14 años de dos municipios de Cundinamarca (Estudio A)

El primer paso para el desarrollo de este estudio comprendió la socialización a las alcaldías, la secretaría de educación y de desarrollo social de cada municipio. Una vez obtenida su aprobación se realizó la selección de las sedes de las instituciones educativas, en el municipio de Anapoima, las sedes de primaria General Santander y Policarpa Salavarrieta de la Institución Educativa Departamental Julio Cesar Sánchez ubicadas en el área urbana, y la Institución Educativa Rural Departamental San Antonio la cual posee estudiantes en los niveles educativos de preescolar, básica primaria, secundaria y media vocacional. En el municipio de Apulo se eligió la Institución Educativa Departamental Integrada Antonio Nariño ubicada en la zona urbana, la cual tiene los niveles de primaria, bachillerato y media vocacional distribuidas en dos jornadas académicas.

Este proceso continuó con la socialización del estudio a los rectores, los docentes y a la comunidad. Para ello se realizaron charlas informativas durante las reuniones de padres de familia en las cuales se presentó el objetivo y metodología del estudio. Durante este mismo espacio se proporcionó a los padres y acudientes respuesta a sus inquietudes y se entregó información en folletos pedagógicos en los que se presentó el propósito y características del estudio. Aquellos padres o acudientes que manifestaron interés en que su hijo(a) participara en el estudio diligenciaron un formato con la información de contacto para establecer comunicación telefónica y realizar la programación de la cita médica para la fase de ingreso al estudio.

El día programado en cada institución educativa y de acuerdo al horario de las citas agendadas previamente, un investigador del grupo realizó la recepción del padre y del niño, la toma de datos personales, e inmediatamente procedió a la explicación del propósito, la metodología, los riesgos y beneficios de participar. Si el niño y su padre o acudiente aceptaban, el investigador realizó el proceso de diligenciamiento y firma del consentimiento

y del asentimiento informado. Una vez finalizado este paso, se realizó la aplicación de la encuesta de Conocimientos, Actitudes y Prácticas (CAP) al padre de familia, y al niño se le realizó un examen médico completo y la toma de una muestra de sangre en el brazo para el diagnóstico de dengue.

Al finalizar la jornada, las muestras se centrifugaron y se hicieron alícuotas de plasma y células, las cuales se almacenaron a -20°C, hasta el momento del transporte al laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque en Bogotá donde se realizaron las pruebas serológicas y virológicas para el diagnóstico de dengue. Una vez realizado el procesamiento de las muestras, se programó la entrega de resultados y explicación de los mismos durante las reuniones de padres de familia. Asimismo, se realizó la socialización de los resultados generales del estudio de la seroprevalencia y las infecciones por dengue identificadas a la comunidad educativa.

5.4.2. Algoritmo de laboratorio para la confirmación de casos de dengue en muestras de individuos con síndrome febril atendidos en instituciones de salud de Cundinamarca (Estudio B)

Se incluyeron en el estudio individuos con síndrome febril menor a 7 días de evolución que consultaron a los servicios de urgencias, consulta externa y hospitalización del Hospital Universitario de La Samaritana Unidad Funcional Girardot. Luego de una valoración clínica inicial del paciente y si el médico tratante consideraba que el individuo cumplía con los criterios de inclusión, realizaba la explicación del estudio al paciente y su acudiente y los invitó a participar en el mismo. Durante el proceso de captación e ingreso de los individuos en el estudio, el personal médico continuó con el proceso de atención del paciente siguiendo el protocolo de manejo de pacientes aplicado por el Hospital. Si el paciente aceptaba participar en el estudio, se procedía a realizar el proceso de firma del consentimiento y/o asentimiento informado y el diligenciamiento de la información sociodemográfica y la información clínica tanto en la historia clínica de la institución como en el formato de evaluación clínica de individuos febriles diseñado especialmente para el estudio.

Al finalizar la evaluación clínica, el médico solicitó la toma de una muestra de sangre al paciente (un tubo con anticoagulante EDTA 4 ml y/o un tubo sin anticoagulante), para realizar el hemograma y las pruebas de diagnóstico rápido de dengue (PDR), para la detección de inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina G (IgG) y la proteína viral NS1.

5.5. Criterios de inclusión de la población de estudio

Los grupos de estudio fueron seleccionados de los dos proyectos previamente descritos: del estudio A se seleccionó el grupo control y el grupo de infecciones asintomáticas y del estudio B se seleccionó el grupo de infecciones sintomáticas. Las características de los grupos definidos se describen a continuación:

- Grupo control: Individuos sin antecedente serológico detectable de infección por virus dengue (IgM, IgG indirecta e IgG de captura con resultado negativo).
- Grupo de infecciones asintomáticas: Individuos sin evidencia clínica de infección por dengue, pero con resultado positivo para IgM y/o IgG de captura y/o RT-PCR.
- Grupo de infecciones sintomáticas: Casos confirmados de dengue con signos de alarma (mialgias, dolor abdominal reportado, dolor abdominal a palpación, hepatomegalia, ascitis y/o exantema) y dengue grave.

A continuación, se muestran los criterios de clasificación empleados para caracterizar el grupo control y el grupo infecciones asintomáticas.

Tabla 1. Criterios de clasificación de infecciones en individuos asintomáticos

Clasificación	IgM	IgG Captura	IgG Indirecta	NS1	RT-PCR
Grupo Control	Negativo	Negativo	Negativo	-	-
Antecedente de Infección	Negativo	Negativo	Positivo	-	-
Infección primaria	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
	Positivo	Indeterminado	Positivo	Negativo	Negativo
	Indeterminado	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Infección Secundaria	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	Indeterminado	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	Indeterminado	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	Negativo	Indeterminado	Positivo	Negativo	Negativo
	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

En el caso del grupo de individuos con infección sintomática, se seleccionaron los pacientes entre 4 y 14 años, que presentaran uno o más de los siguientes signos: mialgias, dolor abdominal reportado, dolor abdominal a palpación (evidenciado durante la evaluación clínica), hepatomegalia, ascitis y/o exantema. Adicionalmente, se incluyeron en este grupo los pacientes con los criterios clínicos de dengue grave.

5.6. Criterios de exclusión

Del estudio A se excluyeron las muestras que presentaran antecedente de infección, las muestras que no tenían el volumen necesario para hacer la extracción de ADN y en las que no fue posible hacer la caracterización de los tres SNPs.

5.7. Procesamiento de las muestras

Las muestras de los individuos que consultaron al hospital, fueron inicialmente procesadas con pruebas de diagnóstico rápido (PDR) para la detección de la proteína no estructural NS1 y para las inmunoglobulinas IgM e IgG, con los kits que se describen a continuación:

5.7.1. Pruebas de diagnóstico rápido de dengue (PDR)

5.7.1.1. Dengue Early Rapid

Este ensayo permitió la detección cualitativa de la proteína no estructural NS1, permitiendo el diagnóstico clínico en pacientes con manifestaciones clínicas iniciales que se encontraron en la fase aguda de la enfermedad caracterizada por la viremia. La técnica se realizó siguiendo las indicaciones de fabricante

5.7.1.2. Dengue Duo Cassette

Esta prueba inmunocromatográfica permite la detección cualitativa y simultánea de niveles elevados de IgM e IgG dirigidos a virus dengue, haciendo posible la diferenciación entre infecciones primarias y secundarias, esta técnica se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.7.2. Pruebas de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

5.7.2.1. ELISA para detección de IgM (UMELISA)

A las muestras de ambos estudios se les realizó la detección de anticuerpos tipo IgM anti-dengue con el fin de identificar infecciones activas o recientes, este anticuerpo se puede detectar a partir del quinto día del inicio de los síntomas y como promedio disminuye a partir

de los 30 días y puede detectarse hasta el día 60. Para ello se utilizó el kit UMELISA® DENGUE IgM PLUS de Tecnosuma Internacional (UM 2016, Centro de Inmunoensayo del Instituto Pedro Kourí, La Habana, Cuba), que posee una sensibilidad de 99.6% y especificidad de 98.5%, la técnica se desarrolló siguiendo las indicaciones del fabricante (94–96).

5.7.2.2. ELISA para detección de anticuerpos IgG

La detección de anticuerpos IgG anti-dengue se realizó en las muestras de plasma de todos los individuos participantes en los dos estudios, a través de dos tipos de ELISA cualitativa: el kit de ELISA de captura de anticuerpos IgG contra dengue de la casa comercial Panbio (Alere) posee una sensibilidad de 96.3% y especificidad en zonas endémicas de 94.4%, presenta un punto de corte alto en contraste a un título aproximadamente de 1:2.560 en la prueba de inhibición de hemaglutinación (IH), por lo cual fue empleado en el presente estudio para detectar títulos elevados característicos de infecciones secundarias. El kit de ELISA indirecta de IgG para dengue de Panbio (Alere), tiene un punto de corte bajo a diferencia de la ELISA de captura, con el objetivo de detectar aquellos casos de antecedente de infección, es decir, en los que se tuvo contacto con el virus varios meses atrás o infecciones secundarias que cursan en los primeros días de viremia, donde los títulos son bajos y por tanto, no se detectan mediante la ELISA de captura; la sensibilidad es de 97.9% y una especificidad de 100% (97,98).

La prueba de ELISA IgG de Captura es un inmunoensayo que posee una sensibilidad de 96.3% y especificidad en zonas endémicas de 94.4% y La ELISA indirecta para IgG presenta una. La interpretación de los resultados y la ejecución de la técnica se efectuaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante (97,98).

Las muestras de los individuos asintomáticos se procesaron inicialmente para la ELISA IgM, IgG indirecta e IgG de captura, las muestras positivas para las pruebas de ELISA IgM o ELISA IgG de captura, se les realizó la ELISA para la detección de la proteína NS1 y la serotipificación; a diferencia de los asintomáticos a los sintomáticos la serotipificación a todas las pruebas independientemente del resultado de las PDR o serologías.

5.7.2.3. ELISA para la detección de la proteína viral NS1 (Dengue Early ELISA)

La detección cualitativa del antígeno viral NS1 de DENV se realizó a las muestras de suero o plasma que tuvieron un resultado positivo para IgM o IgG de Captura, utilizando el kit Dengue Early ELISA, el cual permite identificar los individuos en fase aguda, debido a que esta proteína no estructural se encuentra presente en forma libre durante la replicación viral. La especificidad es del 93.6% y sensibilidad 77.7%, la interpretación de los resultados y la técnica se realizó teniendo en cuenta las condiciones recomendadas por el fabricante (99).

5.7.3. Pruebas virológicas

5.7.3.1. Extracción de ARN viral y detección *por PCR*

La extracción del ARN viral en las muestras, se realizó con el kit QIAamp® viral RNA mini kit de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante (100,101). Para la confirmación de la infección y la identificación del serotipo de DENV se empleó una PCR anidada, empleando el kit SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR con ROX de Invitrogen, el cual emplea una mezcla enzimática conformada por la retrotranscriptasa SuperScript III y una Taq ADN polimerasa (versión de M-MLV de la transcriptasa inversa del virus de la Leucemia Murina Moloney), las cuales efectúan la retrotranscripción y la primera ronda de la PCR anidada en un único paso. El ADNc es empleado para amplificar un fragmento codificante para las proteínas C y prM (región genómica conservada entre los cuatro serotipos) utilizando los primers mD1 y D2 y así obtener un amplicon de 511 pb (Tabla No. 2). Posteriormente, se realizó una segunda amplificación donde se adicionan diferentes primers serotipo-específicos (Tabla No. 2) en un solo tubo (PCR multiplex) que amplifica la secuencia específica del serotipo presente en la muestra, el cual es identificado de acuerdo a la longitud del producto (102).

Tabla 2. Primers utilizados en RT-PCR anidada para serotipificación de DENV

Primer	Secuencia (5'-3')	Serotipo	Tamaño
mD1	134-TCAATATGCTGAAACGCGAGAAACCG	DENV-1	511 pb
		DENV-2	
		DENV-3	
		DENV-4	
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-616	DENV-1	511 pb
		DENV-2	
		DENV-3	
		DENV-4	
rTS1	CCCGTAACACTTTGATCGCT-322	DENV-1	208 pb
mTS2	CGCCACAAGGGCATGAACAGTTT-232	DENV-2	119 pb
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC-400	DENV-3	288 pb
rTS4	TTCTCCCGTTCAGGATGTC-374	DENV-4	260 pb

En la tabla se presentan los primers empleados en la primera (mD1 y D2) y segunda ronda (mD1, rTS1, mTS2, TS3 y rTS4), la secuencia de cada uno de ellos, el serotipo para el cual es específico y el tamaño del amplicon en pares de bases (pb). Tomado y modificado de: Chien, L.J. *et al.* (101).

Los productos obtenidos fueron evidenciados en gel de agarosa al 2%, empleando como agente intercalante de ADN bromuro de etidio al 10%, con el fin de revelar las bandas obtenidas y compararlas con el marcador de peso molecular Hyperladder IV de peso 100-1000 pb, para identificar el serotipo de DENV de acuerdo al tamaño del amplicon.

5.7.4. Caracterización polimórfica

Se hizo extracción del ADN celular de las células mononucleares obtenidas después de la separación del plasma, utilizando el kit CorpoGen DNA2000 que permitió obtener ADN genómico que fue empleado para las reacciones de PCR.

5.7.4.1. PCR-RFLP para DC-SIGN (rs4804803)

La identificación del polimorfismo de la región promotora -336, se realizó con una PCR convencional, empleando como primer sentido 5'-GGA TGG TCT GGG GGT TGA CAG-3' y primer antisentido 5'-ACT GGG GGT GCT ACC TGG C-3', el amplicon obtenido es de 150 pb. Posteriormente, se realizó la digestión con la enzima MscI, obteniendo un producto de 131 pb y otro de 19 pb cuando se encuentra el alelo G. La técnica se desarrolló siguiendo el protocolo de Sakuntabhai *et al* (56).

5.7.4.2. PCR FcγRIIa (rs1801274)

La detección del polimorfismo del receptor FcγRIIa, se realizó con dos primers sentido (G 5'-ATC CCA GAA ATT CTC CCG-3' y A 5'-ATC CCA GAA ATT CTC CCA-3') y uno antisentido (5'-CAA TTT TGC TGC TAT GGG C-3'), cada primer sentido se empleó en reacciones independientes con el primer antisentido, el producto de amplificación en ambas amplificaciones es de 253 pb, el alelo WT es G (103).

5.7.4.3. PCR-RFLP TNF-α (rs1800629)

Para la identificación del polimorfismo -308 de la región promotora del TNF-α, se realizó inicialmente una PCR convencional, empleando los primers: A1: 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' y A2: 5'- TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3', el nucleótido citosina (C) ubicado en la posición 20 del primer A1, incorpora el sitio de restricción de la enzima NcoI en la secuencia wild type (WT). El tamaño del fragmento obtenido en la amplificación es de 107 pb, luego se sometió a una digestión enzimática con NcoI, en presencia del alelo

G, la enzima reconoce su sitio de corte, originando un fragmento de 87 pb y otro de 20 pb (104).

Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa al 2%, los productos de las digestiones enzimáticas se evidenciaron en una electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

Tabla 3. Caracterización de los SNPs

SNPs	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')	Producto (pb)	Enzima	Producto digestión (pb)	Alelo	Ref.
DC-SIGN							
rs4804803	GGATGGTCTGGGGGTTGACAG	ACT GGG GGT GCT ACC TGGC	150	MscI	131 y 19	G	(56)
FcyRIIa							
rs1801274	ATC CCA GAA ATT CTC CCG ATC CCA GAA ATT CTC CCA	CAATTTTGCTGCTATGGGC	253			G A	(103)
TNF-α							
rs 1800629	AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	TCCTCCCTGCTCCGATTCCG	107	NcoI	87 y 20	G	(104)
Se presentan la secuencia de los primers empleados para la identificación de los tres SNPs, las enzimas y los productos en pares de bases (pb) obtenidos de cada uno de ellos. Finalmente, la referencia de las que fueron tomados.							

5.7.5. Almacenamiento y análisis de datos

La información de los formatos de evaluación clínica, el diagnóstico de laboratorio y los resultados de los polimorfismos se digitó en una base de datos diseñada en Microsoft Excel 2013. Al finalizar la digitación se realizó auditoria de los datos y la depuración de las bases para el paso al programa estadístico Stata versión 10.0. El primer paso del análisis comprendió la evaluación de la distribución de las variables con la prueba de Shapiro–Wilk, seguido de la determinación de las medidas de tendencia central, como media, desviación estándar para las variables con distribución normal, y mediana y rango intercuartílico para aquellas variables distribuidas de forma no normal; las variables con distribución normal fueron evaluadas con ANOVA de una vía, y de las variables con distribución no normal mediante la prueba de Kruskal Wallis. Posteriormente, se realizó el cálculo de las frecuencias y los odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95%, se consideró significancia estadística si el valor de p obtenido fue menor de 0.05.

5.8. Consideraciones éticas

La evaluación y el seguimiento de los pacientes pertenecientes a los dos estudios se desarrolló siguiendo las normas propuestas en la Declaración de Helsinki y la Resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud y la Resolución No. 002378 del 25 de junio de 2008,

establecida por el Ministerio de la Protección Social. Los protocolos de los trabajos, así como los formatos de recolección de información clínica y de laboratorio fueron revisados y aprobados por el comité de ética de las instituciones respectivas.

El protocolo del estudio A, fue aprobado por el comité de ética en investigaciones de la Universidad El Bosque, en el acta #007-2014 de 08 de abril de 2014. Por otro lado, el estudio B, fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigaciones del Hospital Universitario de La Samaritana, en el acta 31 octubre de 2013.

Los formatos de consentimiento informado y asentimiento informado de cada uno de los estudios, así como los formatos de evaluación clínica de los individuos (Anexos No. 1 a Anexo No. 4) se elaboraron exclusivamente para la recolección de la información de los participantes del estudio

6. RESULTADOS

En el presente estudio se realizó el análisis de SNPs en 230 muestras, en el estudio A se evaluó la información clínica, sociodemográfica y epidemiológica de 362 niños, 164 (45.3%) se excluyeron por presentar antecedente serológico de exposición a DENV, es decir, las muestras con resultado positivo solo en la prueba IgG Indirecta (Tabla 1). De las muestras restantes que cumplían con el criterio de diagnóstico de infección asintomática para el análisis de polimorfismos, se excluyeron 23 por volumen de muestra insuficiente para el procesamiento. Por esta razón, para el presente trabajo se seleccionaron 175 muestras, 138 muestras en el grupo de infección asintomática y 37 en el grupo control.

Por otro lado, de las 460 muestras de individuos con síndrome febril analizadas en el estudio B, se seleccionaron 57 muestras de individuos con diagnóstico confirmado de infección por DENV, de las cuales se excluyeron 2 muestras debido al bajo volumen de muestra para realizar la caracterización de los tres SNPs, 48 muestras se clasificaron como DCSA y 7 con DG, para ser incluidas en el grupo de infecciones sintomáticas.

6.1. Características sociodemográficas de la muestra poblacional

De las 230 muestras analizadas, el 50.4% fueron de sexo masculino evidenciando la homogeneidad de los grupos de estudio, en relación a las variables sociodemográficas y clínicas como edad, talla, peso y temperatura en los tres grupos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4). Se encontró que la edad de los individuos del grupo control presentó una mediana inferior en comparación a los grupos con diagnóstico de infección por DENV.

Tabla 4. Características sociodemográficas de los grupos de estudio

Variable	Grupo Control n=37				Infección Asintomática n=138				Infección Sintomática n=55				Total n(%)	p
	n	%	Me	RI	n	%	Me	RI	n	%	Me	RI		
Sexo	18 19	48.65 51.35			72 66	52.17 47.83			24 31	43.64 56.36			114 116	0.563 ^a
Edad			7	6 - 9			9	8 - 11			9	7 - 11		0.006 ^b
Talla (m)			1.23	1.13 - 1.34			1.33	1.25 - 1.43			1.4	1.3 - 1.55		0.002 ^a
Peso (kg)			25	21 - 31			31	25 - 37			30	22 - 38		0.009 ^b
Temperatura			36.5	36 - 36.9			36.55	36.2 - 36.9			39	38 - 39		0.0001 ^b
Frecuencia cardiaca			85	80 - 88			84	80 - 90			89	80 - 98		0.051 ^b
Frecuencia			18	14 - 22			17	14 - 20			20	19 - 22		0.0001 ^b
Tensión arterial media			72	70 - 75			73	70 - 80			73	70 - 80		0.180 ^b
Día de enfermedad											4	4 - 7		0.992 ^a

Me: Mediana RI: Rango Inter cuartilico

^a Valor de p calculado mediante ANOVA de una vía

^b Valor de p calculado mediante prueba Kruskal-Wallis

6.2. Resultados de las pruebas serológicas

Los resultados contribuyeron en la caracterización de los grupos, la totalidad de las muestras en el grupo control fueron negativas para cada de las pruebas serológicas y virológicas aplicadas.

En las PDR realizadas a los individuos sintomáticos, el 76.4% de las muestras fueron positivas para IgM, el 80% fueron positivas para IgG y el 38.2% positivas para la proteína no estructural NS1.

Tabla 5. Pruebas de diagnóstico rápido en infección sintomática

	Dengue Duo Cassette		Dengue Early Rapid
	IgM n (%)	IgG n (%)	NS1 n (%)
Positivo	42 (76.4)	44 (80)	21 (38.2)
Negativo	13 (23.6)	11 (20)	34 (61.8)

En la prueba de ELISA IgM el 45% de las muestras de individuos con infección asintomática presentó resultado positivo, mientras que en las muestras de los individuos con infección sintomática se identificó una positividad del 81%.

En ambos grupos se detectaron anticuerpos IgG en la prueba de ELISA indirecta lo cual indicó que estos individuos presentaron un antecedente de infección por DENV. Adicionalmente, al aplicar la prueba de ELISA IgG de captura que permitió identificar infecciones recientes o activas por dengue, tanto el grupo de infección sintomática como el de infección asintomática presentaron un alto porcentaje de muestras positivas 71.7% y 69% respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Presencia de IgM e IgG en los grupos de estudio

	IgM		IgG Captura		IgG Indirecta	
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)
Grupo Control n=37		37 (100)		37 (100)		37 (100)
Infección						
Asintomática n=138	64 (46.4)	74 (53.6)	99 (71,7)	39 (28,3)	135 (97.8)	3 (2.2)
Infección						
Sintomática n=55	45 (81.8)	10 (18.2)	38 (69)	17 (31)	52 (94.4)	3 (5.5)

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas serológicas, se realizó la clasificación de las infecciones en primarias o secundarias, se consideró como primoinfección aquellas muestras positivas para IgM o RT-PCR, con resultado negativo para las pruebas de IgG aplicadas. Por otro lado, las muestras definidas como infecciones secundarias además de presentar altos niveles en la prueba de ELISA IgM y/o identificar en estas muestras ARN de DENV, resultaron positivas en las pruebas de ELISA IgG (ELISA IgG captura) y en la prueba de ELISA indirecta.

En las infecciones sintomáticas y asintomáticas se identificó que más del 80% cursaban con infecciones secundarias (Tabla 7). En relación a las infecciones primarias fueron más frecuentes en el grupo de individuos asintomáticos (18.8%), comparado con el grupo de infecciones sintomáticas (5.5%).

Tabla 7. Infecciones primarias y secundarias en los grupos de estudio

	Infección Asintomática n=138 n (%)	Infección Sintomática n=55 n (%)
Primaria	26 (18.8)	3 (5.5)
Secundaria	112 (81.2)	52 (94.5)

Teniendo en cuenta el algoritmo diagnóstico de laboratorio propuesto para la detección de infecciones por DENV en individuos asintomáticos, las muestras positivas para IgM o IgG de captura se procesaron para la detección de antígeno viral NS1 y ARN de DENV. En el caso de las infecciones sintomáticas a la totalidad de las muestras se les realizó la detección de ARN de DENV y la prueba de NS1 se aplicó a las muestras siguiendo el algoritmo propuesto por el laboratorio para realizar la confirmación de las infecciones.

6.3. Detección de NS1 y serotipos de DENV

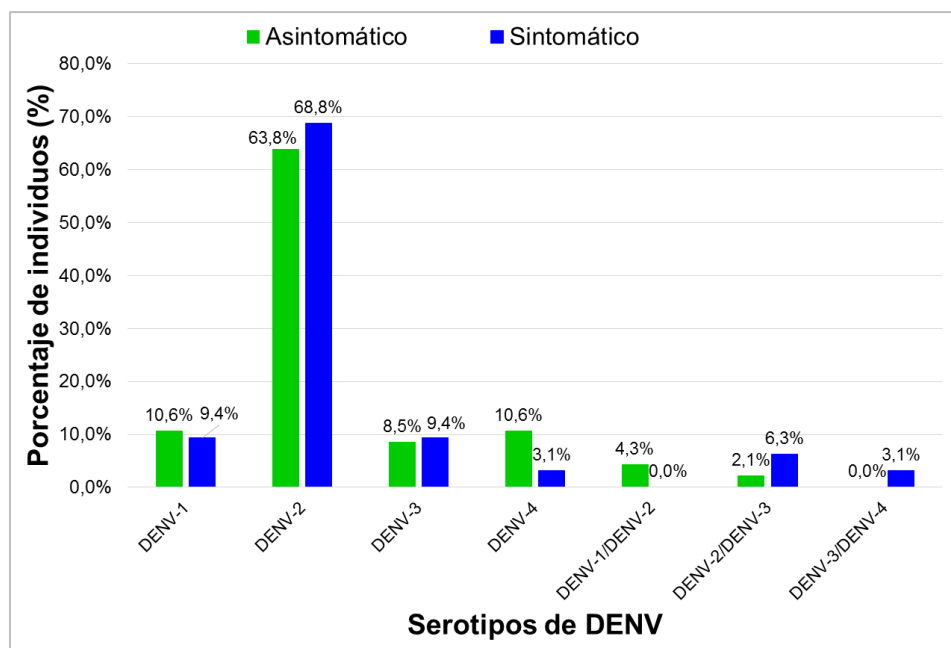
El 100% de las muestras de individuos asintomáticos fueron negativas en la prueba de ELISA NS1, sin embargo, el 34.6% de estas muestras resultaron positivas para la prueba de PCR anidada. El porcentaje de muestras positivas en el grupo de infección sintomática en la prueba de NS1 y PCR anidada fue de 44.7% y 58.2% respectivamente. A partir de la información obtenida, se consideró una infección activa si la prueba de NS1 y/o la RT-PCR resultó positiva, mientras que las muestras negativas para estas pruebas se consideraron como infecciones recientes (Tabla 8).

Tabla 8. Detección de la proteína viral NS1 y del ARN de DENV

	Infección Asintomática	Infección Sintomática
	n (%)	n (%)
NS1	n=94	n=47
Positivo	-	21 (44.7)
Negativo	94 (100)	26 (55.3)
RNA Viral	n=136	n=55
Positivo	47 (34.6)	32 (58.2)
Negativo	89 (65.4)	23 (41.8)

En ambos grupos de infecciones se detectaron los cuatro serotipos de virus dengue, el serotipo encontrado en mayor frecuencia fue DENV-2, tanto en infecciones asintomáticas (63.8%) como sintomáticas (68.8%). En seis (n=6) muestras se detectaron dos serotipos de DENV simultáneamente, tres de ellas en las infecciones asintomáticas producidas por DENV1/DENV-2 (n=2) y DENV-2/DENV-3 (n=1), y en las tres restantes se detectaron en el grupo de las infecciones sintomáticas DENV2/DENV-3 (n=2) y DENV-3/DENV-4 (n=1).

Figura 1. Serotipos de DENV en las infecciones asintomáticas y sintomáticas



Una vez obtenida la caracterización de las muestras de los grupos de interés se realizó la determinación de los SNPs, y a partir de las frecuencias identificadas, se procedió a realizar el cálculo del odds ratio (OR) para identificar la asociación entre la presencia del SNP con riesgo a la infección por virus dengue o la severidad de la misma.

6.4. Cálculo del equilibrio de Hardy Weinberg

El primer paso para desarrollar el análisis de los SNPs comprendió la evaluación de las frecuencias genotípicas del grupo control y establecer si esta población cumple con el principio de equilibrio de Hardy Weinberg en los tres genes propuestos (105). El cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg para los tres SNPs presentó un valor de $p > 0.05$, con un valor de χ^2 (X^2) menor de 3.84 (Tabla 9). Los valores obtenidos indicaron que la población se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg, es decir, que la población seleccionada es panmíctica, suficientemente grande y no sometida a migración, mutación, deriva génica o selección, y que las frecuencias genotípicas se mantienen constantes de generación en generación.

Tabla 9. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Polimorfismo	Grupo Control n=37 n (%)	Chi ²	p
DC-SIGN (rs4804803)			
A/A	25 (67.6)	1.39	0.239
A/G	12 (32.4)		
G/G	-		
FcγRIIa (rs1801274)			
G/G	12 (32.4)	0.62	0.431
A/G	16 (43.2)		
A/A	9 (24.3)		
TNFα (rs 1800629)			
G/G	31 (83.8)	0.29	0.591
G/A	6 (16.2)		
A/A	-		
Valor p y de Chi ² en la prueba de equilibrio de Hardy-Weingberg para los SNPs.			

A partir de los resultados del equilibrio, se hizo el análisis de las frecuencias genotípicas y frecuencias alélicas en cada uno de los grupos.

6.5. Frecuencias genotípicas de los SNPs en los grupos de interés

6.5.1. Frecuencia genotípica del SNP DC-SIGN (rs4804803)

La frecuencia del polimorfismo rs4804803 del gen *CD209* (19p13.3), que codifica para el receptor DC-SIGN, presentó una frecuencia del genotipo heterocigoto de 32.4% en el grupo control, 30.4% en el grupo de infecciones asintomáticas y 21.8% en infecciones sintomáticas, ningún individuo presentó el genotipo homocigoto para el polimorfismo en el grupo control. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas que sugieran

una asociación de este SNP con riesgo o protección ante la infección o la enfermedad (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución genotípica del SNP DC-SIGN (rs4804803)

Genotipo	Grupo Control n=37	Infección Asintomática n=138	Infección Sintomática n=55	Infecciones vs. Control		Asintomática vs. Control		Sintomática vs. Control		Sintomática vs. Asintomática		p^a
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	
AA	25 (67.6)	91 (65.9)	40 (72.7)	0.99 (0.46-2.09)	0.971	1.08 (0.50-2.33)	0.853	0.78 (0.31-1.94)	0.594	0.73 (0.36-1.45)	0.362	0.491
AG	12 (32.4)	42 (30.4)	12 (21.8)									
GG	0	5 (3.6)	3 (5.5)									

a Valor p Chi2 gl=1 Comparación de los tres grupos Se compararon los genotipos GG y AG vs AA Infecciones: Suma del grupo de infecciones asintomáticas y sintomáticas

6.5.2. Frecuencia genotípica del SNP FcγRIIa (rs1801274)

El SNP rs1801274 origina una sustitución no sinónima en el residuo 131 del receptor FcγRIIa, este SNP presentó una frecuencia del genotipo WT mayor en el grupo de infecciones asintomáticas (60.9%), comparado con el grupo control (32.4%) y el grupo de infecciones sintomáticas (41.8%). En el grupo control se evidenció una frecuencia mayor del genotipo heterocigoto (43.2%) comparado tanto con el grupo de infecciones asintomáticas como sintomáticas. En infecciones sintomáticas se presentó el mayor porcentaje (27.3%) de homocigotos para el polimorfismo. Cuando se realizó la comparación de los tres grupos se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p=0.005$), y posteriormente se realizó el cálculo del OR para identificar las diferencias entre los grupos, comparando los individuos heterocigotos (A/G) y homocigotos para el polimorfismo (A/A) con los homocigotos WT (A/A) (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución genotípica del SNP FcγRIIa (rs1801274)

Genotipo	Grupo Control n=37	Infección Asintomática n=138	Infección Sintomática n=55	Infecciones vs. Control		Asintomática vs. Control		Sintomática vs. Control		Sintomática vs. Asintomática		p^a
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	
RR	12 (32.4)	84 (60.9)	23 (41.8)	0.39 (0.18-0.81)	0.010	0.31 (0.14-0.67)	0.002	0.68 (0.28-1.6)	0.363	2.16 (1.15-4.09)	0.016	0.005
RH	16 (43.2)	25 (18.1)	17 (30.9)									
HH	9 (24.3)	29 (21.0)	15 (27.3)									

a Valor p Chi2 gl=1 Comparación de los tres grupos Se compararon los genotipos RR y RH vs HH Infecciones: Suma del grupo de infecciones asintomáticas y sintomáticas

Al comparar la presencia del polimorfismo en las infecciones (asintomáticas + sintomáticas) respecto al grupo control, este fue identificado como factor protector OR=0.39 ($p=0,010$). Esta tendencia se mantuvo al comparar las infecciones asintomáticas respecto al grupo control, con un valor de OR=0.31 ($p=0,002$). Adicionalmente, este SNP se asoció como factor de riesgo a la presentación de síntomas (OR=2.16, $p=0,016$) (tabla 11).

6.5.3. Frecuencia genotípica del SNP TNF- α (rs1800629)

La frecuencia de este SNP fue mayor en el grupo de infecciones tanto asintomáticas (47.1%) como sintomáticas (36.3%), comparadas con el grupo control (16.2%), encontrándose el genotipo homocigoto para el polimorfismo (A/A) en un individuo con infección sintomática. Al realizar la comparación de los tres grupos se obtuvo un valor estadísticamente significativo ($p=0.004$), lo cual sugiere una diferencia en la distribución de los datos en los grupos. Esta diferencia se conservó al comparar las infecciones (sintomáticas + asintomáticas) respecto al control OR=4.07 $p=0.002$, y cuando se compararon de manera independiente respecto al control (asintomáticas OR=4.60, $p=0.001$ y sintomáticas OR=2.95, $p=0.035$) (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución genotípica del SNP TNF- α (rs1800629)

Genotipo	Grupo Control n=37	Infección Asintomática n=138	Infección Sintomática n=55	Infecciones vs. Control		Asintomática vs. Control		Sintomática vs. Control		Sintomática vs. Asintomática		p^a
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	
GG	31 (83.8)	73 (52.9)	35 (63.6)									
AG	6 (16.2)	65 (47.1)	19 (34.5)	4.07 (1.62-10.2)	0.002	4.60 (1.80-11.73)	0.001	2.95 (1.05-8.29)	0.035	0.64 (0.34-1.22)	0.175	0.004
AA	0	0	1 (1.8)									

a Valor p Chi2 gl=1. Comparación de los tres grupos Se compararon los genotipos AA y AG vs GG Infecciones: Suma del grupo de infecciones asintomáticas y sintomáticas

6.6. Frecuencias alélicas de los SNPs

Los SNPs DC-SIGN (rs4804803), Fc γ R11a (rs1801274) y TNF- α (rs1800629) están ubicados en los cromosomas autosómicos 19, 1 y 6 respectivamente, por lo que cada individuo es portador de dos alelos, uno correspondiente a la copia heredada de la madre y una copia del padre (105). Por lo anterior, el número de alelos WT se obtuvo de la multiplicación por dos de los individuos homocigotos WT, y la suma de los heterocigotos, este proceso se realizó de forma similar para obtener el alelo polimórfico.

6.6.1. Frecuencia alélica de SNP DC-SIGN (rs4804803)

La frecuencia del alelo polimórfico (G) observada en el grupo control fue de 32.4%, y se identificaron frecuencias similares en los grupos de infecciones asintomáticas (34%) y sintomáticas (27.3%). El valor de OR y el valor de p obtenido al comparar los grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas que indiquen la asociación entre SNP con la susceptibilidad o protección a la infección.

Tabla 13. Distribución alélica del SNP DC-SIGN (rs4804803)

Alelo	Grupo Control n=74	Infección Asintomática n=276	Infección Sintomática n=110	Infecciones vs. Control		Asintomática vs. Control		Sintomática vs. Control		Sintomática vs. Asintomática		p^a
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	
A	50(67.6)	182(66)	80(72.7)	0.99 (0.58-1.68)	0.959	1.08(0.62-1.86)	0.793	0.78(0.41-1.49)	0.451	0.73(0.45-1.18)	0.198	0.436
G	24(32.4)	94(34)	30(27.3)									

a Valor p Chi2 gl=1 Comparación de los tres grupos Infecciones: Suma del grupo de infecciones asintomáticas y sintomáticas

6.6.2. Frecuencia alélica de SNP FcγRIIa (rs1801274)

El alelo G (WT) presentó una frecuencia mayor en el grupo de infecciones asintomáticas (70%), respecto al grupo de infecciones sintomáticas (57.3%) y del grupo control (54%). La presencia del alelo (A) se asoció a protección ante las infecciones asintomáticas ($OR=0.51$, $p=0.010$), sin embargo, este mismo se identificó como factor de riesgo para la presencia de sintomatología ($OR=1.73$, $p=0.018$).

Tabla 14. Distribución alélica del SNP FcγRIIa (rs1801274)

Alelo	Grupo Control n=74	Infección Asintomática n=276	Infección Sintomática n=110	Infecciones vs. Control		Asintomática vs. Control		Sintomática vs. Control		Sintomática vs. Asintomática		p^a
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	
R	40 (54)	193 (70)	63 (57.3)	0.6 (0.36-0.99)	0.044	0.51(0.30-0.85)	0.010	0.88(0.49-1.59)	0.666	1.73(1.10-2.74)	0.018	0.008
H	34 (46)	83 (30)	47 (42.7)									

a Valor p Chi2 gl=1 Comparación de los tres grupos Infecciones: Suma del grupo de infecciones asintomáticas y sintomáticas

6.6.3. Frecuencia alélica de SNP TNF- α (rs1800629)

La frecuencia en la distribución del alelo WT fue superior en el grupo control (83.8%), comparado con las infecciones asintomáticas (52.9%) y sintomáticas (63.6%). El análisis mostró que el alelo A se asoció como factor de riesgo ante la infección, al comparar las infecciones respecto al grupo control obteniendo un valor de $OR=4.07$ ($p<0.0001$). Esta asociación se mantuvo cuando se comparó tanto el grupo de las infecciones asintomáticas como sintomáticas con el grupo control obteniendo un valor de $OR=4.69$ ($p<0.0001$) y $OR=2.95$ ($p=0.003$). No se evidenció asociación cuando se comparó el grupo de infección sintomática respecto a las infecciones sintomáticas.

Tabla 15. Distribución alélica del SNP TNF- α (rs1800629)

Alelo	Grupo Control n=74	Infección Asintomática n=276	Infección Sintomática n=110	Infecciones vs. Control		Asintomática vs. Control		Sintomática vs. Control		Sintomática vs. Asintomática		p^a
	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	OR (95%CI)	p	
G	62 (83.8)	146 (52.9)	70 (63.6)	4.07 (2.12-7.79)	0.000	4.60(2.37-8.92)	0.000	2.95(1.42-6.13)	0.003	0.64 (0.41-1.01)	0.055	0.003
A	12 (16.2)	130 (47.1)	40 (36.4)									

a Valor p Chi2 gl=1. Comparación de los tres grupos Infecciones: Suma del grupo de infecciones asintomáticas y sintomáticas

Los SNPs identificados en este estudio han sido previamente asociados con la severidad de la infección, por lo anterior, en el presente estudio se analizó la frecuencia fenotípica y alélica para los polimorfismos, teniendo en cuenta la clasificación de la severidad de la enfermedad.

6.7. SNPs en las infecciones sintomáticas

El grupo de individuos con infección sintomática está integrado por 7 casos de DG y 48 casos de DCSA, el 100% de los casos de DG corresponden a infecciones secundarias y en el caso de DCSA el 6.3% presentó infecciones primarias y el porcentaje restante infecciones secundarias. Teniendo presente la diferencia numérica entre los grupos, se comparó la presencia del SNP con las formas clínicas de la infección, con el fin de identificar la asociación del polimorfismo con la severidad de la enfermedad.

6.7.1. SNP en el receptor DC-SIGN (rs4804803) en infecciones sintomáticas

En los casos de DCSA se encontró con mayor frecuencia individuos heterocigotos (22.9%) comparado con los individuos con DG (14.3%). No se encontró asociación entre la presencia del polimorfismo y la severidad de la enfermedad.

Tabla 16. Distribución genotípica del SNP DC-SIGN (rs4804803)

Genotipo	Grupo Control n=37	Infección Asintomática n=138	Infección Sintomática		DCSA vs. Control		DG vs. Control		DG vs. DCSA		DCSA vs. Asintomático		DG vs. Asintomático	
			DCSA n=48	DG n=7										
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p
AA	25 (67.6)	91 (65.9)	34 (70.8)	6 (85.7)	0.86 (0.34-2.17)	0.746	0.35 (0.04-3.22)	0.335	0.30 (0.03 - 2.74)	0.266	0.8 (0.39-1.63)	0.534	0.32 (0.04-2.76)	0.278
AG	12 (32.4)	42 (30.4)	11 (22.9)	1 (14.3)										
GG	0	5 (3.6)	3 (6.3)	0										

DCSA: Dengue con signos de alarma

DG: Dengue grave

Las comparaciones se hicieron basadas en GA y GG vs AA

La distribución de los alelos mostró un comportamiento similar a la frecuencia genotípica, sin embargo, al realizar las comparaciones entre DCSA respecto al grupo control y el grupo de asintomáticos se evidenció la presencia del SNP como un factor protector ante la infección y la presencia de sintomatología con valores de OR=0.45 ($p=0.026$) y OR=0.42 ($p=0.003$), respectivamente.

Tabla 17. Distribución alélica del SNP DC-SIGN (rs4804803)

Alelo	Grupo Control n=37	Infección Asintomática n=138	Infección Sintomática		DCSA vs. Control		DG vs. Control		DG vs. DCSA		DCSA vs. Asintomático		DG vs. Asintomático	
			DCSA n=48	DG n=7										
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p
A	50(67.6)	182(66)	79 (82.3)	13 (92.9)	0.45 (0.22-0.92)	0.026	0.16 (0.02-1.30)	0.054	0.36 (0.04-2.92)	0.318	0.42 (0.23-0.74)	0.003	0.15 (0.02-1.16)	0.036
G	24(32.4)	94(34)	17 (17.7)	1 (7.1)										

DCSA: Dengue con signos de alarma

DG: Dengue grave

6.7.2. SNP del receptor FcγRIIa (rs1801274) en infecciones sintomáticas

Los casos de DCSA tuvieron una mayor frecuencia del genotipo homocigoto WT con un 45.8%, a diferencia del 14.3% encontrado en los casos de DG. Al comparar los casos de DG respecto al grupo de asintomáticos se encontró la presencia del alelo A como factor de riesgo OR=9.33, $p=0.015$.

Tabla 18. Distribución genotípica del SNP FcγRIIa (rs1801274)

Genotipo	Grupo Control n=37	Infección Asintomática n=138	Infección Sintomática		DCSA vs. Control		DG vs. Control		DG vs. DCSA		DCSA vs. Asintomático		DG vs. Asintomático	
			DCSA n=48	DG n=7										
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p
RR	12 (32.4)	84 (60.9)	22 (45.8)	1 (14.3)	0.57 (0.23-1.38)	0.211	2.88 (0.31-26.68)	0.335	5.08 (0.57 - 45.45)	0.114	1.84 (0.95-3.57)	0.070	9.33 (1.09-79.68)	0.015
RH	16 (43.2)	25 (18.1)	12 (25.0)	5 (71.4)										
HH	9 (24.3)	29 (21.0)	14 (29.2)	1 (14.3)										

DCSA: Dengue con signos de alarma

DG: Dengue grave

Las comparaciones se hicieron basadas en RH y HH vs RR

La caracterización alélica identificó la presencia del alelo polimórfico como un factor de riesgo, con un OR=1.66 ($p=0.038$), al comparar los casos de DCSA respecto al grupo de asintomáticos.

Tabla 19. Distribución alélica del SNP FcγRIIa (rs1801274)

Alelo	Grupo Control n=37	Infección Asintomática n=138	Infección Sintomática		DCSA vs. Control		DG vs. Control		DG vs. DCSA		DCSA vs. Asintomático		DG vs. Asintomático	
			DCSA n=48	DG n=7										
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p
R	40 (54)	193 (70)	56 (58.3)	7 (50.0)	0.84 (0.46-1.55)	0.577	1.18 (0.38-3.69)	0.780	1.4 (0.46-4.31)	0.556	1.66 (1.03-2.69)	0.038	2.33 (0.79-6.84)	0.116
H	34 (46)	83 (30)	40 (41.7)	7 (50.0)										

DCSA: Dengue con signos de alarma

DG: Dengue grave

6.7.3. SNP TNF-α (rs1800629) en infecciones sintomáticas

Los homocigotos WT para este polimorfismo se presentaron con mayor frecuencia en el grupo de casos de DCSA (64.6%), comparado con los casos de DG (57.1%). La presencia del SNP no se encontró asociada como factor de riesgo o protección a la severidad de la enfermedad.

Tabla 20. Distribución genotípica del SNP TNF- α (rs1800629)

Genotipo	Grupo Control n=37	Infección Asintomática n=138	Infección Sintomática		DCSA vs. Control		DG vs. Control		DG vs. DCSA		DSA vs. Asintomático		DG vs. Asintomático	
			DCSA n=48	DG n=7										
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	
GG	31 (83.8)	73 (52.9)	31 (64.6)	4 (57.1)	2.83 (0.99-8.14)	0.048	3.88 (0.68-21.93)	0.109	1.37 (0.27-6.84)	0.702	0.62 (0.31-1.21)	0.160	0.84 (0.18-3.90)	0.826
AG	6 (16.2)	65 (47.1)	17 (35.4)	2 (28.6)										
AA	0	0	1 (14.3)	1 (14.3)										
DCSA: Dengue con signos de alarma			DG: Dengue grave		Las comparaciones se hicieron basadas en GA v GG vs AA									

En los casos de DG (28.6%), se observó una frecuencia superior del alelo A comparado con los casos de DCSA (17.7%), adicionalmente, se identificó la presencia del alelo A como un factor protector en el grupo de DCSA respecto al control.

Tabla 21. Distribución alélica del SNP TNF- α (rs1800629)

Alelo	Grupo Control n=37	Infección Asintomática n=138	Infección Sintomática		DCSA vs. Control		DG vs. Control		DG vs. DCSA		DCSA vs. Asintomático		DG vs. Asintomático	
			DCSA n=48	DG n=7										
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p		
R	40 (54)	193 (70)	56 (58.3)	7 (50.0)	0.84 (0.46-1.55)	0.577	1.18 (0.38-3.69)	0.780	1.4 (0.46-4.31)	0.556	1.66 (1.03-2.69)	0.038	2.33 (0.79-6.84)	0.116
H	34 (46)	83 (30)	40 (41.7)	7 (50.0)										
DCSA: Dengue con signos de alarma DG: Dengue grave														

6.8. Combinaciones genotípicas presentes en los grupos de estudio

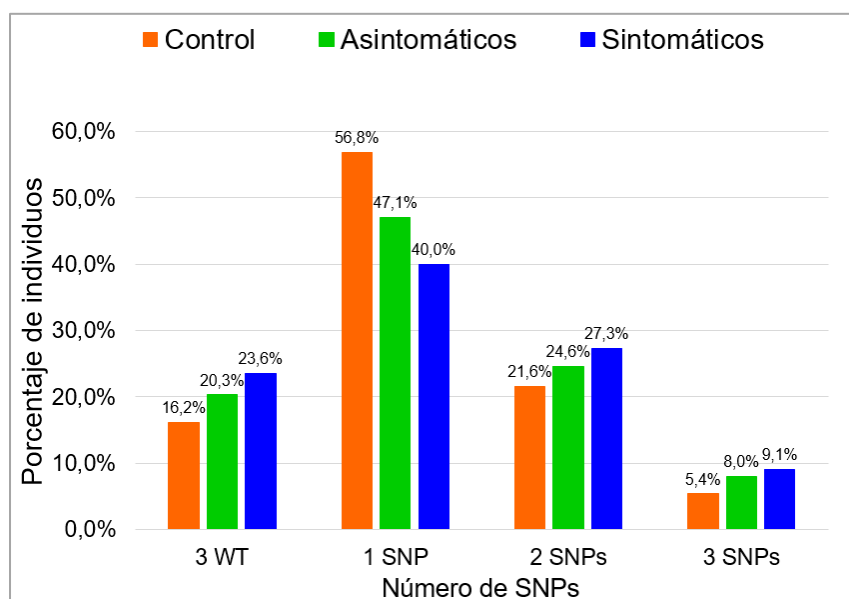
En el momento de establecer las combinaciones genotípicas de los tres SNPs, se identificaron 24 combinaciones posibles, de las cuales se encontraron 17 en las muestras analizadas. A continuación, se presentan cada una de las combinaciones y las frecuencias de las mismas en cada uno de los grupos de interés (tabla 22). En el grupo control se encontraron 9 combinaciones, mientras que en las infecciones asintomáticas e infecciones sintomáticas se identificaron 15 y 16 combinaciones, respectivamente.

Tabla 22. Combinaciones genotípicas en los grupos de interés

#	Combinación genotípica			Grupo control		Infección Asintomática		Infección Sintomática		Total
				n=37		n=138		n=55		
	DC-SIGN (rs4804803)	FcγRIIIa (rs1801274)	TNF-α (rs1800629)	n	%	n	%	n	%	
1	A/A	G/G	G/G	6	16,2	28	20,3	13	23,6	47
2	A/A	G/A	G/G	11	29,7	9	6,5	9	16,4	29
3	A/A	A/A	G/G	4	10,8	12	8,7	5	9,1	21
4	A/G	G/G	G/G	4	10,8	17	12,3	2	3,6	23
5	A/G	G/A	G/G	3	8,1	3	2,2	3	5,5	9
6	A/G	A/A	G/G	3	8,1	3	2,2	1	1,8	7
7	G/G	G/G	G/G	0	0,0	1	0,7	1	1,8	2
8	G/G	A/A	G/G	0	0,0	0	0,0	1	1,8	1
9	A/A	G/G	A/G	2	5,4	26	18,8	5	9,1	33
10	A/A	G/A	A/G	2	5,4	8	5,8	2	3,6	12
11	A/A	A/A	A/G	0	0,0	8	5,8	5	9,1	13
12	A/G	G/G	A/G	0	0,0	12	8,7	2	3,6	14
13	A/G	G/A	A/G	0	0,0	4	2,9	2	3,6	6
14	A/G	A/A	A/G	2	5,4	3	2,2	2	3,6	7
15	G/G	G/A	A/G	0	0,0	1	0,7	0	0,0	1
16	G/G	A/A	A/G	0	0,0	3	2,2	1	1,8	4
17	A/A	G/A	A/A	0	0,0	0	0,0	1	1,8	1

De las combinaciones genotípicas encontradas, el 60% de los individuos de cada uno de los grupos se concentran en 4 o 5 de ellas. En la figura 2 se muestra el porcentaje de individuos de cada uno de los grupos que presentan los tres genotipos WT, uno, dos o los tres SNPs. Aunque los porcentajes obtenidos son similares en cada una de las combinaciones, se encontró que el grupo control presentó mayor frecuencia de un SNP, mientras que los grupos de infección tanto asintomática como sintomática presentaron simultáneamente dos o tres SNPs.

Figura 2. Número de SNPs en las combinaciones genotípicas



Las combinaciones genotípicas en las que se presentaron dos o tres de los SNPs, se compararon en los diferentes grupos de estudio, encontrando que la presencia del polimorfismo en DC-SIGN y FcγRIIa son protectores ante la infección por DENV (OR=0.21, $p=0.028$). Por el contrario, se encontró que la presencia de los polimorfismos en DC-SIGN y TNF- α como factor de riesgo al analizar el grupo de infecciones sintomáticas respecto a las asintomáticas (OR=12.92, $p=0.0005$).

Tabla 23. Comparación de las combinaciones genotípicas

Combinación genotípica	Infecciones vs. Controles		Asintomáticos vs. Control		Sintomáticos vs. Control		Sintomáticos vs. Asintomáticos	
	OR	p	OR	p	OR	p	OR	p
DC-SIGN - FcγRIIa	0.27 (0.07-1.00)	0.0414	0.21 (0.05-0.9)	0.0282	0.38 (0.08-1.78)	0.2159	1.8 (0.46-7)	0.3948
DC-SIGN - TNF-α							12.92 (2.52-66.29)	0.0005
FcγRIIa - TNF-α	1.76 (0.33-9.4)	0.5063	1.71 (0.31-9.52)	0.5343	1.85 (0.3-11.47)	0.5073	1.08 (0.37-3.15)	0.8924
DC-SIGN-FcγRIIa-TNF-α	1.17 (0.21-6.42)	0.8558	1.18 (0.21-6.75)	0.8535	1.15 (0.17-7.74)	0.8828	0.98 (0.28-3.4)	0.9734

Las comparaciones se hicieron basadas en homocigotos para el polimorfismo y heterocigotos vs homocigotos WT

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se analizaron muestras de niños entre 4 y 14 años procedentes de tres municipios del departamento de Cundinamarca con circulación activa de virus dengue, las cuales fueron clasificadas en tres grupos de estudio: un grupo control, un grupo de infecciones asintomáticas y uno de infecciones sintomáticas. La mayoría de los estudios publicados sobre el análisis de los polimorfismos se han centrado en grupos de pacientes clasificados de acuerdo a los criterios de la OMS en 1997. Una parte de ellos compara la presencia del polimorfismo entre los pacientes con fiebre de dengue (FD) y aquellos con fiebre hemorrágica por dengue (FHD), y los restantes evalúan estos polimorfismos en pacientes con síndrome de choque por dengue (SSD) y los comparan respecto a un grupo control (40,46,106).

Sin embargo, la selección y caracterización de los individuos pertenecientes al grupo control presentan variaciones en las investigaciones realizadas, en algunas de estas involucran individuos sanos residentes en el área de estudio o pertenecientes a un área geográfica diferente, sin tener en cuenta su caracterización serológica (34,45,86,107). El inconveniente en este tipo de controles, es la posible inclusión de individuos con infecciones asintomáticas, las cuales presentan una alta frecuencia en zonas endémicas con transmisión activa del virus, que puede estar influenciada por la evaluación de estos parámetros. En otros estudios, las muestras del grupo control provienen de pacientes con sintomatología clínica similar a dengue pero con diagnóstico negativo para la infección, o de pacientes hospitalizados sin sospecha de dengue, que son utilizados para establecer las comparaciones relacionadas con la presentación clínica o de la severidad de la enfermedad (56,58,64,108).

La comparación de los individuos con dengue con pacientes que presentan sintomatología clínica similar puede influir en la interpretación y formulación de las asociaciones, debido a que los SNPs también se han asociado a severidad de otras patologías. Por lo anterior, si el grupo control está integrado por individuos que presentan antecedentes de enfermedades o patologías en los que se ha asociado la presencia del SNP como factor de riesgo a esta, en un segundo análisis será difícil establecer si la presencia del SNP puede comportarse como un factor de riesgo ante la infección, o si la severidad está determinada por la presencia de una enfermedad de base.

La selección del grupo control es importante, debido a que este debe cumplir dos requisitos: el primero, los controles deben estar compuestos por individuos que se encuentren libres de la enfermedad, y el segundo, los individuos de este grupo deben pertenecer a la misma población para controlar que se encuentren expuestos a los mismos factores de riesgo a los que se encuentra expuesto el grupo de casos, por lo anterior, es recomendable que sean de la misma región geográfica (109).

Estudios realizados en Brasil e India incluyeron en el grupo control, individuos sin manifestaciones clínicas, residentes en la misma zona endémica, a quienes se les realizó una prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgM y/o anticuerpos IgG específicos contra dengue, y en los que se encontró una seroprevalencia superior al 50% para IgG (37,38,55,110). Considerar dentro del grupo control población con antecedente de infección por DENV constituye un sesgo de selección que puede afectar la determinación de la asociación, debido a la ausencia de información sobre las características clínicas y/o de la severidad de la enfermedad presentada por estos individuos en las infecciones previas.

Por ejemplo, el estudio de Wang et al., la seroprevalencia identificada en los individuos del grupo control fue de 1.7%, menor a la observada en los individuos con diagnóstico de dengue. Lo anterior se explica por la zona geográfica de procedencia de los controles, la cual difiere de la zona de residencia de los casos, que los convierten en una población con menor riesgo de desarrollar la infección (51). De forma similar en un estudio realizado en Malasia en el año 2015, evaluó dentro del grupo control individuos con resultado negativo para la prueba de ELISA IgG, sin embargo, este grupo no era residente de la zona, por lo cual incumplían la segunda condición (75).

Teniendo en cuenta la alta seroprevalencia de dengue en Colombia reportada en estudios previos (111–113), fue necesario establecer unos criterios de selección específicos para el grupo control. Por lo anterior, el grupo control del presente estudio se integró por individuos sanos residentes en tres municipios endémicos del departamento de Cundinamarca, sin antecedente de infección por virus dengue demostrado a través de la ausencia de anticuerpos IgG.

En relación a las infecciones asintomáticas, se debe considerar que estas pueden presentarse en dos situaciones: la primera está expresada por la respuesta inmunológica

condicionada a características genéticas, y la segunda por la inmunidad adquirida ante una infección previa con el virus. En este trabajo se identificó que más del 70% de las infecciones de este grupo cursaban como infecciones secundarias (ELISA IgG Captura positivos), lo cual puede indicar que el curso asintomático de la infección corresponde a una exposición al mismo serotipo causante de la primoinfección, considerando el curso asintomático normal.

Por otro lado, en las infecciones sintomáticas se observó un alto porcentaje de muestras positivas en la prueba de ELISA IgM (80%), las cuales en su mayoría se caracterizaron como infecciones secundarias. Lo anterior sugiere la sensibilidad de la prueba de ELISA IgM en este grupo mostró alta sensibilidad, a pesar de que el nivel de estos anticuerpos en las infecciones secundarias es menor respecto a las infecciones primarias, lo cual se ha presentado previamente con una limitación en la sensibilidad de esta prueba

Un hallazgo importante de la caracterización de la población de estudio corresponde al comportamiento de la prueba de ELISA NS1. El 100% de las muestras de los individuos asintomáticos en las que se les detectó anticuerpos y ARN de DENV no se les identificó la proteína, mientras que en el grupo de individuos sintomáticos esta prueba a pesar de tener menor sensibilidad que la RT-PCR, permitió realizar la confirmación de un porcentaje significativo de los casos. Adicionalmente el análisis de los serotipos identificados mostró que, en los grupos de infección sintomática y asintomática, virus que presentó mayor frecuencia fue el serotipo 2, lo cual sugiere que la circulación de este serotipo se manifestó en los municipios durante el período de estudio. Este resultado se correlaciona con los resultados del estudio de Castellanos *et al*, realizado en población residente en el pacífico colombiano, en el cual este serotipo se presentó con mayor frecuencia en las infecciones asintomáticas identificadas, así como la circulación de este serotipo en el país reportada por el INS en 2014 (17,113).

Los SNPs de DC-SIGN (rs4804803), FcγRIIIa (rs1801274) y TNF-α (rs1800629), han sido previamente evaluados en pacientes con dengue clasificados dentro de los grupos de severidad propuestos por la OMS en 1997, es decir, fiebre de dengue (FD), fiebre hemorrágica por dengue (FHD) y síndrome de choque por dengue (SCD) (114). Para el presente estudio, la clasificación de los casos se basó en los criterios sugeridos por la OMS en 2009, que determinan tres grupos de severidad: dengue sin signos de alarma (DSSA),

dengue con signos de alarma (DCSA) y dengue grave (DG), pero teniendo en cuenta solo casos confirmados por pruebas serológicas o virológicas (3).

Polimorfismo en el receptor DC-SIGN

En este estudio, la frecuencia de los genotipos wild type (WT), heterocigoto y homocigoto para el polimorfismo del receptor DC-SIGN (rs4804803), mostró la siguiente distribución: 67.6%, 32.4% y 0% en el grupo control, de 65.9%, 30.4% y 3.6% en las infecciones asintomáticas y 72.7%, 21.8% y 5.5% en las infecciones sintomáticas. Estas frecuencias son similares a las reportadas en Colombia en el año 2006 por Gómez et al, quienes describieron que la presencia del SNP no se encuentra asociada con tuberculosis (TB), la frecuencia identificada del genotipo WT en el grupo control fue de 65.2%, del genotipo heterocigoto de 31.4% y del homocigoto para el polimorfismo de 3.3%, mientras que en el grupo de pacientes las frecuencias encontradas fueron de 58.2%, 36.4% y 5.5%, respectivamente (89).

En relación a la distribución alélica para este gen, se observó la presencia del alelo polimórfico en el 32.2% del total de la población analizada en el presente estudio, el 32.4% en el grupo control, el 34% en las infecciones asintomáticas y 27.3% en las infecciones sintomáticas. En los tres grupos el porcentaje identificado es superior al reportado en la página de "1000 Genomes Browser", en el que se registra una frecuencia alélica para este SNP de 17% en población de Medellín, Colombia (115). El estudio realizado en Antioquia que evaluó la asociación del SNP con la susceptibilidad a tuberculosis, encontró una frecuencia del alelo de 19.1% grupo control y 23.7% en los pacientes con tuberculosis(89).

En el presente estudio no se encontró asociación entre la presencia del polimorfismo y la susceptibilidad a la infección asintomática o sintomática, sin embargo, se evidenció la presencia del alelo G, como un factor protector al comparar los grupos de DCSA y de DG respecto al grupo control, obteniendo valores de $OR=0.45$ ($IC95\%= 0.22 - 0.92$, $p=0.026$) y $OR= 0.16$ ($IC95\%= 0.02 - 1.30$, $p=0.054$) respectivamente. Asimismo, al comparar el grupo de DCSA respecto al grupo de infecciones asintomáticas se identificó como factor protector ($OR=0.42$, $IC95\%= 0.23 - 0.74$, $p=0.003$). Estos resultados difieren de los reportados en los estudios realizados en Tailandia, Taiwán, Brasil y México, en los que asocian la presencia del SNP con severidad a la infección (38,51,56,57).

Esta situación es similar a la reportada por otros autores evaluando población realizados previamente en población de Honduras, Brasil, Tailandia e India no evidencian asociación con la severidad a la infección (37,39,40,106). Sin embargo, un estudio publicado en el año 2013 por Xavier-Carvalho, *et al*, en población brasilera reportó una asociación de la presencia del polimorfismo como un factor protector. Adicionalmente, esta investigación analizó sus resultados con los reportados en diferentes trabajos en los que también se ha evaluado la presencia del polimorfismo. Los autores destacan que en población asiática el alelo G puede estar asociado a severidad y a protección en población brasilera, lo cual indica que las subpoblaciones pueden tener presiones selectivas en diferentes regiones geográficas que moldean la genética humana y por tanto los mecanismos de activación de la respuesta inmune para el control de la infección (55).

Polimorfismo en el receptor FcγRIIa

El SNP no sinónimo en la secuencia que codifica el receptor FcγRIIa (rs1801274), evidencia una frecuencia superior del genotipo homocigoto para el polimorfismo en el grupo de infecciones sintomáticas (27.3%). En el país no existen publicaciones relacionadas con la presencia de este SNP y la susceptibilidad o protección a una enfermedad determinada. En este trabajo la frecuencia del alelo polimórfico identificada para este SNP fue de 35.7%, similar la frecuencia reportada en la base de 1000 genomas de 39.4% en población del departamento de Antioquia (115).

El presente estudio evidenció una asociación del polimorfismo con protección, cuando se realizaron las comparaciones entre la infección asintomática y el grupo control ($OR=0.31$, $p=0.002$), lo cual sugiere que la presencia del polimorfismo es protectora ante el desarrollo de la infección. Un estudio realizado en población mexicana asoció el SNP a protección cuando compararon el grupo de infecciones sintomáticas respecto a las asintomáticas ($OR=0.51$, $IC_{95\%} 0.30 - 0.99$, $p=0.038$) (57). Contrario al hallazgo en México, Mohsin SN *et al*, asociaron en población de Pakistán la presencia del polimorfismo con riesgo cuando compararon los mismos grupos de infección con un $OR=3.9$ y un $IC_{95\%}= 1.13 - 13.37$ ($p=0.024$). Por otro lado, en Honduras se reportó una asociación de riesgo cuando compararon el genotipo heterocigoto en FDH respecto a FD (40,116). El estudio de este polimorfismo en diferentes investigaciones realizadas en población cubana han encontrado

asociación entre la presencia del alelo A con la sintomatología clínica y la persistencia de la misma, mientras que un estudio en Vietnam sugiere la presencia del genotipo WT como factor protector (64,67–70).

Polimorfismo de TNF- α

La distribución del polimorfismo en TNF- α (rs1800629) en el grupo control muestra la presencia del genotipo heterocigoto en el 16.2%, similar al porcentaje reportado en el estudio de Garavito *et al* publicado en el año 2016, quienes encontraron una frecuencia de 33.3% y 15.2% del genotipo heterocigoto en los dos grupos control analizados para identificar la asociación de este SNP con nefritis lúpica, la distribución del alelo polimórfico en esos grupos control fue de 16.6% y 7.6%, similar a la encontrada en el presente estudio (12.1%) (81).

La frecuencia del alelo polimórfico registrada en “1000 Genomes Browser” es de 6.95%, inferior a la frecuencia encontrada en el grupo control (12.1%) de este estudio como la frecuencia identificada en los grupos de infección asintomática (47.1%) como sintomática (36.4%). Otros estudios realizados Colombia, en individuos residentes en Bucaramanga, Tunja, Barranquilla, Santa Marta, Antioquia y Tumaco, en los que evaluó la posible asociación del este SNP con periodontitis apical aguda y crónica no supurativa, enfermedad gastroduodenal, sepsis y leishmaniasis, muestran frecuencias del polimorfismo inferiores a las encontradas en este estudio. Sin embargo, estas investigaciones no incluyen la evaluación de un grupo control, sino que establecen la determinación de la presencia del SNP en grupos de individuos con diferentes grados de la enfermedad o de la infección que se esté analizando (80,117,83,82).

En este estudio la presencia del genotipo heterocigoto para TNF- α (rs1800629) se encontró en mayor frecuencia en los individuos con infección tanto sintomática (34.5%) como asintomática (47.1%), comparada con el grupo control (16.2%), con un OR=4.60 (IC95%= 2.37-8.92, $p=0.001$) y OR=2.95 (IC95%=1.42-6.13, $p=0.035$), respectivamente. Las frecuencias alélicas presentaron un comportamiento similar, y se identificó asociación de la presencia del SNP como factor de riesgo ante la infección. De forma similar, estudios reportan la asociación del SNP con severidad de la infección en Venezuela al comparar FD y FHD y en Tailandia al comparar casos de dengue y fiebres no dengue (46,84).

Sin embargo, cuando se comparó el grupo de DCSA con el grupo de asintomáticos se evidenció como un factor protector con un valor de $OR=0.24$ ($p<0.0001$), esta relación concuerda con lo reportado en un estudio en Malasia, en el cual se identificó una asociación protectora al comparar FDH y SSD, en este estudio el grupo control estaba compuesto por individuos con resultado negativo para IgG (75).

Contrario a los hallazgos mencionados anteriormente, los estudios realizados en Vietnam, Tailandia y México, no han encontrado asociación del polimorfismo con la severidad a la infección por DENV. Sin embargo, en estos estudios no se realizó la caracterización serológica o molecular del grupo control, con el fin de confirmar o descartar una infección actual o un antecedente de la misma (45,64,86). En estos trabajos a pesar los individuos del grupo control no presentan la enfermedad, es posible que estén cursando con una infección asintomática, lo que podría influir en el análisis de los resultados y en la interpretación de los mismos, una dificultad que fue eliminada en nuestros grupos.

En el caso de los dos estudios realizados en India, en el que no se identificó asociación, el grupo control estaba compuesto por población sin reporte de antecedente de hospitalización por dengue. Sin embargo, al realizar la prueba de ELISA IgG Indirecta el 82% de estos individuos obtuvo un resultado positivo, lo que demuestra un antecedente de infección, por lo que el grupo frente al cual se realizó la comparación, estaba compuesto en su mayoría por individuos que previamente habían estado expuestos a una infección subclínica no diagnosticada, o una infección en la que no se requirió hospitalización (37,110). Otro estudio realizado en Brasil, en el que no se encontró asociación del polimorfismo y en el cual refieren el incumplimiento del equilibrio de Hardy Weinberg, reportó una asociación entre el SNP y el riesgo de desarrollar FHD en pacientes infectados con DENV-2 (107).

Combinaciones genotípicas

Varios factores pueden intervenir en la respuesta inmunológica generada ante la infección por virus dengue, por lo que algunas investigaciones se han centrado en el estudio conjunto de los factores genéticos que pueden influenciar la respuesta y el desenlace de la misma (55,50). En estos trabajos se han analizado los SNPs evaluados en el presente estudio,

ejemplo de ello es un estudio realizado en India en el cual evaluaron la asociación entre tres SNPs del gen *CD209*, dentro de los el rs4804803, en el que la presencia al alelo WT en dos haplotipos se asoció tanto a riesgo como a protección (37).

Algunos estudios en los que se han realizado análisis de polimorfismos, han profundizado en el análisis de haplotipos y de combinaciones de SNPs, que pueden estar involucradas en la severidad de la enfermedad. Al realizar las comparaciones entre los grupos se evidenció que la presencia del polimorfismo en los genotipos (homocigoto para el polimorfismo + heterocigotos) de DC-SIGN (rs4804803) y FcγRIIIa (rs1801274) se encontró asociada a protección de la infección asintomática comparada con el grupo control presentando un valor de $OR=0.21$ ($IC_{95\%}= 0.05-0.9$, $p=0.028$). Contrario a este resultado, un estudio realizado en India por Alagarasu *et al*, identificó la asociación de dos haplotipos de tres SNPs (rs735239 - rs4804803 - rs2287886) ubicados en el gen *CD209*, al comparar el grupo de dengue (FHD+FD) respecto al grupo control. El haplotipo A-A-A se asoció con protección ($OR=0.62$, $IC_{95\%}= 0.42-0.93$, $p=0.099$), mientras el haplotipo A-A-G se asoció a severidad ($OR=2.95$, $IC_{95\%}=1.22-3.31$) respectivamente. Los haplotipos presentaron un comportamiento de protección ($OR=0.59$, $IC_{95\%}=0.38-0.91$, $p=0.0576$) y riesgo ($OR\ 2.27$, $95\% IC\ 1.35-3.85$, $p=0.0048$), similar al comportamiento identificado al comparar el grupo de FD respecto al grupo control, en ambos casos haplotipos el SNP rs4804803 presentó alelo (A) WT (37).

En el presente estudio los individuos con la combinación alélica en la que se encontró el alelo polimórfico en los genotipos de DC-SIGN (rs4804803) y TNF- α (rs 1800629) tuvieron un riesgo 13 veces mayor de presentar síntomas durante una infección por DENV, pues la comparación entre el grupo sintomática respecto a las infecciones asintomáticas presentó un $OR=12.92$ ($IC_{95\%}= 2.52 - 66.29$) con un valor de $p=0.0005$. Estos resultados son similares a los encontrados en dos estudios en los que se incluyó dentro de las combinaciones alélicas el polimorfismo de TNF- α (rs1800629); el primero de ellos se realizó población cubana en el que la combinación de tres SNPs (TNF- α , IFN- γ , IL-10) presentó asociación a riesgo ($OR=9.16$, $IC_{95\%}=1.81 - 46.31$, $p=0.006$) (34). El segundo estudio desarrollado por Farias *et al.*, en Brasil, analizó las combinaciones genotípicas de los SNPs para TNF- α , IL-6 y IL-1 β y su asociación como factor de riesgo al comparar el grupo de dengue respecto a casos de no dengue (108). Sin embargo, el estudio realizado por Sing-Sam en población de Malasia evidenció que tres de las combinaciones en las que se

incluían los genotipos de TNF- α relacionados con alta producción, junto con el haplotipo de baja producción de la IL-10 y los genotipos IL-12B se asociaron con protección al comparar los casos de FHD respecto a DSS (75).

Lo anterior hace necesario profundizar el análisis tanto de los SNPs, como de las combinaciones genotípicas, en el cual se integre la información clínica y de laboratorio de los individuos recolectada durante el seguimiento de la enfermedad. Este análisis permitiría identificar obtener un perfil completo para establecer la utilidad de la identificación de los SNPs como predictores de la severidad de la enfermedad.

8. CONCLUSIONES

1. La presencia del polimorfismo del receptor DC-SIGN (rs4804803), se asoció con una menor posibilidad de presentar signos de alarma.
2. El polimorfismo presente en el receptor FcγRIIa (rs1801274) se asoció con una menor posibilidad de presentar una infección. Adicionalmente, la presencia de este SNP se asoció con una mayor posibilidad de presentar manifestaciones graves.
3. La presencia del alelo polimórfico de TNF- α (rs1800629) se asoció con una mayor posibilidad de cursar con la infección, sin embargo, la presencia de este alelo se relacionó con una menor posibilidad de presentar signos de alarma.
4. La combinación genotípica en la que se presentó del polimorfismo en DC-SIGN y FcγRIIa se asoció con una menor posibilidad de presentar la infección.
5. La combinación genotípica en la que se presentó del polimorfismo en DC-SIGN y TNF- α se relacionó con una mayor posibilidad de presentar manifestaciones clínicas durante la infección por DENV.

9. RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar la identificación de estos SNPs en otras regiones del país con alta incidencias de dengue, con el fin de comparar si la presencia de los SNPs se relaciona de forma similar en otras regiones.
- ✓ Evaluar la asociación de estos SNPs con la infección por un serotipo determinado de DENV, y su relación con la severidad de la enfermedad.
- ✓ Medir el nivel circulante de TNF- α en individuos con infecciones sintomáticas y correlacionarlos con la presencia del SNP.
- ✓ Incluir dentro del grupo de infecciones sintomáticas, los casos de dengue sin signos de alarma (DSSA), con el fin de establecer la asociación de la presencia de los polimorfismos con los hallazgos clínicos que se presentan durante la enfermedad.
- ✓ Profundizar el análisis de las combinaciones genotípicas y alélicas en cada uno de los grupos de interés.
- ✓ Caracterizar los grupos de interés con otros SNPs de estos genes como los encontrados en el gen CD209 rs735239 y rs2287886, el rs1800750 del gen de TNF- α , así como otros (rs2069843 y rs2069705), que han sido previamente asociados a la severidad en la infección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fang X, Hu Z, Shang W, Zhu J, Xu C, Rao X. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;66:134–46.
2. Guzman MG, Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015;385(9966):453–65.
3. Organización Mundial de la Salud (OMS) y Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales (TDR). Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. Bolivia. 2009;170.
4. Nedjadi T, El-kafrawy S, Sohrab SS, Desprès P, Damanhour G, Azhar E. Tackling dengue fever : Current status and challenges. *Virol J. Virology Journal*; 2015;1–11.
5. Velandia M CJ. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 2011;15(1):33–43.
6. Ministerio de la Protección Social, INS, Instituto Nacional de Salud, OPS OP de la salud. Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de dengue.
7. Guerra R, Yu Z. Single Nucleotide Polymorphisms and Their Applications. In: *Computational Genomics*. 2005. p. 312–49.
8. Padilla JC, Rojas DP, Sáenz-Gómez R. Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. Univ del Rosario. 2012;
9. Gomez SE. Informe del evento Dengue, Colombia, hasta el periodo epidemiológico XII, Colombia, 2015. Instituto Nac Salud. 2015;(1).
10. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud pública. Instituto Nacional de Salud. Informe epidemiológico nacional 2012, enfermedades transmisibles , enfermedades transmitidas por vector Chagas, Dengue, Fiebre Amarilla, Leishmaniasis y Malaria. Instituto Nac Salud. 2012;
11. Ebi KL, Nealon J. Dengue in a changing climate. 2016;151:115–23.
12. John DV, Lin Y, Perng GC. Biomarkers of severe dengue disease – a review. 2015;1–7.
13. Lim S, Lee YS, Yoon I. Prospects for dengue vaccines for travelers. 2016.
14. Yam-puc JC, Cedillo-barrón L, Aguilar-medina EM, Palermo MS. The Cellular Bases of Antibody Responses during Dengue virus infection. 2016;7(June):1–12.
15. 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(4):401–8.
16. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining

the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. 2012;6(8).

17. Mercado M. Informe Final Dengue, Colombia, 2014. Instituto Nac Salud. 2014;1–34.
18. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud pública. Instituto Nacional de Salud. Semana epidemiológica número 40 de 2016 (02 oct. al 08 oct 2016). 2016.
19. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud pública. Instituto Nacional de Salud. Semana epidemiológica 53 de 2014 (28 dic. al 03 ene 2015). Vol. 2014. 2015.
20. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud pública. Instituto Nacional de Salud. Semana epidemiológica 52 de 2015 (27 dic. al 02 ene 2016). Vol. 2015. 2015.
21. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud pública. Semana epidemiológica número 21 de 2017 (21 Mayo - 27 Mayo). Inst Nac Salud. 2017;
22. Instituto Nacional de Salud -. Semana epidemiológica número 52 de 2016. Subdirección de Vigilancia y Control en Salud pública. Instituto Nacional de Salud. 2016.
23. Pérez-Castro R, Castellanos JE, Olano VA, Matiz M-I, Jaramillo JF, Vargas SL, et al. Detection of all four dengue serotypes in *Aedes aegypti* female mosquitoes collected in a rural area in Colombia. 2015.
24. Castro L, Coronel C, Beltran E, Camacho S, Parra S, Calderón M, et al. Descripción de la infección y reinfección por virus Dengue en niños asintomáticos de 4 a 14 años en dos municipios de Cundinamarca. X Encuentro Nac Investig en Enfermedades Infecc. 2016;49.
25. DANE. Censo General 2015 Perfil Anapoima Cundinamarca. 2010.
26. DANE. Censo General 2015 Perfil Apulo Cundinamarca. 2010.
27. DANE. Censo General 2015 Perfil Girardot Cundinamarca. 2010.
28. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):532–43.
29. Corrales-Aguilar E, Hun-Opfer L. Nuevas perspectivas sobre la patogénesis del dengue. *Acta Med Costarric*. 2012;75–85.
30. Martínez-Gutiérrez M CJ. Dengue hemorrágico. ¿Una aberración inmunológica? *Revista Escuela Colombiana de Medicina. Rev Esc Colomb Med*. 2006;11:10–9.
31. Higo A, Santos F, Bianca S, Silvia A, Boscardin B. Early dengue virus interactions: the role of dendritic cells during infection. *Virus Res*. 2016;
32. Mathew A, Townsley E, Ennis F a. Elucidating the role of T cells in protection against and pathogenesis of dengue virus infections. *Future Microbiol*. 2014;9(3):411–25.

33. Martínez Torres E. Dengue. *Estud Avançados*. 2008;22(64):33–52.
34. Perez AB, Sierra B, Garcia G, Aguirre E, Babel N, Alvarez M, et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-B1, and interleukin-10 gene polymorphisms: Implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol*. Elsevier Inc.; 2010;71(11):1135–40.
35. Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Human antibody response to dengue virus : implications for dengue vaccine design. 2016;1–6.
36. Halstead S. Dengue. Volumen 5. Pasvol G y, Hoffman S, editors. Imperial College Press; 2008. 506 p.
37. Alagarasu K, Damle IM, Bachal R V., Mulay AP, Shah PS, Dayaraj C. Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. *Infect Genet Evol*. Elsevier B.V.; 2013;17:239–42.
38. Oliveira LF De, Lima CPS De, Azevedo RDSS, Mendonça DSF De, Rodrigues SG, Carvalho VL, et al. Polymorphism of DC-SIGN (CD209) Promoter in Association with Clinical Symptoms of Dengue Fever. *Viral Immunol*. 2014;27(5):1–5.
39. Silva LK, Blanton RE, Parrado AR, Melo PS, Morato VG, Reis E a G, et al. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(11):1221–7.
40. Rodríguez C, Rivera IL De. FcγRIIA -131 asociado a casos severos de dengue en Honduras. *Rev Cienc y Tecnol*. 2013;(13):67–80.
41. Eong E, James T, Tan HC, Chan SH. Dengue seroepidemiology in Singapore. *Lancet*. 2001;357:685.
42. Thi N, Lan P, Hirayama K. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. 2011;39(4):73–81.
43. Li X, Gibson AW, Kimberly RP. Human FcR Polymorphism and Disease. 2015;1–25.
44. Stephens H a F, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue Antigens*. 2002;60(4):309–18.
45. Vejbaesya S, Luangtrakool P, Luangtrakool K, Vaughn DW, Endy TP, Mammen MP, et al. Tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin-alpha (LTA) gene,allele, and extended HLA haplotype associations with severe dengue virus infection in ethnic Thais. *John McCormick Inst Infect Dis*. 2010;199(10):1442–8.
46. Fernández-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-α-

- 308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue Antigens*. 2004;64(4):469–72.
47. Kalayanarooj S, Gibbons R V, Vaughn D, Green S, Nisalak A, Jarman RG, et al. Blood group AB is associated with increased risk for severe dengue disease in secondary infections. *J Infect Dis*. 2007;195(7):1014–7.
 48. Chotiwan N, Roehrig JT, Schlesinger JJ, Blair CD, Huang CYH. Molecular determinants of dengue virus 2 envelope protein important for virus entry in FcγRIIA-mediated antibody-dependent enhancement of infection. *Virology*. Elsevier; 2014; (1):238–46.
 49. W. W. Shanaka I. Rodrigo, Olivia KT Blockb, Christopher Lanec SS-P, Ana P. Goncalveze SJ, , Michael S. Diamondd, Ching-Juh Laie RC, Roseb, c, Xia Jinb, c and JJS, A. Dengue virus neutralization is modulated by IgG antibody subclass and Fcγ receptor subtype. *Virology*. 2010;394(2):175–82.
 50. Coffey LL, Mertens E, Brehin A, Fernandez-garcia MD, Amara A, Despre P. Human genetic determinants of dengue virus susceptibility. *Microbes Infect*. 2009;11:143–56.
 51. Wang L, Chen RF, Liu JW, Lee IK, Lee CP, Kuo HC, et al. DC-SIGN (CD209) promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1).
 52. Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. The physiological role of DC-SIGN: A tale of mice and men. *Trends Immunol*. Elsevier Ltd; 2013;34(10):482–6.
 53. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;197(7):823–9.
 54. Durand M, Segura E. The Known Unknowns of the Human Dendritic Cell Network. *Front Immunol*. 2015;6(March):2–8.
 55. Xavier-Carvalho C, Gibson G, Brasil P, Ferreira RX, De Souza Santos R, Gonçalves Cruz O, et al. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: A case-control, functional and meta-analysis study. *Infect Genet Evol*. Elsevier B.V.; 2013;20:197–205.
 56. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casadémont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet*. 2005;37(5):507–13.

57. Noecker C a., Amaya-Larios IY, Galeana-Hernández M, Ramos-Castañeda J, Martínez-Vega R a. Contrasting associations of polymorphisms in FcγRIIa and DC-SIGN with the clinical presentation of dengue infection in a Mexican population. *Acta Trop.* 2014;138:15–22.
58. Dettogni R, Tristão-Sá R, Dos Santos M, da Silva F, Louro I. Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons. *Hum Immunol.* 2015;76:717–23.
59. Garc G. Polimorfismo del Receptor Fc γ RIIa . Influencias en la patogénesis y en la evolución de la infección por virus dengue. Polimorfismo del Receptor FcγRIIa . Influencias en la patogénesis y en la evolución de la infección por virus dengue . Autor : Lic . Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”; 2010.
60. González-Escribano MF, Aguilar F, Sánchez-Román J, Núñez-Roldán a. FcγRIIA, FcγRIIA and FcγRIIB polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. Vol. 29, *European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics.* 2002. p. 301–6.
61. Marcus R. Clark, Sarah B. Clarkson, Peter A. Ory, Neil Stollman IMG. Molecular Basis. *Blood.* 1986;67(2):469–73.
62. Winkel JGJ Van De, Capel PJ a. Overview : Fc receptors Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today.* 1993;14(5):215–21.
63. Brouwer KC, Lal A a, Mirel LB, Otieno J, Ayisi J, Van Eijk AM, et al. Polymorphism of Fc receptor IIa for immunoglobulin G is associated with placental malaria in HIV-1-positive women in western Kenya. *J Infect Dis.* 2004;190(6):1192–8.
64. Loke H, Bethell D, Phuong CXT, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: Evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and FCγ receptor IIA genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;67(1):102–6.
65. Magnusson V, Johanneson B, Lima G, Odeberg J, Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME. Both risk alleles for FcγRIIA and FcγRIIA are susceptibility factors for SLE: a unifying hypothesis. *Genes Immun.* 2004;5(2):130–7.
66. Thein S, Aaskov J, Myint TT, Shwe TN, Saw TT, Zaw a. Changes in levels of anti-dengue virus IgG subclasses in patients with disease of varying severity. *J Med Virol.* 1993;40(2):102–6.

67. García G, Sierra B, Pérez AB, Aguirre E, Rosado I, Gonzalez N, et al. Asymptomatic dengue infection in a cuban population confirms the protective role of the RR variant of the FcγRIIa polymorphism. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(6):1153–6.
68. García G, González N, Pérez AB, Sierra B, Aguirre E, Rizo D, et al. Long-term persistence of clinical symptoms in dengue-infected persons and its association with immunological disorders. *Int J Infect Dis.* 2011;15(1):38–43.
69. García G, González D, Sánchez L, Pérez AB, Sierra B, Guzmán MG. Polimorfismo del receptor FcγRIIa y su posible relación con las manifestaciones clínicas del dengue. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(10):621–3.
70. Menéndez GG, Pérez Díaz AB, Vázquez BS, Sánchez L, Gutiérrez NC, Vera MÁ, et al. Nuevas evidencias en la susceptibilidad a la infección por dengue asociadas al polimorfismo HH del receptor FcγRIIa. *Rev Cubana Med Trop.* 2011;63(3):220–6.
71. Chen RF, Liu JW, Yeh WT, Wang L, Chang JC, Yu HR, et al. Altered T helper 1 reaction but not increase of virus load in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005;44(1):43–50.
72. Iyngkaran N, Yadav M, Sinniah M. Augmented inflammatory cytokines in primary dengue infection progressing to shock. Vol. 36, *Singapore Medical Journal.* 1995. p. 218–21.
73. Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, Pham TP, Buurman W a, et al. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 1998;177(3):778–82.
74. Carvalho DM, Garcia FG, Terra APS, Lopes Tosta AC, Silva LDA, Castellano LR, et al. Elevated Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Serum Levels and Altered Toll-Like Receptor 4 Expression, Nitric Oxide, and Tumor Necrosis Factor Alpha Production in Dengue Hemorrhagic Fever Patients. *J Trop Med.* 2014;2014:1–9.
75. Sam S-S, Teoh B-T, Chinna K, AbuBakar S. High Producing Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Alleles in Protection against Severe Manifestations of Dengue. *Int J Med Sci.* 2015;12(2):177–86.
76. Criado L, Flórez O, Martín J, González CI. Genetic polymorphisms in TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. *Cytokine. Elsevier Ltd;* 2012;57(3):398–401.
77. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima SI, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-α: Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology.* 2010;49(7):1215–28.

78. Fragoso Lona JM, Martínez MS, Vargas Alarcón G, Barrios Rodas A, Ramírez Bello J. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: Biología molecular y genética. *Gac Med Mex*. 2013;149(5):521–30.
79. Wilson a G, Symons J a, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3195–9.
80. Amaya MP, Criado L, Blanco B, Gómez M, Torres O, Flórez L, et al. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. *Int Endod J*. 2013;46(1):71–8.
81. Egea GG De, Bermejo EAE, Malagón C, Mercado LF, Olmos C, González L, et al. Estudio de variantes moleculares de los genes ptpn22, TNF y VDR en madres de niños con nefritis lúpica y su asociación como factores de riesgo. 2016;38(2):121–33.
82. Mera-ramírez A, Castillo A, Orobio Y, Gómez MA, Gallego-marin C. Screening of TNF α , IL-10 and TLR4 single nucleotide polymorphisms in individuals with asymptomatic and chronic cutaneous leishmaniasis in Colombia : a pilot study. *BMC Infectious Diseases*; 2017;4–9.
83. Montoya-ruiz C, Jaimes FA, Rugeles MT, López JÁ, Bedoya G, Velilla PA. Variants in LTA , TNF , IL1B and IL10 genes associated with the clinical course of sepsis. *Immunol Res*. 2016;
84. Chuansumrit A, Anantasit N, Sasanakul W, Chaiyaratana W, Tangnararatchakit K, Butthep P, et al. Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding. Vol. 33, *Paediatr Int Child Health*. 2013. p. 97–101.
85. Houghton-Triviño N, Martín K, Giaya K, Rodríguez J a. Comparación de los perfiles de transcripción de pacientes con fiebre de dengue y fiebre hemorrágica por dengue que muestra diferencias en la respuesta inmunitaria y claves en la inmunopatogénesis. *Biomedica*. 2010;30:587–97.
86. García-Trejo AR, Falcón-Lezama J a., Juárez-Palma L, Granados J, Zúñiga-Ramos J, Rangel H, et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with dengue fever. *Acta Trop*. 2011;120(1–2):67–71.
87. Avendaño-Tamayo E, Campo O, Chacón-Duque JC, Ramírez R, Rojas W, Agudelo-Flórez P, et al. Variantes en los genes TNFA, IL6 e IFNG asociadas con la severidad del dengue en una muestra de población colombiana. *Biomédica*. 2017;37(4):1–42.

88. Chacón-duque JC, Adhikari K, Avendaño E, Campo O, Ramirez R, Rojas W, et al. Infection , Genetics and Evolution African genetic ancestry is associated with a protective effect on Dengue severity in colombian populations. *Infect Genet Evol.* 2014;27:89–95.
89. Gómez LM, Anaya JM, Sierra-Filardi E, Cadena J, Corbí Á, Martín J. Analysis of DC-SIGN (CD209) Functional Variants in Patients with Tuberculosis. *Hum Immunol.* 2006;67(10):808–11.
90. Torres MM, Acosta CP, Sicard DM, Restrepo HG. Susceptibilidad genética y riesgo de cáncer gástrico en una población del Cauca. *Biomédica.* 2004;24:153–62.
91. Guarnizo-Zuccardi P, Lopez Y, Giraldo M, Garcia N, Rodriguez L, Ramirez L, et al. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 2007;70(5):376–82.
92. Rojas-Villarraga A, Ortega-Hernandez O-D, Gomez LF, Pardo AL, López-Guzmán S, Arango-Ferreira C, et al. Risk factors associated with different stages of atherosclerosis in Colombian patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2008;38(2):71–82.
93. Romero-Sánchez C, Londono J, Delgado G, Jaimes D a., De Avila J, Mora a., et al. Association of tumor necrosis factor alpha-308 promoter polymorphism with spondyloarthritides patients in Colombia. *Rheumatol Int.* 2012;32(7):2195–7.
94. Tecnosuma Internacional. UMELISA Dengue IgM Plus. La Habana, Cuba; 2011.
95. Valdivia AI, Palenzuela A, Herrera R, Zulueta O, Feal S, Ventura J, et al. UMELISA Dengue IgM Plus: Una nueva herramienta para el diagnóstico y la vigilancia epidemiológica. *Cent Inmunoensayo.* 2006;
96. Tecnosuma Internacional. UMELISA dengue IgM plus: principales características y resultados de su desempeño [Internet]. La Habana, Cuba; Available from: <http://www.cidfa2004.sld.cu/conferencia/ver.php?id=73>
97. Panbio®. Australia. Inserto de ELISA de captura de anticuerpos IgG contra dengue (N° catálogo E-DEN02G). 2008;
98. Panbio®, Brisbane A. Inserto de ELISA IgG indirecta contra dengue (N° catálogo E-DEN01G). 2006;(c):4–7.
99. Panbio. Dengue Early ELISA (Cat No. E-DEN02P). Australia; 2011.
100. Cultek S.L.U. Cromatografía de adsorción (membranas de sílica gel). p. 1–9.
101. Becerra MV. Prevalencia de virus entéricos en moluscos cultivados en Galicia. Estudio de la fiabilidad de microorganismos indicadores de contaminación viral.

- Universidad de Santiago de Compostela, editor. España; 2009. 78-79 p.
102. Chien L, Liao T, Shu P, Huang J, Gubler DJ, Chang GJ. Development of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays To Detect and Serotype Dengue Viruses. *Journall Clin Microbiol.* 2006;44(4):1295–304.
 103. Flesch B.K BF and N. Rapid typing of the human FcGR1a poylmorphism by PCR with allele soecific primers. 1998;38(February):174–6.
 104. Wilson, AG, Giovine, FS, Blakemore, AI, Duff G. Single base polymorphism in the human Tumour Necrosis Factor alpha gene detectable by Nco1 restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1991;1(5):353.
 105. Iniesta R. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. 2016;19(4):333–41.
 106. Dang TN, Naka I, Sa-ngasang A, Anantapreecha S, Wichukchinda N. Association of BAK1 single nucleotide polymorphism with a risk for dengue hemorrhagic fever. *BMC Med Genet. BMC Medical Genetics;* 2016;11–5.
 107. Feitosa R, Vallinoto A, Vasconcelos P, S Azevedo R, Azevedo V, Machado L, et al. Gene Polymorphisms and Serum Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Markers in Dengue Viral Infections. *Viral Immunol.* 2016;0(0):1–10.
 108. Cansanção IF, do Carmo AP, Leite RD, Portela RD, de Sá Leitão Paiva Júnior S, de Queiroz Balbino V RS. Association of genetic polymorphisms of IL1 b -511 C > T , IL1RN VNTR 86 bp , IL6 -174 G > C , IL10 -819 C > T and TNF-a -308 G > A , involved in symptomatic patients with dengue in Brazil. *Inflamm Res.* 2016;65(11):925–32.
 109. Donis J. Tipos de diseños de los estudios clínicos y epidemiológicos (Types of clinical and epidemiologic study designs). *Av en Biomed.* 2013;2(2):76–99.
 110. Alagarasu K, Bachal R V, Tillu H, Mulay AP, Kakade MB, Shah PS, et al. Cytokine Association of combinations of interleukin-10 and pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms with dengue hemorrhagic fever. *Cytokine. Elsevier Ltd;* 2015; 74:130-136.
 111. Gómez Pinzón EM, Hernández Carrillo M, Duque Lesmes MC, Daza Rivera CF, Ortiz Carrillo ME, Millán Hurtado JF, et al. Seroprevalence of Dengue in Five Municipalities of Valle del Cauca - Colombia. *Clin Res Infect Dis.* 2016;3(5):1043.
 112. Jiménez MM, Arias J, Carrasquilla G. Seroprevalencia de la infección por dengue en los municipios de Armenia , Calarcá , La Tebaida y Montenegro en el departamento del Quindío , 2014. 2017;34–41.
 113. Castellanos JE, Coronel-Ruiz C, Parra-Alvarez S, Castilla MG, Calvo EP, Arévalo-

- Herrera M V-RM. Description of high rates of inapparent and simultaneous multiple dengue virus infection in a Colombian jungle settlement. Trop Biomed. 2015;In press.
114. Organización Mundial de la Salud (OMS). Dengue haemorrhagic fever. 1997;
115. NCBI. 1000 Genomes Browser
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>.
116. Mohsin SN, Mahmood S, Amar A, Ghafoor F, Raza SM, Saleem M. Association of FcγRIIa Polymorphism with Clinical Outcome of Dengue Infection : First Insight from Pakistan. 2015;
117. Martínez T, Hernández GA, Bravo M, Trujillo E, Pérez-García J, Robayo JC et al. Lesiones preneoplásicas gástricas en pacientes colombianos: asociación de polimorfismos genéticos interleucinas 1B-511, 1RN, 10-819, 10-1082, factor de necrosis tumoral-α-308 y anticuerpos inmunoglobulina G hacia cagA de *Helicobacter pylori*. 2014;18(1):8–17.

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado Estudio A

Código:

CONSENTIMIENTO INFORMADO RED DE INVESTIGACIÓN MULTIDISCIPLINARIA PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES - COLCIENCIAS

Instituciones: Universidad El Bosque, Universidad Surcolombiana, Instituto Nacional de Salud, Centro de Investigación Científica Cauceseco.

Título del estudio: "Espectro clínico de la infección por virus dengue en una cohorte de niños de 5 - 14 años de dos municipios de Cundinamarca".

Instrucciones:

Antes que decida si su hijo va a participar en el estudio, debe entender lo que se va a realizar en él, de manera que tenga la información necesaria para tomar la decisión. Por favor lea cuidadosamente el documento, si tiene alguna pregunta relacionada con el estudio, pregúntele a la persona responsable. Recuerde que usted es libre de escoger si desea participar en el estudio o no.

El dengue es una enfermedad viral transmitida por la picadura de un mosquito y es considerada un problema de salud pública, porque afecta gran parte de la población de nuestro país. Esta enfermedad se caracteriza porque las personas (niños y adultos) desarrollan síntomas como fiebre alta, dolor de cabeza, malestar general, y en algunos casos los síntomas pueden ser graves como hemorragias. Sin embargo, los síntomas que desarrollan las personas en los primeros días de la enfermedad no son típicos, y otras enfermedades desarrollan síntomas similares (como influenza, rubéola, sarampión, entre otras).

¿Por qué se está haciendo este estudio?

El presente proyecto propone hacer la caracterización de los signos y síntomas del dengue en niños de 5 a 14 años en el departamento de Cundinamarca, considerando aspectos del virus y del individuo. El estudio se realizará en los municipios de Anapoima y Apulo en los que la transmisión de la enfermedad y el número de casos se han incrementado en los últimos años.

¿En qué consiste esta investigación?

Se invitarán a participar a 500 niños de 5 a 14 años que se encuentren sanos, a los cuales se les realizará seguimiento médico durante tres años, que permita identificar la presencia de síntomas relacionados con la infección con virus dengue. Durante este tiempo, se tomarán muestras de sangre y se harán análisis en el laboratorio que permitirán identificar el virus y las principales características biológicas de la enfermedad.

¿Qué tengo que hacer si mi hijo (a) participa en esta investigación?

Para participar en el estudio usted debe permitir que a su hijo(a) se le realice un examen médico, se tome una muestra de sangre de una vena del brazo (4 ml) cada año durante tres años. Adicionalmente, si su hijo(a) presenta fiebre y síntomas característicos de la enfermedad del dengue durante su participación en el estudio, usted debe llevar al niño a la institución de salud del municipio, permitir que un médico realice examen médico, y se le tome una muestra de sangre en dos momentos: cuando presenta los síntomas y cuando se ha recuperado de la enfermedad.

La toma de la muestra la realizará un profesional de la salud (bacteriólogo) utilizando material desechable no reutilizable que no representa riesgo para su salud. Las complicaciones asociadas con la toma de la muestra incluyen dolor leve en el brazo, moretón en el sitio de punción que puede desaparecer en una semana, sangrado y riesgo de infección.

¿Cómo se va a mantener la privacidad y confidencialidad de los datos de mi hijo(a)?

Las muestras de sangre y los formatos de recolección de la información (encuesta, formato ingreso al estudio, formato historia clínica) serán identificados con un código asignado para su hijo durante la participación en el estudio. Sólo los investigadores tendrán acceso a la base de datos en la que se almacena la información, por lo que su hijo no será identificado por su nombre o documento de identidad en la publicación de los resultados del estudio. La información

recopilada y los resultados de las pruebas de laboratorio serán utilizados únicamente con fines investigativos para el conocimiento del dengue.

¿Recibiré algún beneficio por la participación de mi hijo (a) en esta investigación?

Usted no recibirá dinero por la participación de su hijo(a), pero la valoración por el médico, la toma de la muestra y las pruebas de laboratorio serán cubiertas por el estudio.

¿Qué hacen con la muestra de sangre?

La sangre que se toma será utilizada para los análisis que se hacen en el laboratorio para saber si la persona tiene dengue. Se realizarán las pruebas para la detección de anticuerpos Inmunoglobulina M (IgM), Inmunoglobulina G (IgG) y a partir de estos resultados se realizarán pruebas especializadas para la detección del virus dengue. Adicionalmente a las muestras a las que se haya aislado virus dengue, se les realizará un análisis genético y molecular para estudiar las características del virus. Las muestras negativas para dengue serán analizadas para otras enfermedades como Influenza, Leptospirosis e infección por Virus Sincitial Respiratorio.

Usted puede decidir si quiere que la muestra de su hijo pueda ser usada para investigaciones futuras. Usted puede cambiar su decisión en cualquier momento y notificarla al personal del estudio que registran los datos. Su decisión acerca del uso de la muestra no afectará su participación en otros estudios.

Por favor indique su decisión acerca del permiso de uso futuro de las muestras de su hijo en investigación aquí abajo:

_____ Acepto que las muestras se almacenen por un período indefinido y se utilicen en futuras investigaciones*.

_____ No se pueden utilizar las muestras en investigaciones futuras**

* Aun en el caso de aceptar el uso de su sangre para investigaciones futuras no relacionadas con este estudio, requerirá de la aprobación de un nuevo protocolo por parte del Comité de Ética Institucional

** La muestra será destruida por una compañía de desechos hospitalarios

¿Puedo retirar a mi hijo (a) de esta investigación en cualquier momento?

Usted debe saber que la aceptación de su hijo(a) es totalmente voluntaria. Si usted acepta que su hijo(a) participe y en cualquier momento desea retirarlo del estudio, puede retirar el consentimiento y contactar a los investigadores para que las muestras no sean procesadas y almacenadas. Si más adelante, durante la participación usted tiene alguna pregunta adicional relacionada con el estudio, puede contactar a los investigadores del estudio:

Dr. Jaime Castellanos

Director grupo de Virología, Universidad El Bosque

Teléfono: 571-6489066

Dirección: Avenida Carrera 9 No.131A-02 Edificio D (Segundo piso), Bogotá, Colombia

Correo electrónico: castellanosjaime@unbosque.edu.co

Si usted tiene alguna duda relacionada con los derechos de su hijo(a) como participante en este estudio puede comunicarse con el Comité de Ética de la Universidad El Bosque:

Dra. Mónica Riva

Presidente Comité Ética en Investigaciones, Universidad El Bosque

Teléfono: 571-6489000 Ext: 1520 Fax: 6489006

Dirección: Calle 132 No. 7A-85, Bogotá, Colombia

Correo electrónico: comiteetica@unbosque.edu.co

FORMULARIO DE FIRMAS

1. Declaración del participante:

Mi hijo(a) ha sido invitado a participar en el estudio: "Espectro clínico de la infección por virus dengue en una cohorte de niños de 5 -14 años de dos municipios de Cundinamarca". He leído y entendido este documento de Consentimiento Informado o se me ha leído y explicado. Mis preguntas han sido contestadas claramente, y no tengo dudas sobre mi participación, por lo que estoy de acuerdo de participar en este estudio. Acepto que mi hijo(a) participe en el estudio, y sé tiene derecho de terminar su participación en el estudio en cualquier momento. Al firmar esta hoja de consentimiento informado no he renunciado a ninguno de mis derechos legales. En el momento en que firme este documento de consentimiento informado sé que recibiré una copia del mismo.

Nombre del padre o tutor legal:

Documento de identidad:

de:

Firma:

Fecha:

Nombre del testigo:

Documento de identidad:

de:

Firma:

Fecha:

2. Declaración del investigador

Yo certifico que he explicado el estudio al participante y a los padres o acudientes, respondí las inquietudes que el participante y sus padres manifestaron durante la explicación. El participante entiende el propósito del estudio, los posibles riesgos y beneficios asociados con su participación.

Nombre del investigador:

Documento de identidad:

de:

Firma investigador:

Fecha:

Anexo 2. Asentimiento Informado Estudio A

Código:

ASENTIMIENTO INFORMADO

RED DE INVESTIGACIÓN MULTIDISCIPLINARIA PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES - COLCIENCIAS

Instituciones participantes: Universidad El Bosque, Universidad Surcolombiana, Instituto Nacional de Salud, Centro de Investigación Científica Cauceseco

Título del estudio: "Espectro clínico de la infección por virus dengue en una cohorte de niños de 5 -14 años de dos municipios de Cundinamarca".

Instrucciones:

Antes que decidas participar en el estudio debe leer este documento y si tiene alguna pregunta puede comentarla a los padres y a la persona responsable del estudio para solucionar la pregunta. Si tiene más preguntas relacionadas con el estudio, puede preguntar las veces que quiera hasta que esté claro el tema del estudio.

El dengue es una enfermedad muy común en nuestro país, que es transmitida por la picadura de un mosquito. Esta enfermedad se caracteriza porque las personas (niños y adultos) desarrollan fiebre alta durante varios días, dolor de cabeza, malestar general que les impide ir a caminar, correr, ir al colegio y jugar. Cuando las personas tienen fiebre deben ir al Centros de salud o el hospital para que los profesionales de la salud (médicos, enfermeras, bacteriólogos) puedan examinar a la persona y tomarle una muestra de sangre para hacer los análisis en el laboratorio y con esto conocer si la persona tiene dengue.



Figura 1. Mosquito infectado



Figura 2. Niño con dengue

¿En qué consiste el estudio?

Este estudio se realizará en los municipios de Anapoima y Apulo. En la primera etapa del estudio queremos invitar a 500 niños y adolescentes de tu edad que se encuentren sanos, a los que se realizará seguimiento durante tres años.

¿Qué tengo que hacer si participo en la investigación?

Si decides participar en el estudio debes tener en cuenta:

1. Aceptar la toma de muestra de sangre una vez al año durante los tres años del estudio. Cada año se tomará la muestra de sangre en un tubo plástico desechable 4 ml. La toma de la muestra se realizará haciendo un pinchazo en el brazo con una aguja delgada.
2. En caso de que tengas fiebre debes asistir a la institución de salud acompañado de tus padres o tutor, para que el médico realice un examen físico y una enfermera o bacteriólogo tome una muestra de sangre para realizar las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la enfermedad.
3. Al finalizar la enfermedad y te hayas recuperado, aceptar que una enfermera o bacteriólogo tome una muestra de sangre (aproximadamente 4 ml), para realizar las pruebas de diagnóstico complementarias para la confirmación del diagnóstico de la enfermedad.

¿Cuáles son los riesgos y beneficios de participar en el estudio?

Riesgos

Después del pinchazo puedes sentir mareo, dolor en el brazo, que desaparece al rato.

En algunos casos puede aparecer un morado en el sitio del pinchazo que desaparece en unos días.

Beneficios

Los voluntarios no pagarán dinero alguno por la participación en el estudio.

El valor de la consulta del médico, y de las pruebas de diagnóstico será cubierto por el estudio.

¿Qué hacen con la muestra de sangre?

La sangre que se toma será utilizada para los análisis que se hacen en el laboratorio para saber si la persona tiene dengue.

¿Cómo se maneja la privacidad del participante?

Los apuntes que el médico escribe durante el examen, y el tubo que contienen la sangre serán marcados con un número para proteger al participante. Sólo los investigadores tendrán acceso a la información.

¿Qué pasa si me retiro de la investigación?

Debes saber que la participación en el estudio es voluntaria. Si al inicio aceptas y más adelante no quieres continuar en el estudio, nadie se enfadará. Es importante informar a tus padres y a la persona del estudio para que la sangre y la información se eliminen.

¿Qué hago si tengo alguna pregunta relacionada con mi participación en el estudio?

Si más adelante, durante la participación en el estudio tienes alguna pregunta adicional relacionada con el estudio, puedes contactar a los investigadores del estudio:

Dr. Jaime Castellanos

Director del Instituto de Virología

Universidad El Bosque

Teléfono: 571-6489066

Dirección: Avenida Carrera 9 No. 131A-02 Edificio D (Segundo piso), Bogotá, Colombia

Correo electrónico: castellanosjaime@unbosque.edu.co

Si tienes alguna duda relacionada con sus derechos como participante en este estudio puedes comunicarse con el Comité de Ética de la Universidad El Bosque:

Dra. Mónica Riva

Presidente Comité Ética en Investigaciones, Universidad El Bosque

Teléfono: 571-6489000 Ext: 1520 Fax: 6489006

Dirección: Calle 132 No. 7A-85, Bogotá, Colombia

Correo electrónico: comiteetica@unbosque.edu.co

FORMULARIO DE FIRMAS

1. Declaración del participante:

Al finalizar la lectura de este documento, antes de firmar debo tener claro:

- He sido invitado a participar en el estudio: "Espectro clínico de la infección por virus dengue en una cohorte de niños de 5 -14 años de dos municipios de Cundinamarca".
- Leí y comprendí el documento y puedo hacer preguntas sobre el estudio
- Estoy satisfecho con las respuestas de las preguntas que realicé. Sé que puedo hacer más preguntas durante la participación en el estudio.
- Las personas del hospital ni mis familiares se molestarán si mi decisión es no participar en el estudio
- Si cambio de opinión después de aceptar, informaré a mis padres y al responsable del estudio

Nombre del participante: _____
Tarjeta de identidad: _____ de: _____
Firma: _____
Fecha: _____

Padre o Tutor legal del participante: _____
Documento de identidad: _____ de: _____
Firma: _____
Parentesco: _____
Fecha: _____

Nombre del Testigo: _____
Documento de identidad: _____ de: _____
Firma: _____
Fecha: _____

2. Declaración del investigador

Yo certifico que he explicado el estudio al participante y a los padres, respondí las inquietudes que el participante manifestó durante la explicación. El participante entiende el propósito del estudio, los posibles riesgos y beneficios asociados con su participación.

Nombre del investigador: _____
Documento de identidad: _____ de: _____
Firma investigador: _____
Fecha: _____

Anexo 3. Consentimiento Informado Estudio B



CENTRO DE INVESTIGACIÓN HOSPITAL
UNIVERSITARIO DE LA SAMARITANA (CIHUS)



HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA SAMARITANA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN (CIHUS)

Grupo de Investigación: Virología, Universidad El Bosque

Nombre del estudio:

"ALGORITMO DE LABORATORIO PARA LA CONFIRMACIÓN DE CASOS DE DENGUE EN MUESTRAS DE INDIVIDUOS CON SÍNDROME FEBRIL ATENDIDOS EN INSTITUCIONES DE SALUD DE CUNDINAMARCA"

Investigadora principal: Jaime Eduardo Castellanos, director grupo virología

Coinvestigador (es):

Hospital Universitario La Samaritana: Saúl Moreno, Janeth Carrill , Ángela Fonseca

Universidad El Bosque: Myriam Velandia, Eliana Calvo Tapiero, Félix Delgado, Carolina Coronel Ruiz, Nadia Castañeda, Rosalía Pérez Castro

Asesor (es):

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Día/mes/año: ____/____/____

Código del Sujeto: _____

Este documento explica en qué consiste este estudio de investigación. Es importante que usted lea cuidadosamente esta información y que luego decida si desea participar o no como voluntario.

PROPÓSITO:

El propósito de esta investigación es establecer un algoritmo de laboratorio para la confirmación de casos de dengue en muestras de individuos con síndrome febril atendidos en instituciones de salud de Cundinamarca.

DURACIÓN:

Se invitarán a participar a 300 personas mayores de cinco años a los cuales se les realizará examen médico y la toma de una muestra de sangre para los análisis de laboratorio para el diagnóstico de dengue.

El tiempo que cada sujeto de estudio otorgará para esta investigación será de 60 minutos en dos momentos. El primer momento al inicio de la enfermedad (cuando consulta por la fiebre) el cual tiene una duración aproximada de 30 minutos. El segundo momento al finalizar la enfermedad (cuando se haya recuperados de la fiebre), el cual tiene una duración de 30 minutos.

El tiempo disponible para la recolección de los datos es de 24 meses. Los resultados del estudio se reportarán en Noviembre del año 2015.

PROCEDIMIENTOS:

Los procedimientos que le conciernen a usted como sujeto en este estudio incluyen:

- Permitir que un médico perteneciente al estudio realice un examen clínico completo y realice unas preguntas relacionadas con los síntomas que ha presentado desde el inicio de la fiebre.
- Permitir que una bacterióloga o enfermera de la institución tome una muestra de sangre por medio de una punción en una vena del brazo (6-10 ml) al inicio de la enfermedad y cuando se haya recuperado completamente.



<http://samaritana:2061/intranet>
2012 Hospital Universitario de la Samaritana - Cra 8 No 0-55 Sur
Tel: 4077075 Ext 10289

POSIBLES RIESGOS O INCOMODIDADES:

No se prevé ningún riesgo serio para los sujetos en este proyecto de investigación. Pero de pronto sí algunas incomodidades dadas por:

- El momento de la toma de la muestra de sangre, que puede generar un poco de dolor por el pinchazo, dolor leve en el brazo, moretón en el sitio de punción que puede desaparecer en una semana, sangrado.
- La toma de la muestra puede en muy raros casos causar desmayo o infección. El riesgo de infección será minimizado con el uso de alcohol antiséptico y técnicas de recolección de muestras en forma estéril (tubos con agujas nuevas y selladas estériles y desechables), con el fin de evitar infecciones cumpliendo con normas de bio-seguridad de laboratorio.
- Durante la extracción de sangre es posible que se filtre la sangre en la piel y se forme un hematoma debido a posibles dificultades en encontrar la vena. El riesgo de dolor será minimizado aplicando presión en el sitio del sangrado por varios minutos después de colección de la muestra

BENEFICIOS:

Los beneficios para usted por su participación en el estudio son:

- No habrá ningún beneficio económico directo para usted, pero los resultados de las pruebas de diagnóstico de dengue que se realizarán, serán importantes para la institución porque se tomarán medidas para el manejo de los casos y el tratamiento de la enfermedad.

CONFIDENCIALIDAD:

Las muestras de sangre y los formatos serán identificados con un código asignado para usted durante su participación en el estudio. Sólo los investigadores tendrán acceso a la base de datos en la que se almacena la información, por lo que usted no será identificado por su nombre o documento de identidad en la publicación de los resultados del estudio. La información recopilada en la encuesta y en el formato de ingreso del individuo al estudio será utilizada únicamente con fines investigativos para el dengue.

Los documentos originales de este estudio serán conservados en el archivo del grupo de virología de la Universidad El Bosque por un periodo mínimo de cinco (5) años. Los resultados del estudio serán presentados a la comunidad científica o podrán ser publicados, sin revelar su nombre o identidad.

PARTICIPACION VOLUNTARIA:

Su participación en este estudio de investigación es absolutamente voluntaria, por lo tanto, no habrá ningún tipo de remuneración económica o compensación por su participación. Usted tiene el derecho de terminar su participación en el estudio en cualquier momento. Cualquier pregunta o duda por favor comuníquese con el doctor **Jaime Castellanos al (571) 6489066, (571) 6489000 Ext.1209** quien proporcionará información y resolverá alguna pregunta adicional relacionada con el estudio.

El examen clínico y la toma de la muestra de sangre serán realizados por profesionales idóneos, adecuadamente asesorados, quienes brindarán información sobre el estudio, aclararán inquietudes.

He sido invitado a participar en el estudio: "Algoritmo de laboratorio para la confirmación de casos de dengue en muestras de individuos con síndrome febril atendidos en instituciones de salud de Cundinamarca". He leído y entendido este documento de Consentimiento Informado o se me ha leído y explicado. Mis preguntas han sido contestadas claramente, y no tengo dudas sobre mi participación, por lo que estoy de acuerdo de participar en este estudio.

Acepto participar en el estudio voluntariamente, y sé que tengo el derecho de terminar mi participación en el estudio en cualquier momento. Al firmar esta hoja de consentimiento informado no he renunciado a ninguno de mis derechos legales. En el momento en que firme este documento de consentimiento informado sé que recibiré una copia del mismo.

FIRMA DEL SUJETO VOLUNTARIO Día/mes/año: ____/____/____

FIRMA DE TESTIGO Día/mes/año: ____/____/____

FIRMA DEL INVESTIGADOR Día/mes/año: ____/____/____

- Usted ha decidido **NO** participar en este proyecto de investigación y en constancia firma:

FIRMA DEL SUJETO VOLUNTARIO Día/mes/año: ____/____/____

DATOS DE CONTACTO DE LOS INVESTIGADORES.

Si tiene alguna inquietud sobre el estudio, o si previa aceptación de ingreso al estudio decide retirarse puede contactarse con los investigadores del estudio:

Investigador principal:

JAIME EDUARDO CASTELLANOS PARRA

correo electrónico: castellanosjaime@unbosque.edu.co, virologia@unbosque.edu.co

Teléfono: 6489066, 6489000 Ext. 1209

Celular: 3102425944

Anexo 4. Gel de identificación de SNPs de estudio

Figura 3. Gel de identificación de los SNPs

