DESCRIPCION DE UN MARCADOR BIOQUÍMICO Y ALGUNAS VARIABLES HEMATOLOGICAS EN CASOS CONFIRMADOS DE DENGUE EN NIÑOS CON DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD

CAMILA FERNANDA CANTILLO VILLOTA

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIDAD DE PEDIATRÍA
2018

DESCRIPCION DE UN MARCADOR BIOQUÍMICO Y ALGUNAS VARIABLES HEMATOLOGICAS EN CASOS CONFIRMADOS DE DENGUE EN NIÑOS CON DIFERENTES GRADOS DE SEVERIDAD

Autora:
CAMILA FERNANDA CANTILLO VILLOTA

Directora
Dra. Carolina Coronel Ruiz, Bacterióloga, MSc

Codirectores
Jaime E. Castellanos, PhD
Myriam Lucía Velandia, PhD

Asesor Metodológico
José Antonio de la Hoz
MD. MSc. Epidemiologia.

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIDAD DE PEDIATRÍA
2018

****

Firma de Director de Postgrados

****

Firma de Director del Programa

****

Firma de Directora de Investigaciones

TABLA DE CONTENIDO

1. DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA 9
2. RESUMEN DEL PROYECTO 11
2. ABSTRACT 12
3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO 13
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 13
3.2 JUSTIFICACIÓN. 15
4. MARCO TEÓRICO. 16
4.1 EPIDEMIOLOGÍA 16
4.2 PATOGÉNESIS DE DENGUE Y PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD 16
4.3 COMPORTAMIENTO CLÍNICO DEL DENGUE EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA 18
4.4 RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR DENGUE 18
4.5 PROTEÍNA DE ALTA MOVILIDAD DEL GRUPO 1 (HMGB-1) 19
5. OBJETIVOS. 21
5.1 OBJETIVO GENERAL. 21
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. 21
6. METODOLOGÍA 22
6.1 TIPO DE ESTUDIO 22
6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO. 22
6.3 INGRESO Y EVALUACIÓN DE LOS INDIVIDUOS CON SÍNDROME FEBRIL. 23
6.4 INGRESO Y EVALUACIÓN DE LOS VOLUNTARIOS SANOS. 24
6.5 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS 24
6.6 DEFINICIÓN DEL DIAGNOSTICO DE DENGUE. 24
6.7 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA DE ALTA MOVILIDAD DEL GRUPO 1 (HMGB-1). 25
6.8 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE VARIABLES HEMATOLÓGICAS EN SUERO DE PACIENTES 25
6.9 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES 25
6.10 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN. 26
6.11 CONSIDERACIONES ÉTICAS 28
7. RESULTADOS 29
7.1 Descripción de las variables hematológicas 31
7.2 Niveles de la proteína HMGB-1 en los grupos de estudio. 31
7.3 Correlación entre los niveles de HMGB-1 y las variables hematológicas 32
8. DISCUSIÓN. 33

9. CONCLUSIONES.....35
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 35
11. ANEXOS.....36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables clínicas evaluadas. 9

Tabla 2. Descripción de la población de estudio. 11

Tabla 3. Descripción de los signos vitales de los individuos de acuerdo al diagnóstico..... 12

Tabla 4. Variables hematológicas en los individuos clasificados de acuerdo al diagnóstico.13

Tabla 5. Niveles de la proteína HMGB-1 en los grupos de estudio..... 13

Tabla 6. Coeficientes de correlación de Spearman entre las variables hematológicas y los niveles de la proteína HMGB-1 en los casos de dengue y los individuos con síndrome febril (SF)..... 15

Tabla 7. Coeficientes de correlación entre las variables hematológicas y los niveles de la proteína HMGB-1 en los casos de dengue (DSSA, DSA y DG) y los individuos con síndrome febril (SF). 16

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultados pruebas de diagnóstico en los individuos febriles. 9

Figura 2. Síntomas reportados por los individuos febriles y el padre o cuidador al médico en el momento de ingreso al estudio..... 11

DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Sindrome febriles. 12

Figura 3. Hallazgos clínicos identificados por el médico en el momento de la valoración clínica. 13

Figura 4. Concentración de la proteína HMGB-1 en menores de 18 años A. Comparación niveles HMGB-1 en pacientes con dengue, síndrome febril no dengue (SF) e individuos sanos (Control). B. Comparación de los niveles de HMGB-1 en individuos con dengue clasificados de acuerdo al grado de severidad, en individuos con síndrome febril y control. DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Síndromes febriles. 13

Figura 5. Correlación de los niveles de HMGB-1 con el recuento de leucocitos y el recuento de plaquetas en los casos de dengue y en los individuos con síndrome febril no dengue. A y C. Correlación recuento de leucocitos y concentración de HMGB-1 (Dengue vs. síndrome febril). B y D. Correlación recuento de plaquetas y concentración de HMGB-1 (Dengue vs. síndrome febril). DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Síndromes febriles. 15

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Carta Aval Comité Etica HUS 31-10-2013 9
Anexo 2. Carta aval Comité Etica HUS 22-08-2014 11
Anexo 3. Carta aval Comité Ética HUS 21-06-2016 12
Anexo 4. Carta aval Comité Ética HUS 16-03-2017 13
Anexo 5. Carta aval Comité Etica UB PCI2013-457 14-04-2014 13
Anexo 6. Asentimiento informado controles 15
Anexo 7. Consentimiento informado febriles HUS 16
Anexo 8. Consentimiento informado-controles 16
Anexo 9. Formato clínico controles 16
Anexo 10. Formato evaluación clínica febriles HUS-CE 18

1. DESCRIPCIÓN DE LA PROPUESTA

Descripción de los niveles de la proteína de alta movilidad de grupo 1 (HMGB-1) y otras variables hematológicas en casos confirmados de dengue.

Estudiante: Camila Fernanda Cantillo Villota
Director: Carolina Coronel Ruiz
Codirectores:
Myriam Lucía Velandia Romero, PhD Coordinadora Laboratorio Virología
Jaime E Castellanos Parra, PhD Director Grupo de Virología
Grupo líder de investigación Grupo Virología.
Universidad El Bosque.
Enfermedades Transmitidas por Vectores.
Diagnóstico Inmunopatogénesis.
Unidad(es) responsable(s) Grupo de Virología.
Vicerrectoría de Investigaciones.

RESUMEN EJECUTIVO Descripción del problema
Dengue es la arbovirosis de gran interés en salud pública en países ubicados en zonas tropicales y subtropicales. La enfermedad se caracteriza por diferencias en la presentación clínica durante la fase febril y la fase crítica, las cuales dificultan el diagnóstico y la confirmación de los casos. En la patogénesis de dengue intervienen diferentes moléculas, las cuales participan dentro del proceso inflamatorio característico de la enfermedad, las cuales pueden inducir la alteración en la arquitectura y función de diferentes tejidos y de órganos. Dentro de estas moléculas solubles se ha descrito la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB-1) como una molécula con actividad pleiotrópica involucrada principalmente en la activación de diferentes células del sistema inmune e inductora de la respuesta inflamatoria. Por este motivo se requiere realizar un estudio en población pediátrica que integre la evaluación de los niveles de la proteína HMGB-1, la medición de algunas variables hematológicas en casos de dengue e identificar en los niveles de estas diferencias entre los diferentes grados de severidad de la enfermedad.
Objetivo General:
Describir un marcador bioquímico y variables hematológicas en pacientes pediátricos con infección por virus dengue confirmado que presentan diferentes grados de severidad de la enfermedad.
Tipo de estudio: Corte transversal.
Población y muestra: Individuos menores de 18 años con diagnóstico confirmado de dengue clasificados de acuerdo al grado de severidad de la enfermedad
Tipo de análisis: Descriptivo
Resultados obtenidos:
▪ Se realizo la descripción de los hallazgos clínicos identificados en la población de estudio.
▪ Se determino la concentración de la proteína HMGB-1 en las muestras de los individuos con diagnóstico confirmado de dengue y se establecerán las diferencias en los niveles de esta proteína de acuerdo a la clasificación de la severidad de la enfermedad.
▪ Se analizarán las variaciones en los recuentos celulares y los índices hematimétricos

obtenidos en el hemograma en los individuos con diagnóstico confirmado de dengue respecto a los individuos con síndrome febril indiferenciado

Palabras clave: DENV, pediatría, patogénesis, HMGB-1, hemograma

LUGAR DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO
Departamento: Cundinamarca Ciudad: Bogotá
Lugar(es) específicos (s): Laboratorio de Virología. Universidad El Bosque

2. RESUMEN DEL PROYECTO

Introducción: El dengue constituye la arbovirosis de mayor importancia en salud pública, a pesar del conocimiento y aplicación de los protocolos del MSPS y la OMS, existen dificultades para identificar tempranamente los casos severos, evitar complicaciones y muertes asociadas. La medición de niveles de un biomarcador como la HMGB-1 podría funcionar como marcador temprano junto con los variables hematológicas como herramientas para establecer el pronóstico de la enfermedad.

Materiales y métodos: Estudio de corte transversal, con una muestra conformada por menores de 18 años que consultaron al HUS en Girardot por síndrome febril menor a 7 días con signos y síntomas descritos por OMS para dengue y un grupo de voluntarios sanos sin antecedente de infección por DENV. Se realizó una evaluación clínica con un hemograma a los pacientes con síndrome febril para confirmar caso de dengue. Los casos confirmados se clasificaron de acuerdo con el grado de severidad de la enfermedad y en los controles se evaluó antecedente de infección por virus dengue. Todas las muestras de suero se procesaron en el laboratorio para determinación de niveles HMGB-1 pruebas de ELISA (IgM, IgG de captura, IgG indirecta, NS1) y detección ARN de DENV. Se realizó un análisis descriptivo de las variables numéricas con medidas de tendencia central y dispersión y de las cualitativas con porcentajes. Se estimó la correlación entre los niveles de HMGB-1, variables hematológicas y grado de severidad de los casos confirmados. Se utilizó el programa estadístico Stata 12.1 para el análisis de los datos.

Resultados: se incluyeron 123 pacientes, 97 consultaron por síndrome febril y 26 fueron voluntarios sanos, se confirmó caso de dengue en 87.6% de pacientes febriles, el grupo más frecuente fue dengue con signos de alarma 60%, la concentración de HMGB-1 fue 3.7 ng/ml en los casos confirmados de dengue, 3.2 ng/ml en el grupo de síndrome febril y 11.3 ng/ml en pacientes sanos. La concentración promedio de HMGB-1 en los casos de dengue sin signos de alarma fue 10.6 ng/ml, con signos de alarma 3.4 ng/ml y dengue grave 3.2 ng/ml, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos valores. La trombocitopenia fue más frecuente en los pacientes con dengue con signos alarma y dengue grave ($p< 0,001$). El coeficiente de correlación obtenido al evaluar los niveles de HMGB-1 y las variables hematológicas analizadas fue bajo.

Discusión: Los niveles de HMGB-1 e índices hematimétricos pueden variar durante la fase febril, teniendo un rendimiento mayor como predictor de severidad durante esta fase y en los pacientes con dengue grave, ya que en los procesos infecciosos severos se ha demostrado la asociación entre la concentración de HMGB-1 con la gravedad de la enfermedad.

Nivel de evidencia: nivel III

2. ABSTRACT

Introduction: Dengue is the most important arbovirus in public health, despite knowledge and application of the protocols of the Ministry of Social Protection and the World Health Organization, there are difficulties to identify early severe cases, avoid complications and associated deaths. The measurement of levels of a biomarker such as HMGB-1 could function as an early marker along with the hematological variables as tools to establish the prognosis of the disease.

Materials and methods: Cross-sectional study, a sample consisting of children under 18 years of age who consulted the HUS in Girardot for febrile syndrome less than 7 days with signs and symptoms described by WHO for dengue, one group of healthy volunteers without history of DENV infection. A clinical evaluation was performed with a haemogram to patients with febrile syndrome, in addition to a panel of diagnostic tests to confirm dengue cases. Confirmed cases were classified according to degree of severity and samples from control group were evaluated to identify history of DENV infection. All serum samples were processed in the laboratory for determination of HMGB-1 levels of ELISA, and ELISA IgM, capture IgG, indirect IgG, NS1 antigen and detection of RNA of DENV. A descriptive analysis of the numerical variables was made with measures of central tendency and dispersion and of the qualitative ones with percentages. The correlation between the levels of HMGB-1, hematological variables and degree of severity of confirmed cases was estimated. Stata 12.1 was used for the statistical analysis.

Results: 123 patients were included, 97 consulted for febrile syndrome and 26 were healthy volunteers, dengue cases were confirmed in 87.6% of febrile patients, the most frequent group was dengue with 60% alarm signs, the concentration of HMGB-1 was 3.7 ng / ml in confirmed cases of dengue, 3.2 ng/ml in the undifferentiated febrile syndrome group and 11.3 ng/ml in healthy patients. The average concentration of HMGB-1 in the cases of dengue without warning signs 10.6 ng/ml, with warning signs of 3.4 ng/ml and severe dengue 3.2 ng/ml, there were no statistically differences between these values. Thrombocytopenia was more frequent in patients with dengue with signs of alarm and severe dengue ($p < 0.001$). The correlation coefficient obtained when evaluating the levels of HMGB-1 and the haematological variables analyzed was low.

Discussion: The levels of HMGB-1 and hematimetric indexes can vary during the febrile phase, having a higher performance as a predictor of severity during this phase and in patients with severe dengue. Since it is precisely in the severe infectious processes where the association between the concentration of HMGB-1 with the severity of the disease has been demonstrated.

Level of evidence: level III

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dengue es la enfermedad viral transmitida por vectores de gran importancia a nivel mundial, la cual afecta entre 50 y 100 millones de personas cada año. En los últimos 50 años su incidencia ha aumentado debido a la creciente expansión geográfica de la población, la presencia del mosquito del género *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en zonas rurales y urbanas de países ubicados en zonas tropicales y subtropicales [1,2]. La transmisión de la enfermedad está determinada por la interacción de factores sociodemográficos y socioeconómicos como la migración y el desplazamiento de la población, la urbanización desordenada, la desigualdad en el acceso a los servicios públicos como acueducto, alcantarillado, y la recolección de basuras. Esta enfermedad es considerada un problema de interés en salud pública debido al alto costo que implica para las instituciones de salud realizar el seguimiento y control de los pacientes que desarrollan las formas severas de la enfermedad. Lo anterior, sumado a las debilidades en la atención de los pacientes y los problemas para el diagnóstico en las instituciones de salud de primer y segundo nivel de complejidad ubicadas en municipios endémicos para dengue han conducido a un aumento en el número de casos severos y de muertes relacionadas con la enfermedad, principalmente en población menor de edad que reside en zonas endémicas [3,4].

La infección por dengue puede ser asintomática o tener un cuadro clínico leve de rápida resolución, la cual se caracteriza en su etapa inicial por la presencia de fiebre y acompañada por el desarrollo de signos y síntomas inespecíficos, similares a los que se observan en otras enfermedades como fiebre amarilla, leptospirosis, influenza, sarampión, rubéola, entre otras.
A medida que transcurre la infección, un porcentaje de los pacientes pueden presentar manifestaciones clínicas graves caracterizadas por la alteración y disfunción de órganos que pueden conducir a una falla sistémica e incluso conducir a la muerte.
La frecuencia e intensidad de los síntomas del dengue varían durante el curso de la infección, así como la presentación y el manejo de estos en la población afectada. Por ejemplo, en los recién nacidos, infantes y niños residentes en países endémicos, la enfermedad tiene una dinámica diferente a la que se identifica en los adultos [5,6]. Aunque en la mayoría de los casos esta se manifiesta como un síndrome febril agudo, un porcentaje de los pacientes puede desarrollar manifestaciones atípicas que se relacionan el compromiso de órganos, conducen al deterioro clínico de los pacientes y como resultado el aumento en la severidad de la enfermedad [7,8].

A pesar las dificultades para interpretar y comprender la patogénesis de dengue, hasta el momento se ha identificado que en la infección interactúan diferentes factores, los cuales pueden estar asociados con la severidad de la enfermedad. Dentro de ellos, se ha descrito que la edad, la respuesta inmune, características genéticas del individuo, así como características del virus, pueden influir en el desarrollo de la infección y el curso de la enfermedad. Se han propuesto diversas hipótesis para explicar la patogénesis del dengue, como la tormenta de citoquinas y el fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos

(ADE) que se evidencian en las infecciones secundarias por este virus. Asimismo, en la infección participan diferentes moléculas como proteínas del complemento, auto-anticuerpos, proteínas del virus y otras moléculas que podrían ser las responsables del aumento de la permeabilidad vascular y la disfunción endotelial, dos eventos críticos que se evidencian durante la infección [9,10]

En algunos procesos inflamatorios de enfermedades autoinmunes como asma y en enfermedades infecciosas como sepsis bacterianas y algunas infecciones virales, se ha descrito a la proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB-1) como un posible candidato para establecer el pronóstico y el desenlace de la enfermedad. Esta proteína definida dentro del grupo de alarminas posee actividad pleiotrópica, la cual ejerce diferentes funciones como la activación de células, la inducción en la transcripción de genes y secreción de citoquinas proinflamatorias en respuesta a estímulos inducidos por antígenos como los péptidos en bacterias y las proteínas de virus como en el caso de dengue, la activación en la proliferación y migración celular induciendo un aumento en la permeabilidad vascular [11,12].

Aunque existe una amplia descripción sobre las características clínicas de la infección por dengue y la clasificación de la enfermedad, existen ciertas debilidades para detectar tempranamente los casos en población pediátrica en identificar aquellos casos que pueden tener un mal pronóstico o incluso que pueden estar relacionados a un desenlace fatal. Esto ha conducido a que un alto porcentaje de los casos de dengue en niños presenten complicaciones, por lo que la enfermedad requiere de un manejo especializado en instituciones de mayor nivel de complejidad. En la literatura, existen pocas investigaciones en población pediátrica que evalúen las diferencias entre las variables hematológicas de los pacientes en diferentes momentos de la enfermedad, así como escasos reportes sobre las variaciones en la concentración de la proteína HMGB-1 en la infección por dengue.

Hasta el momento, los trabajos publicados sobre los niveles de HMGB-1 en dengue se han orientado en la evaluación de muestras de población adulta con diagnostico confirmado de la infección, con el fin de identificar la utilidad de su medición para establecer diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, estos trabajos no han involucrado dentro de su estrategia metodológica el análisis de muestras de población pediátrica para conocer el papel de la proteína y la dinámica que esta posee durante la infección. Por este motivo, se requiere el desarrollo de estudios que integre la evaluación de los niveles de la proteína HMGB-1 y la medición de variables hematológicas de forma simultánea, para establecer su relación con la infección y su posible asociación con la severidad de la enfermedad.

3.2 JUSTIFICACIÓN.

Dengue es la arbovirosis de mayor importancia en salud pública debido al aumento en la incidencia, la severidad de los casos y el costo relacionado con el manejo de la enfermedad. A pesar del conocimiento y aplicación de los protocolos del MSPS y la OMS, persisten las dificultades para identificar tempranamente los casos y establecer el pronóstico de la enfermedad de manera oportuna evitando el desarrollo de complicaciones y muertes asociadas a la enfermedad [13,14].

La sospecha clínica de infección por virus dengue en un paciente, alerta al médico tratante para la toma de pruebas de laboratorio con el fin de confirmar el diagnóstico. Entre las principales pruebas de laboratorio se encuentran: el hemograma, la evaluación de proteínas de fase aguda y dependiendo el día de enfermedad la aplicación de pruebas de diagnóstico como las pruebas de diagnóstico rápido (PDR) como la detección de antígeno viral dengue o la detección de anticuerpos en las muestras de individuos con más de cinco días de inicio de la enfermedad. Los resultados de los laboratorios en adultos con infección por virus dengue han mostrado la presencia de leucopenia asociada a neutropenia y linfocitosis, y en algunas ocasiones dependiendo el comportamiento de la infección puede encontrarse además disminución del recuento de plaquetas y aumento de la concentración del hematocrito. Estos hallazgos en los resultados de los paraclínicos ayudan a confirmar el diagnóstico de dengue y permiten hacer un seguimiento para reconocer las diferentes complicaciones que podrían presentarse en un paciente con infección por dengue entre ellas la presencia de hemorragias o fuga capilar [15,16].

Sin embargo, el comportamiento de las pruebas de laboratorio en población pediátrica con dengue no ha sido evaluado. Por este motivo, en este trabajo se pretende analizar el comportamiento de las diferentes variables hematológicas de acuerdo al rango de edad, así como encontrar la asociación entre los resultados obtenidos a complicaciones de acuerdo a la severidad de los casos de dengue. Adicionalmente existe la necesidad de profundizar en la búsqueda de moléculas que soporten el diagnóstico clínico y de laboratorio para solucionar los inconvenientes en la definición de los casos, que permitan incrementar las herramientas para establecer el pronóstico de la enfermedad. La cuantificación de los niveles de la proteína HMGB-1 y de variables hematológicas en las muestras de niños con diagnóstico confirmado, proporcionará las herramientas para determinar su potencial como biomarcador y contribuir al seguimiento y control de los pacientes con dengue grave. La identificación del comportamiento de esta proteína asociado a niveles hematológicos en muestras obtenidas en población pediátrica durante la fase febril aportará herramientas significativas para la toma de decisiones oportunas en el tratamiento de la enfermedad en las instituciones de salud con el fin de evitar desarrollo de complicaciones[15, 16].

4. MARCO TEÓRICO.

El dengue constituye la enfermedad viral transmitida por vectores de gran importancia a nivel mundial, producida por el virus dengue, perteneciente al género *Flavivirus* y a la familia *Flaviviridae*, el cual posee cuatro serotipos DENV-1 a DENV-4. El virus es transmitido a través de la picadura del mosquito del género *Aedes*, dentro del cual *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* representan los principales vectores distribuidos principalmente en zonas tropicales y subtropicales [17,18]. El material genético de DENV consta de una hebra sencilla de ARN de polaridad positiva el cual codifica para una poliproteína que contiene la información correspondiente para las proteínas estructurales que integran la partícula viral (proteína C, proteína E, y proteína M), y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) responsables de actividades como la replicación del virus y el ensamblaje de las partículas virales [19,20].

4.1 EPIDEMIOLOGÍA

La OMS considera a la infección por virus dengue como un importante desafío mundial en salud pública. Esta enfermedad es endémica en más de 100 países distribuidos en sudeste de Asia, el Pacífico occidental, África y América, regiones en las que la incidencia de la enfermedad ha aumentado en los últimos 50 años, debido a factores como el incremento en la población, el calentamiento global, la urbanización no planificada, las deficiencias en el control vectorial, el aumento en la frecuencia de desplazamiento debido a actividades comerciales, entre otras [14,21].

En Colombia esta enfermedad ha mostrado una dinámica creciente en los últimos 30 años, la cual se explica por el aumento en la distribución del vector en más del 90% del territorio nacional y la circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus. En el año 2010 se registró de la mayor epidemia registrada en nuestro país con más de 150 mil casos y 217 muertes, ubicando al país en el segundo lugar de los países de América Latina con mayor número de casos [22,23]. En los años posteriores a la epidemia se ha evidenciado un comportamiento variable de la enfermedad ubicándola dentro del canal endémico entre la zona de alarma y zona de brote, o incluso se ha observado una disminución significativa en la notificación de casos debido a la circulación de otros arbovirus como Chikungunya y Zika en municipios endémicos para dengue.

La distribución de la infección por dengue de acuerdo a los grupos de edad muestra que la población más afectada la integran los menores de 15 años. Por ejemplo, en el año 2014 el porcentaje de casos de dengue y dengue grave reportado en este grupo poblacional fue superior al 30% (40.48% y 39.63%) siendo los niños entre 5 y 9 años los más afectados, mientras que en los años 2015 a 2017 aunque se ha observado un cambio con una ligera disminución de los casos de dengue en los menores de 15 años, esta población presenta altos porcentajes de casos notificados y hospitalizaciones respecto a la población en general [24,25].

4.2 PATOGÉNESIS DE DENGUE Y PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD

La transmisión de dengue involucra un ciclo en el que interviene la interacción mosquito –

humano-mosquito. En el momento en el que la hembra del mosquito pica un humano infectado por DENV adquiere el virus y se infecta, el virus ingresa al sistema digestivo donde se replica y las nuevas partículas virales se transportan a las glándulas salivares, las cuales van a ser liberadas cuando ocurre un nuevo contacto con el humano en una picadura [26].
Durante la picadura, la hembra adquiere sangre dentro de su proceso de alimentación, mientras el virus presente en la saliva se inocula en la piel del hospedero e infecta diferentes tipos de células como células dendríticas, monocitos. Este proceso se conoce como periodo de incubación el cual puede tener una duración aproximada de 2 a 7 días, periodo en el cual ocurre la replicación, la diseminación del virus a otras células, y el transporte a tejidos linfoides
Una vez se establece la infección, esta puede ser asintomática o presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, las cuales varían de acuerdo a la fase de la infección, el grupo de edad afectado (niños o adultos) o incluso pueden ser similares a las que se observan en otras enfermedades [2].

En el año 2009 la OMS emitió las nuevas pautas para la definición y diagnóstico y clasificación de los caso de dengue, las cuales reemplazaron la clasificación antigua propuesta en 1997 [27]. La enfermedad tiene tres fases definidas: una fase febril la cual tiene una duración aproximada entre 3 y 7 días, una segunda fase conocida como fase crítica en la cual ocurre la defervescencia y en un porcentaje de casos la aparición de manifestaciones clínicas graves o complicaciones. La tercera fase denominada como fase de recuperación se observa la desaparición de los síntomas y una mejora significativa en el estado de los pacientes [14,28].
Aunque los signos y síntomas que se presentan durante la enfermedad se encuentran ampliamente descritos, estos no son específicos tienden a dificultar el diagnóstico y por lo tanto a realizar un manejo y tratamiento oportuno de los casos. Por este motivo la definición de la OMS de 2009 describe signos clínicos y criterios de laboratorio importantes para la definición de caso de dengue y la clasificación de los estos en dos grupos de acuerdo con el grado de severidad [14,29,30].

El primer grupo está integrado por los casos de dengue sin signos de alarma (DSSA) y los casos de dengue con signos de alarma (DSA). Los primeros se encuentran constituidos por aquellos individuos que residen en zona endémica para dengue que consultan por fiebre acompañada por dos o más síntomas como nauseas, vomito, eritema mialgias y disminución en el número de leucocitos (leucopenia). Mientras que el grupo de DSA además de cumplir los criterios del grupo de DSSA pueden presentar uno o más de los siguientes signos: vómito persistente, dolor abdominal intenso y continuo, ascitis, hemorragias (gingivorragia o epistaxis), aumento del hematocrito o disminución abrupta en el número de plaquetas, y signos de alteración neurológica como irritabilidad o somnolencia.

El segundo grupo corresponden a los casos de dengue grave, los cuales además de presentar manifestaciones de DSSA o DSA, desarrollan signos como extravasación plasmática, compromiso de órganos y alteraciones en el SNC [13,31]. Esta clasificación constituye una herramienta de apoyo para establecer el diagnostico clínico y la toma de decisiones para el manejo y el tratamiento de los pacientes con dengue [27].

4.3 COMPORTAMIENTO CLÍNICO DEL DENGUE EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

Las manifestaciones clínicas de la infección por virus dengue tienen presentaciones clínicas variables y se ha observado la presencia de características típicas de la enfermedad dependiendo de la edad de presentación del paciente. Estos hallazgos fueron documentados en estudios realizados por Hammond y cols en Nicaragua y por Alvarado-Castro y cols en México, donde compararon la prevalencia de signos y síntomas entre los diferentes grupos de edad. Los resultados mostraron que los signos clásicos del dengue como cefalea, artralgias, mialgias y dolor retroocular se presentan en más del 60% de los niños con infección por dengue confirmada. Seguido por fiebre, rash, escalofríos y los signos clínicos de sangrado como: petequias, prueba de torniquete positivo, epistaxis, gingivorragia y escalofrío presentes en más del 50% de los niños con infección confirmada por dengue. En cuento a la severidad de la infección, signos clínicos de estado de choque, fuga capilar y trombocitopenia son más prevalentes en cuanto disminuye la edad de los pacientes, es así como el 40 a 46% de los lactantes presentan DG en comparación con 30-31% de niños mayores de 6 años [15,32].

4.4 RESPUESTA INMUNE EN LA INFECCIÓN POR DENGUE

En el momento del ingreso del virus al huésped, el virus infecta inicialmente células dendríticas inmaduras, las cuales maduran y migran a los nódulos linfáticos y presentan el antígeno a los linfocitos T CD4+ y CD8+ para su activación [33,34]. Paralelamente en etapas tempranas de la infección DENV infecta monocitos, células importantes en la inmunidad innata que participan en la producción de citoquinas y quimioquinas en respuesta ante la infección. Una vez ocurre la presentación del antígeno y la activación de las células inicia la respuesta inmune adquirida, la cual se caracteriza por la expansión clonal y la generación de células efectoras productoras de citoquinas y productoras de anticuerpos, así como de células de memoria, dos poblaciones celulares esenciales para la eliminación del virus y el control dentro de una segunda exposición [35,36].

En una segunda infección producida por serotipo diferente al de la primera infección, se presenta un fenómeno conocido como Pecado Original Antigénico, en el cual las células de memoria producidas en la primo-infección reconocen con menor avidez los epítopes del serotipo del virus lo cual dificulta el control de la infección. Asimismo, en las infecciones secundarias participan los anticuerpos producidos durante la primo-infección los cuales reconocen el nuevo serotipo del virus, pero no pueden neutralizarlo, ocasionando que los complejos antígeno-anticuerpo interaccionan con los receptores Fc de los monocitos y potencian su ingreso a la célula, lo cual induce un aumento en la replicación del virus. Este proceso conocido como potenciación dependiente de anticuerpos (ADE) está relacionado con mayor viremia en los pacientes que cursan con infecciones secundarias, y un incremento en la probabilidad de desarrollar manifestaciones clínicas como extravasación plasmática y hemorragias [37,38].

Algunas investigaciones desarrolladas para comprender la patogénesis de dengue han propuesto otros mecanismos relacionados son la susceptibilidad o resistencia a la infección. Unos trabajos se han orientado en analizar los genes asociados a la severidad, como la presencia en polimorfismos en HLA, el gen que codifica para el receptor FcγRIIa, el receptor

DC-SIGN y genes de citocinas como TNF-alfa, IL-6 entre otros [39,40].
Por otro lado, otros trabajos profundizan en la búsqueda moléculas o marcadores biológicos que puedan estar asociadas con la alteración en la función de órganos durante la infección. Estas proteínas podrían ser importantes para orientar el diagnóstico y establecer de forma integrada con la clínica, el pronóstico de la infección antes de la presentación de complicaciones.

4.5 PROTEÍNA DE ALTA MOVILIDAD DEL GRUPO 1 (HMGB-1)

La proteína de alta movilidad del grupo 1 (HMGB-1), es una proteína perteneciente a la familia de proteínas de alta movilidad a la cual también pertenecen proteínas como HMGB-2, HMGB-3 y HMGB-4. HMGB1 es una proteína pequeña que contiene 216 aminoácidos y está altamente conservada en todas las especies. Estructuralmente, HMGB1 se compone de tres dominios: dos dominios de unión a ADN y un extremo C terminal con carga negativa [41,42].
Esta proteína se ubica en el núcleo de las células de diferentes organismos, es definida como no histona, sin embargo, participa en procesos esenciales como chaperona del ADN, regula la transcripción de genes y cumple un papel pleiotrópico dentro y fuera de la célula, como molécula encargada de censar y coordinar la respuesta ante el estrés de la célula y responsable de proteger a la célula frente a procesos como autofagia y muerte. Asimismo, dentro de las actividades extracelulares que ejerce esta proteína, se encuentra su actividad proinflamatoria sirviendo como alarmina y está involucrada en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias crónicas e infecciosas [42,43].

La secreción de la HMGB-1 al medio se realiza por dos formas: la primera una secreción activa, como parte de la respuesta de las células ante un estímulo como en la activación y la función efectora de las células del sistema inmune, y la segunda forma se caracteriza por la liberación pasiva, durante los procesos de necrosis celular [9,44,45]. La HMGB-1 liberada actúa como mediador soluble, permitiendo la activación células como monocitos y macrófagos y las células dendríticas, induciendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF-α, IL-6, IL-8, e IL-12 [46].

Dentro de las enfermedades en las que se ha encontrado asociada la proteína se encuentran Artritis Reumatoide (AR), enfermedad renal crónica, lupus eritematoso sistémico (LES) y cáncer [41,47,48]. Asimismo, se ha identificado variaciones importantes en la concentración de la proteína en infecciones bacterianas graves, infecciones producidas por parásitos como *Plasmodium falciparum*, e infecciones virales producidas por el virus de inmunodeficiencia humana, algunos virus relacionados con fiebres hemorrágicas severas como HFRS, CCHFV, DOBV, PUUV y CCHFV [49,50].

Uno de los momentos proinflamatorios más severos es la sepsis, en la cual se ha observado que HMGB1 es liberada por las células necróticas y apoptóticas, lo que promueve la activación proinflamatoria de las células inmunes que contribuyen a la lesión orgánica en la sepsis polimicrobiana y las condiciones inflamatorias estériles asociadas con el trauma y la hemorragia. Aunque los niveles plasmáticos de HMGB1 aumentan, se han encontrado altos niveles de HMGB1 en la circulación de los pacientes después de una

infección grave durante períodos prolongados.

En la población pediátrica se han realizado diferentes estudios en busca del comportamiento de la proteína HMGB-1 en diferentes escenarios donde el proceso inflamatorio es el principal desencadenante. Entre las infecciones virales, el virus Influenza H1N1, se ha encontrado una elevación de HMGB-1 y de la respuesta linfocitaria TH1 y TH2, asociada a su vez a citoquinas proinflamtorias entre ellas INF-γ, MIP-1, IL-6, IL-4, IL-5, IL-10, IL-18 Y MCP-1, contribuyendo a la activación del sistema inmunológico [51] .

En otras infecciones virales producidas por el virus sincitial respiratorio (VSR), hepatitis C (HCV) y herpes (HSV), se realizó un seguimiento en la liberación de la proteínas por las células inmunitarias infectadas, encontrando que HMGB-1 actúa como promotor de la liberación de citoquinas proinflamatorias, concluyendo que HMGB-1 se encuentra implicado como un mediador en la patogénesis de estas infecciones virales [52].

Existen pocos estudios que relacionan la concentración de la proteína HMGB1 en la infección por DENV. En relación a la concentración de la HMGB-1 en la infección por DENV. El estudio de Allonso y cols. En 2012, analizo las diferencias en los niveles de la proteína en muestras con diagnostico confirmado de infección por DENV dengue en población cubana respecto a un grupo de muestras de individuos sanos. El estudio encontró que los niveles en suero de la proteína son mayores en el grupo de muestras de individuos con dengue y que estos niveles varían de acuerdo al día de enfermedad y al tipo de infección ($p= 0.0004$) [53]. Un trabajo realizado por este mismo grupo de investigación profundizo sobre el potencial de esta proteína como biomarcador para el diagnóstico de dengue, el cual no encontró variación en los niveles de esta proteína entre individuos con diagnóstico de DLF y los individuos con dengue [54].

5. OBJETIVOS.

5.1 OBJETIVO GENERAL.

▪ Describir un marcador bioquímico y variables hematológicas en pacientes pediátricos con infección por virus dengue confirmado que presentan diferentes grados de severidad de la enfermedad.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar los niveles de proteína de alta movilidad de grupo 1 (HMGB-1) y de algunas variables hematológicas en pacientes pediátricos con diagnóstico confirmado de dengue.

- Identificar la asociación entre los niveles de proteína de alta movilidad de grupo 1 (HMGB-1) con las variables hematológicas con las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

- Determinar la asociación entre las manifestaciones clínicas del dengue, los niveles de proteína de alta movilidad de grupo 1 (HMGB-1) y de algunas variables hematológicas, como posibles variables predictoras de severidad en la población de estudio.

6. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Analítico, dentro del marco de un estudio de corte transversal.

6.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO.

La información clínica y las muestras de suero que se analizaron en este trabajo correspondieron a individuos menores de 18 años los cuales se dividieron en un grupo de individuos febriles con diagnóstico confirmado de dengue y un grupo de voluntarios sanos sin antecedente de infección por DENV.

El primer grupo de individuos estuvo integrado por individuos con síndrome febril que consultaron al Hospital Universitario de la Samaritana – Unidad Funcional Girardot (HUS Girardot), participantes del estudio: Establecimiento de 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", en el cual se realizó la determinación del diagnóstico clínico, la confirmación de caso de dengue por el laboratorio mediante la evaluación de un panel de pruebas de diagnostico (serológicas y moleculares), y la clasificación de caso de acuerdo al grado de severidad de la enfermedad.

El segundo grupo, que constituyó el grupo control esta integrado por individuos asintomáticos participantes del estudio: "Espectro clínico de la infección por virus dengue en una cohorte de niños de 5 a 14 años de dos municipios de Cundinamarca", el cual se realizó en los municipios de Anapoima y Apulo del departamento de Cundinamarca. El estudio realizó la evaluación clínica, serológica y virológica, con el propósito de identificar los antecedentes de infección por DENV, y evaluar la seroprevalencia y la presencia de infecciones asintomáticas en la población de estudio. A partir de la caracterización de la población se seleccionaron las muestras e información clínica y sociodemográfica de los individuos sin antecedente de infección por dengue.

El uso de las muestras y de la información clínica de los individuos de los individuos febriles y del grupo control contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario de La Samaritana acta No. 7 del 31 de octubre de 2013 (Anexo 1), acta No. 9 del 22 de agosto de 2014 (Anexo 2), acta No. 8 del 21 de julio de 2016 (Anexo 3), carta del 16 de marzo de 2017(Anexo 4), y del Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad El Bosque Acta #007-2014 del 08 de Abril de 2014 (Anexo 5).

El análisis de la información clínica y las muestras de los pacientes febriles se realizó únicamente con el propósito de identificar los niveles de la proteína HMGB-1 y de las variables hematológicas, lo que representó que la información y resultados obtenidos de este análisis tuvo un uso exclusivo en investigación, teniendo en cuenta que todos los procedimientos del estudio garantizaron la confidencialidad de la información de los pacientes manteniendo la seguridad en el uso de la información. De la misma forma la información clínica y de laboratorio.

6.3 INGRESO Y EVALUACIÓN DE LOS INDIVIDUOS CON SÍNDROME FEBRIL.

El ingreso de los individuos al estudio se realizó en el Hospital Universitario de La Samaritana- Unidad Funcional Girardot localizado en el municipio de Girardot en el departamento de Cundinamarca, institución de tercer nivel de complejidad la cual realiza la atención de la población de este municipio y sirve como centro de referencia de atención en salud para población residente en municipios de la región.
Se invitó a participar aquellos individuos con síndrome febril menor a 7 días (identificados a partir del inicio de la fiebre o los síntomas) que consultaron al servicio de urgencias, consulta externa y aquellos pacientes atendidos en el servicio de hospitalización de la institución.

Con el fin de garantizar la sensibilidad y especificidad en el proceso de inclusión de los individuos, se establecieron los siguientes criterios de inclusión y de exclusión.
▪ Criterios de inclusión: pacientes menores de 18 años que consultaron por síndrome febril menor a 7 días acompañados de signos y síntomas descritos dentro de la clasificación sugerida por la OMS en 2009.
▪ Criterios de exclusión: pacientes con síndrome febril con diagnóstico clínico de infección por un agente diferente a dengue

En el momento de atención inicial si el profesional encargado de la atención del paciente identificó que este cumplía con los criterios de inclusión establecidos, realizó la explicación del objetivo y metodología del estudio al paciente y su padre o acudiente y la invitación a participar. Una vez obtenida la aprobación se realizó el proceso para la firma del consentimiento informado (Anexo 6) .

Posterior a la firma de los documentos, el médico tratante realizó la evaluación clínica del paciente y registró los hallazgos tanto en la historia clínica de la institución como en el formato de evaluación clínica de los pacientes febriles diseñado exclusivamente para la recolección de la información de los pacientes incluidos en el estudio (Anexo 7). Finalizado este paso el médico solicitó la toma de una muestra de sangre, un tubo con EDTA para el hemograma y 1 tubo sin anticoagulante para las pruebas bioquímicas solicitadas (en caso de ser requeridas), y las pruebas de diagnostico de dengue.

Una vez obtenida la muestra se transportó al laboratorio clínico del Hospital para su procesamiento. El primer paso consistió en el procesamiento del hemograma, el cual proporcionó al médico los cambios en los parámetros hematológicas como el hematocrito, el número de leucocitos y el recuento de plaquetas. Simultáneamente el tubo sin anticoagulante se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min para separar alícuotas de suero, de las cuales se utilizó una de ellas para las pruebas de diagnóstico rápido (PDR), con el fin de detectar los anticuerpos IgM, IgG, y la proteína no estructural 1 (NS1). El volumen de suero restante se distribuyó en alícuotas y se almacenaron a -20℃ hasta el momento del transporte al laboratorio de virología.

Los resultados del hemograma y de las PDR se reportaron en el menor tiempo posible al

médico para complementar el diagnóstico clínico, y continuar con el proceso de atención siguiendo el protocolo de atención de pacientes establecido por la institución. En este momento el médico tratante determinó si era necesario hospitalizar al paciente o si este podía recibir el tratamiento de forma ambulatoria.

6.4 INGRESO Y EVALUACIÓN DE LOS VOLUNTARIOS SANOS.

Para desarrollar el proceso de captación de individuos sanos en el estudio, el primer paso comprendió la socialización del estudio a los rectores, los docentes y a la comunidad de las instituciones educativas de los municipios de estudio. Para ello se realizaron charlas informáticas en las cuales se planteó el objetivo del estudio y se respondieron inquietudes a aquellos padres de familia que manifestaron interés en que su hijo(a) participara. Una vez realizado este proceso se programaron citas con los menores y los padres o tutores con el fin de realizar la explicación del estudio, el proceso de firma del asentimiento (Anexo 8) y del consentimiento informado (Anexo 9), un examen médico completo (Anexo 10) y la toma de una muestra de sangre para el diagnóstico de dengue. Una vez obtenidas las muestras, se centrifugaron y se hicieron alícuotas de plasma y células, las cuales se almacenaron a -20ºC, hasta el momento del transporte al laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque en Bogotá donde se realizaron la pruebas serológicas y virológicas para el diagnóstico de dengue.

6.5 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.

1. Procesamiento de las muestras en el sitio de atención del paciente.
Las pruebas para la detección de anticuerpos IgM e IgG y la detección de la proteína NS1 de DENV, se realizaron utilizando los kits Dengue Duo Cassette y Dengue Early Rapid de Panbio, (Alere), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Procesamiento de las muestras en el laboratorio de Virología.
El proceso de recepción de los formatos del estudio y las muestras en el laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque en Bogotá. La muestra de suero se separó en tres alícuotas las cuales se almacenaron a -80 grados hasta el momento del procesamiento de las pruebas de ELISA (IgM, IgG de captura, IgG indirecta, NS1), la detección del ARN de DENV por PCR anidada, y la alícuota de banco para la evaluación de la proteína HMGB1.

6.6 DEFINICIÓN DEL DIAGNOSTICO DE DENGUE.

La definición de caso de dengue en los individuos febriles se realizó a partir de la información clínica obtenida durante el seguimiento del paciente en la institución y los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio que incluyó las pruebas de diagnóstico rápido, las pruebas hematológicas o bioquímicas realizadas a los pacientes durante su atención y los resultados de las pruebas serológicas y moleculares realizadas a la muestra obtenida durante la fase febril. Se consideró caso de dengue por el laboratorio si la muestra

tuvo un resultado positivo en alguna de las siguientes pruebas: RT-PCR, PDR IgM o en la prueba de ELISA IgM específica para dengue, PDR NS1 o en la prueba de ELISA para NS1, PDR IgG o en la prueba de ELISA IgG de captura que permite identificar infecciones secundarias por DENV.
Los pacientes que cumplieron con los criterios clínicos y de laboratorio se definieron como casos confirmados de dengue, mientras que los pacientes que cumplieron con los criterios clínicos, pero con diagnóstico de laboratorio negativo se clasificaron en un grupo denominado de síndrome febril no dengue (SF).

En el caso de los voluntarios sanos el diagnóstico se estableció tomando como parámetro un resultado negativo en la prueba de ELISA IgM, resultado negativo en la ELISA IgG de captura, así como un resultado negativo la prueba de ELISA IgG Indirecta. La ausencia de anticuerpos IgG en la ELISA Indirecta demostró que el individuo no había desarrollado infecciones previas por DENV.

6.7 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA DE ALTA MOVILIDAD DEL GRUPO 1 (HMGB-1).

Para detectar y cuantificar la proteína HMGB-1 en los individuos con dengue o sin antecedente de infección por DENV se utilizó el kit de ELISA tipo sándwich Human High Mobility Group Protein B1 (HMGB-1) de MyBioSource, siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura se realizó por espectofotometría a 450 nm y los rangos de sensibilidad del kit oscilan entre 78 a 5.000 pg/ml.

6.8 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE VARIABLES HEMATOLÓGICAS EN SUERO DE PACIENTES

A las muestras evaluadas previamente para la detección de la concentración de la proteína HMGB1, también se les realizó un hemograma de tercera generación en el cual se identificó el nivel de glóbulos rojos, de leucocitos y plaquetas, así como los valores de hemoglobina, hematocrito, los índices hematimétricos (VCM, HCM, CCMH), el análisis de las diferentes poblaciones de glóbulos blancos (neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos) y algunos índices plaquetarios como el volumen plaquetario medio, y el plaquetocrito.

6.9 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Dentro del conjunto de variables que se analizaron en el presente trabajo se incluyeron variables sociodemográficas obtenidas durante la valoración inicial realizada al paciente en la institución, variables clínicas que comprendieron signos y síntomas reportados por el paciente o el padre o tutor, hallazgos clínicos identificados durante el examen realizado por el médico tratante, variables de laboratorio obtenidas de la muestra tomada al paciente el día de ingreso al estudio. Asimismo, el estudio contempló el análisis de las variables

correspondientes a las pruebas realizadas en el laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque para la confirmación de caso de dengue y las variables correspondientes a los niveles de las moléculas que corresponden al objeto de estudio de este trabajo.

Tabla 1. Variables clínicas evaluadas.

VARIABLE	DEFINICION	TIPO	CATEGORIAS
Edad	Tiempo de vida en años de cada paciente teniendo en cuenta la fecha de nacimiento al momento de la consulta	Cuantitativa	Lactante: Menor de 2 años de edad. Preescolar: Entre 2 y 5 años. Escolar: Entre 5 y 12 años de edad. Adolescente: Entre 12 y 18 años de edad.
Sexo	Género al que pertenece el individuo	Cualitativa nominal categórica	Masculino Femenino
Antecedente de infección por hallazgos serológicos	Diagnóstico de infección por virus dengue encontrado por pruebas serológicas positivas para exposición previa a virus dengue (ELISA IgG de indirecta para DENV).	Cuantitativa	Sí No
Tiempo de inicio de síntomas	Tiempo de inicio de los síntomas reportada en días, teniendo en cuenta el momento de la consulta	Cualitativa ordinaria	< 3 días 4 - 7 días >7 días

Síntomas	Referencia subjetiva que relata el paciente o su padre o cuidados, describiendo su estado patológico.	Cualitativa nominal categórica	Cefalea Escalofrío Sudación Dolor retro ocular Dolor osteomuscular Dolor de garganta Astenia Debilidad Alteración de la diuresis Mareo Rinorrea Disminución del apetito Tos Prurito Rash Nauseas Vomito Diarrea Dolor abdominal Epistaxis Gingivorragia Hematemesis
Signos vitales	Conjunto de variables fisiológicas que los médicos analizan para la valoración de las funciones orgánicas elementales.	Cuantitativa	Frecuencia cardiaca Frecuencia respiratoria Tensión arterial (sistólica/diastólica) Temperatura
Síntomas	Manifestaciones clínicas objetivas, confiables y observadas en la exploración médica.	Cualitativa nominal categórica	Fiebre Postración Palidez Deshidratación Alteración ocular Eritema Cardiopulmonar Derrame pleural Dolor a la palpación abdominal Hepatomegalia Esplenomegalia Alteración diuresis Convulsiones Ascitis Edema Exantema Petequias Sangrado espontáneo Melenas

Pruebas de diagnóstico	Sistema analítico que permite a partir de un resultado definir el diagnóstico.	Cualitativa nominal categórica	Pruebas de diagnóstico rápido (PDR) IgM: (positivo/negativo) IgG: (positivo/negativo) NS1: (positivo/negativo) Pruebas de ELISA: IgM (positivo/negativo) IgG captura (positivo/negativo) IgG indirecta (positivo/negativo) NS1 (positivo/negativo) RTP-PCR (positivo/negativo)
Diagnóstico definición de caso	Clasificación de los individuos de acuerdo al diagnóstico por el laboratorio.	Cualitativa nominal categórica	Caso: Dengue. No caso: Síndrome febrile no dengue. Control: Individuos sin antecedente de infección por DENV.
Clasificación de la enfermedad.	Clasificación de acuerdo a los criterios OMS 2009	Cualitativa nominal categórica	Dengue sin signos de alarma (DSSA) Dengue con signos de alarma (DSA) Dengue grave (DG)
Variables Hematológicas	Recuentos celulares e indices hematimétricos obtenidos en el hemograma.	Cuantitativa	Leucocitos ($x10^3/mm^3$). Neutrófilos ($x10^3/\mu L$) Linfocitos ($x10^3/\mu L$) Monocitos ($x10^3/\mu L$) Eosinófilos ($x10^3/\mu L$) Basófilos ($x10^3/\mu L$) Eritrocitos ($X10^6/mm^3$) Hemoglobina (g/dl) Hematocrito (%) Volumen corpuscular medio (fL) Hemoglobina corpuscular media (pg) Concentración corpuscular media de Hb (g/dL) Volumen Plaquetario medio (fL) Plaquetas ($x10^3/mm^3$) Plaquetocrito (%)
Concentración de HMGB-1	Niveles de la proteína en los casos de dengue, síndromes febriles y controles.	Cuantitativa	HMGB-1 (ng/ml)

6.10 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.

Los datos clínicos y de los laboratorios fueron ingresados en una base de datos en Microsoft Excel 2016, la cual fue revisada y auditada antes del paso al programa estadístico Stata 12.1 para análisis. Inicialmente se realizó la evaluación de las variables, la descripción de las frecuencias de las manifestaciones clínicas de acuerdo a la clasificación de la enfermedad.

Para ello se evaluó la evaluación de la distribución de las variables numéricas en cada uno

de los grupos de estudio mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

Los datos obtenidos sobre la concentración de la proteína HMGB-1 y valores hematológicos que complementaron la base de datos para su inclusión dentro del análisis. El primer paso comprendió la descripción de los niveles de estas moléculas en las muestras evaluadas, posteriormente se realizó la determinación en los grupos de diagnóstico de acuerdo a la presencia o ausencia de signos clínicos, para establecer las comparaciones. Por ejemplo, los niveles de e HMGB-1 y de las variables hematológicas en los individuos con manifestaciones clínicas leves o manifestaciones clínicas severas y su relación con severidad.

Tomando como referencia la distribución se las variables se realizó el análisis mediante el uso de pruebas paramétricas como ANOVA de una vía, o mediante la aplicación de pruebas estadísticas no paramétricas como la prueba de Kruskall-Wallis para determinar las diferencias entre los grupos de estudio. De forma similar, el cálculo de los coeficientes de correlación de entre la concentración de HMGB-1 y las variables hematológicas, se realizó teniendo en cuenta la distribución de los datos, para su posterior interpretación con el diagnóstico.

6.11 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Las actividades del estudio relacionadas con el análisis de las muestras de individuos con dengue y de los individuos sin antecedente de infección tuvo en cuenta las Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para investigación en salud establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993, y la Resolución No.002378 del 25 de junio de 2008, establecida por el Ministerio de Protección Social. Adicionalmente se tendrán en cuenta las pautas éticas internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la OMS.

La recolección de las muestras y la recolección de la información clínica en los formatos de evaluación clínica se clasificaron como de investigación con riesgo mínimo.
El uso y procesamiento de las muestras de los individuos se realizó teniendo en cuenta la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario de La Samaritana, las cuales hicieron parte del estudio titulado: Establecimiento de 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 (Acta 31 octubre de 2013 y 22 de agosto de 2014). Adicionalmente el segundo componente del estudio que comprendió la determinación de los niveles de la proteína HMGB-1 y la medición de citoquinas y quimioquinas, que contó con la aprobación del Comité de Ética del Centro de Investigaciones del Hospital Universitario de La Samaritana para el uso de las muestras dentro de las actividades propuestas en el estudio: Identificación de los biomarcadores asociados a activación y disfunción endotelial en la infección por virus dengue y la severidad de la enfermedad (Acta No. 8 de 21 de Julio de 2016, Acta 16 de Marzo de 2017). En el caso de los individuos pertenecientes al grupo control, la recolección de la

información, el uso de las muestras para el diagnóstico y los niveles de HMGB-1 contó con la aprobación del Comité de ética en investigaciones (Acta #007-2014) del 08 de abril de 2014.

El procesamiento y análisis de la información clínica y del laboratorio de los pacientes se realizó siguiendo el código asignado al individuo en el momento de ingreso al estudio, para mantener la confidencialidad de la información. El acceso a las historias clínicas y a la base de datos del estudio fue otorgado únicamente a los investigadores del estudio por los que el nombre del paciente, ni sus datos personales como documento de identidad, número de teléfono de contacto o dirección fueron divulgados dentro de los resultados del estudio.

7. RESULTADOS

Se realizó la evaluación de la información clínica y de laboratorio de 123 individuos menores de 18 años durante el período comprendido entre marzo de 2014 y junio de 2015, 97 individuos que consultaron por síndrome febril al HUS - Girardot, y 26 individuos asintomáticos (voluntarios sanos) residentes en el área de estudio, los cuales se incluyeron en instituciones educativas (IE) que se consideraron como grupo control.

La mediana de la edad de la población de estudio fue de 8 años (5 a 11 años), la cual se clasificó de acuerdo al grupo etareo de la siguiente forma: 11.4% lactantes, 10.6% preescolares, 53.6% escolares y el 24.3% adolescentes. La distribución de acuerdo al sexo mostró un mayor porcentaje de hombres respecto al de mujeres, 58.4% vs. 41.5% respectivamente (Tabla 1). El 60% de los niños con síndrome febril sugestivo de dengue incluidos en el estudio consultaron a la institución entre el día 4 a 7 de enfermedad, seguido de un 25.6% los pacientes que se encontraban con 3 días o menos de enfermedad.

Tabla 2. Descripción de la población de estudio.

Variable		Población de estudio		DSSA 17 (13.8%)		DSA 51 (41.4%)		DG 17 (13.8%)		OFI 12 (9.8%)		Control 26 (21.14%)		*p*
		N (%)	Mediana (RI)	n (%)	Mediana (RI)	n (%)	Mediana (RI)	n (%)	Mediana (RI)	n (%)	Mediana (RI)	n (%)	Mediana (RI)	
Edad (años)		-	8 (5 - 11)	-	5 (3 - 11)	-	8 (6 - 13)	-	10 (6 - 14)	-	6.5 (1.5 - 8.5)	-	7.5 (5 - 11)	*<0.001†*
Grupo de edad	Lactantes	14 (11.4%)	-	3 (21.4%)	-	6 (42.9%)	-	0 (0%)	-	5 (35.7%)	-	0 (0%)	-	*<0.0001*
	Preescolar	13 (10.5%)	-	5 (38.5%)	-	5 (38.5%)	-	3 (23.1%)	-	0 (0%)	-	0 (0%)	-	
	Escolar	66 (53.6%)	-	6 (9.1%)	-	25 (37.9%)	-	7 (10.6%)	-	5 (7.6%)	-	23 (34.9%)	-	
	Adolescente	30 (24.3%)	-	3 (10.0%)	-	15 (50.0%)	-	7 (23.3%)	-	2 (6.7%)	-	3 (10.0%)	-	
Sexo	Femenino	51 (41.7%)	-	8 (47.1%)	-	19 (37.3%)	-	9 (52.9%)	-	3 (25.0%)	-	12 (46.2%)	-	*0.543*
	Masculino	72 (58.54%)	-	9 (52.9%)	-	32 (62.7%)	-	8 (47.1%)	-	9 (75.0%)	-	14 (53.8%)	-	
Día de enfermedad*	Menor de 3	23 (25.6%)	-	8 (50.0%)	-	9 (13.4%)	-	0 (0%)	-	6 (54.6%)	-	-	-	*0.004 †*
	Entre 4 -7 días	54 (60.0%)	-	5 (31.3%)	-	33 (67.3%)	-	12 (85.7%)	-	4 (36.4%)	-	-	-	
	Mayor 7 días	13 (14.4%)	-	3 (18.7%)	-	7 (14.3%)	-	2 (14.3%)	-	1 (9.1%)	-	-	-	
Fiebre (Presencia)*		13 (10.9%)	-	4 (25.0%)	-	4 (7.8%)	-	1 (6.2%)	-	4 (33.3%)	-	0 (0%)	-	*0.008*
Tipo de infección	Primaria	11 (11.3%)	-	5 (29.4%)	-	4 (7.8%)	-	2 (11.8%)	-	-	-	-	-	*<0.001*
	Secundaria	74 (76.3%)	-	12 (70.6%)	-	47 (92.2%)	-	15 (88.2%)	-	-	-	-	-	

DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Sindrome febriles.

En la valoración médica del grupo de individuos que consultaron por síndrome febril se identificó que la presencia de mialgias (76.7%), cefalea (71.6%) y el dolor abdominal (62.6%), fueron los síntomas que mostraron mayor frecuencia en la población de estudio. Por otro lado, en el grupo de individuos asintomáticos (grupo control) la fiebre y cefalea fueron reportadas por los padres de 2 menores, como síntomas desarrollados por los niños 15 días antes de la valoración médica o el ingreso al estudio.

Las muestras grupo de individuos febriles como las muestras de los individuos sanos se procesaron para realizar el diagnóstico de la infección por DENV. En el caso del grupo de individuos con síndrome febril (n=97), el porcentaje de muestras positivas en las pruebas de diagnóstico rápido fue 53.6% para IgM, 72.2% para IgG y para NS1 solo el 2.1% resultaron positivas. Posteriormente, al realizar las pruebas de ELISA para estas muestras se encontró que las muestras positivas para IgM, IgG de Captura y NS1 fue de 48.8%, 45.5% y 1.5% respectivamente. De estas muestras solo en el 2.1% se detectó ARN del serotipo 2 de

DENV por RT-PCR (n=2). Adicionalmente, al realizar la prueba de ELISA IgG indirecta en estos individuos febriles se encontró que el 80.4% de los niños tenían anticuerpos específicos contra DENV. Por otro lado, en el grupo de niños asintomáticos (n=26), la totalidad de las muestras resultaron negativas en las pruebas para IgM y ELISA IgG Indirecta, lo que mostró que los individuos de este grupo no habían presentado infecciones por DENV, lo cual permitió determinar a este grupo de individuos como grupo control.

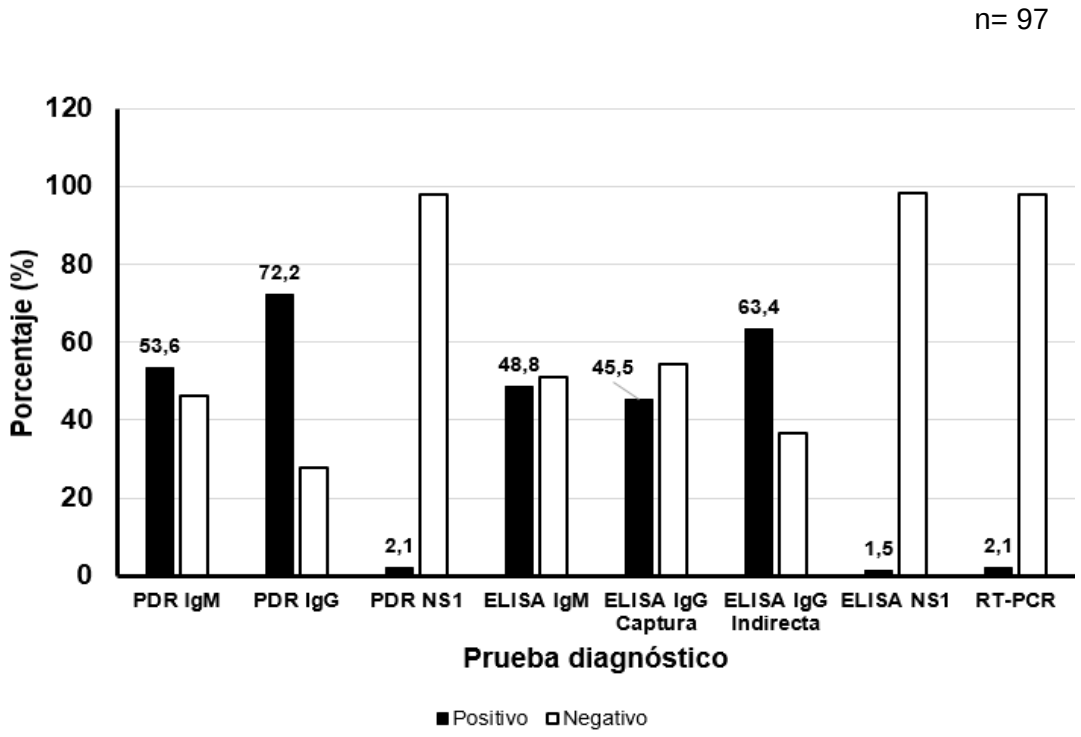

Figura 1. Resultados pruebas de diagnóstico en los individuos febriles.

Tomando como referencia los criterios clínicos y de laboratorio para la definición de caso de dengue en los individuos que consultaron por síndrome febril, se hizo la definición del diagnóstico y la clasificación de los casos de dengue de acuerdo al grado de severidad de la enfermedad. De esta forma, el diagnóstico de caso de dengue se confirmó en el 87.6% de los individuos, mientras que el 12.4% restante se definieron como síndrome febril indiferenciado (SF). De los casos de dengue confirmados, el 20.0% se clasificaron como casos de DSSA, el 60.0% a DSA y el 20.0% como casos de dengue grave (DG).

Teniendo en cuenta la definición de los grupos de diagnóstico, el primer paso del análisis comprendió la evaluación de la distribución de los individuos de acuerdo a la edad, el género y los signos vitales en los cinco grupos de estudio. En relación a la distribución de los individuos de acuerdo a la edad, se identificaron diferencias en grupos de estudio ($p<0.001$). Por ejemplo, en el grupo de casos de dengue se identificó que el mayor porcentaje de niños en edad preescolar estaba en el grupo de DSSA (35.3%), similar a la población que integra el grupo de DSA y el grupo control 49.0% y 88.6%, respectivamente.

Por otro lado, el grupo de escolares y adolescentes fue el mismo en los casos de dengue grave, similar a la observado en el grupo de SF que el porcentaje de individuos lactantes y escolares presentaron fue igual.

No se identificaron diferencias de acuerdo al sexo en los grupos de estudio (p=0.449) y al evaluar algunas de las variables obtenidas durante la toma de signos vitales, como la frecuencia cardiaca y la tensión arterial, no se encontraron diferencias entre los casos de dengue respecto a los valores en los individuos con síndrome febril y los controles (p>0.005). Por otro lado, al evaluar estas variables en los grupos clasificados de acuerdo al grado de severidad de la enfermedad se encontraron diferencias en la frecuencia cardiaca. (Tabla 2 y 3).

En el caso de las variables temperatura y frecuencia respiratoria el valor de *p* obtenido mediante la aplicación de pruebas no paramétricas mostró significancia estadística al comparar los casos de dengue, los individuos con síndrome febril y los controles *p=0.0033* y *p=0.0027* (Datos no mostrados*)*. Cabe resaltar, que a pesar de que la principal causa de consulta es la fiebre, la evidencia del aumento de temperatura en el momento de la valoración y atención del niño(a) solo fue del 13.7% de los niños que consultaron a la institución por síndrome febril. Adicionalmente al analizar el día de enfermedad de los individuos febriles evaluados en el cual se encontraban en el momento de la toma de la muestra para el diagnóstico, se identificó que el mayor porcentaje de los individuos de los grupos de DSA y DG consultó entre el día 4 y 7, mientras que en el grupo de DSSA el 50% de los individuos consultó en los primeros tres días (Tabla 2).

Tabla 3. Descripción de los signos vitales de los individuos de acuerdo al diagnóstico.

Variable	Población de estudio N=123	DSSA 17 (13.8%)	DSA 51 (41.4%)	DG 17 (13.8%)	OFI 12 (9.8%)	Control 26 (21.14%)	*p*
	Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)	
Temperatura (°C)	36.8 (36.5-37.0)	37 (37.0-38.3)	37.0 (36.5-37.0)	36.5 (36.45-37.0)	37.0 (3-38.3)	36.5 (36.2-36.7)	*0.0006*
Frecuencia cardiaca (lat/min)	88 (80 - 100)	91 (85.5 - 110)	92 (80 - 100)	80 (69-100)	85.5 (80 - 102.5)	84 (80-88)	*0.0250*
Frecuencia respiratoria (resp/min)	20 (18-22)	20 (20-23.5)	20 (19-22)	20 (18-23)	20 (20-22)	17.5 (14 -20)	*0.0157*
Tensión arterias sistólica	100 (90-100)	93 (90-100)	99 (91-100)	106 (94 -114.5)	96 (93-100)	100 (90-100)	*0.3068*
Tensión arterial diastólica	60 (60-68)	60 (50-70)	60 (60-70)	60 (60 - 67.5)	60 (56-80)	60 (60-75)	*0.7494*

Diferencias calculadas en los cinco grupos de estudio utilizando la prueba de Kruskal Wallis

DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Sindrome febriles.

Posteriormente, se evaluó la frecuencia de las variables clínicas reportadas por los pacientes o sus cuidadores en el examen médico. La presencia de cefalea y el dolor mialgias fueron síntomas que predominaron en los casos de dengue con porcentajes superiores al 60%, mientras que el vómito y el dolor abdominal a pesar de estar presentes en los tres grupos de casos confirmados mostraron mayores porcentajes en los grupos de DSA y DG respecto a los individuos con DSSA (Figura 2).

De forma similar, en los individuos clasificados dentro del grupo de SF, la presencia de fiebre, el dolor abdominal y deshidratación fueron los síntomas que presentaron porcentajes más altos 33.2%, 16.6% y 9.1% respectivamente. Adicionalmente, al evaluar las diferencias entre estos signos en los casos respecto al grupo de individuos con SF, la presencia de mialgias y el dolor abdominal fueron los signos en los que se encontró
estadística $p=0.017$ y $p<0.001$.

En relación a los hallazgos clínicos evidenciados durante el examen médico, se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre el diagnóstico la presencia de algunos signos específicos como el dolor abdominal a palpación, hepatomegalia, el derrame pleural. Estas diferencias se explican por la participación de estos signos dentro del grupo de criterios que integran la clasificación de caso de dengue sugerida recientemente por la OMS. Esta clasificación basada en su mayoría en el diagnóstico clínico permite definir un mayor porcentaje de casos para realizar un manejo y tratamiento oportuno de la enfermedad.

El porcentaje de pacientes con DSA y DG en los que se evidenció dolor abdominal a palpación fue de 76.5% y 70.5%, localizado principalmente y epigastrio y en hipocondrio derecho en los casos de DSA (36.4% y 30.3%), mientras que en el 83.3% de los casos de DG la mayor frecuencia se encontró en hipocondrio derecho. La presencia de hepatomegalia, ascitis y edema en los casos fue superior en los casos de DG respecto a los de DSA 41.2% vs. 7.8%, 62.5% vs, 8.2% y 31.2% vs. 9.8%. Solo un paciente del grupo de SF desarrolló hepatomegalia, y en un paciente se encontró edema (Figura 3).

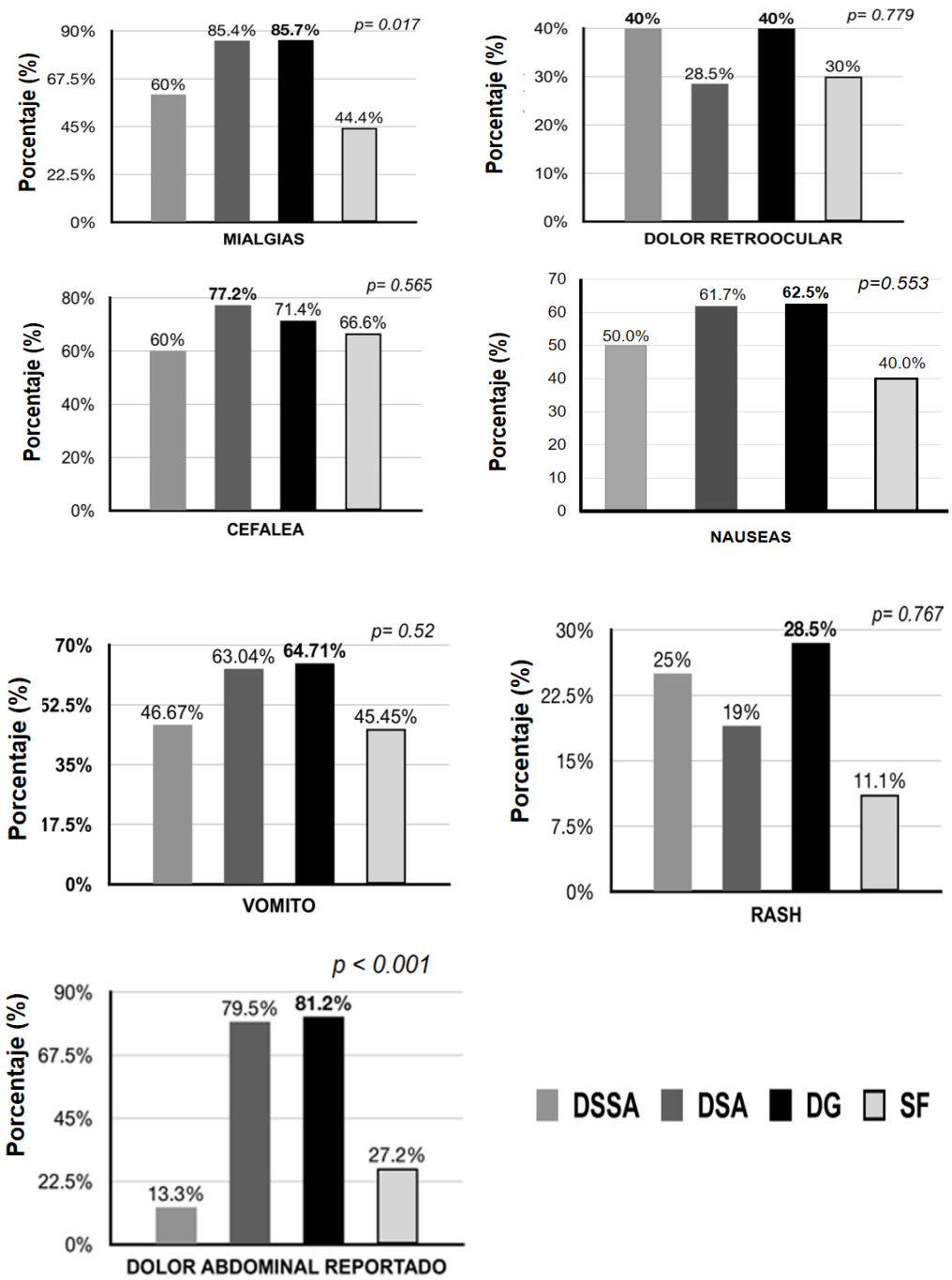

Figura 2. Síntomas reportados por los individuos febriles y el padre o cuidador al médico en el momento de ingreso al estudio.
DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Sindrome febriles.

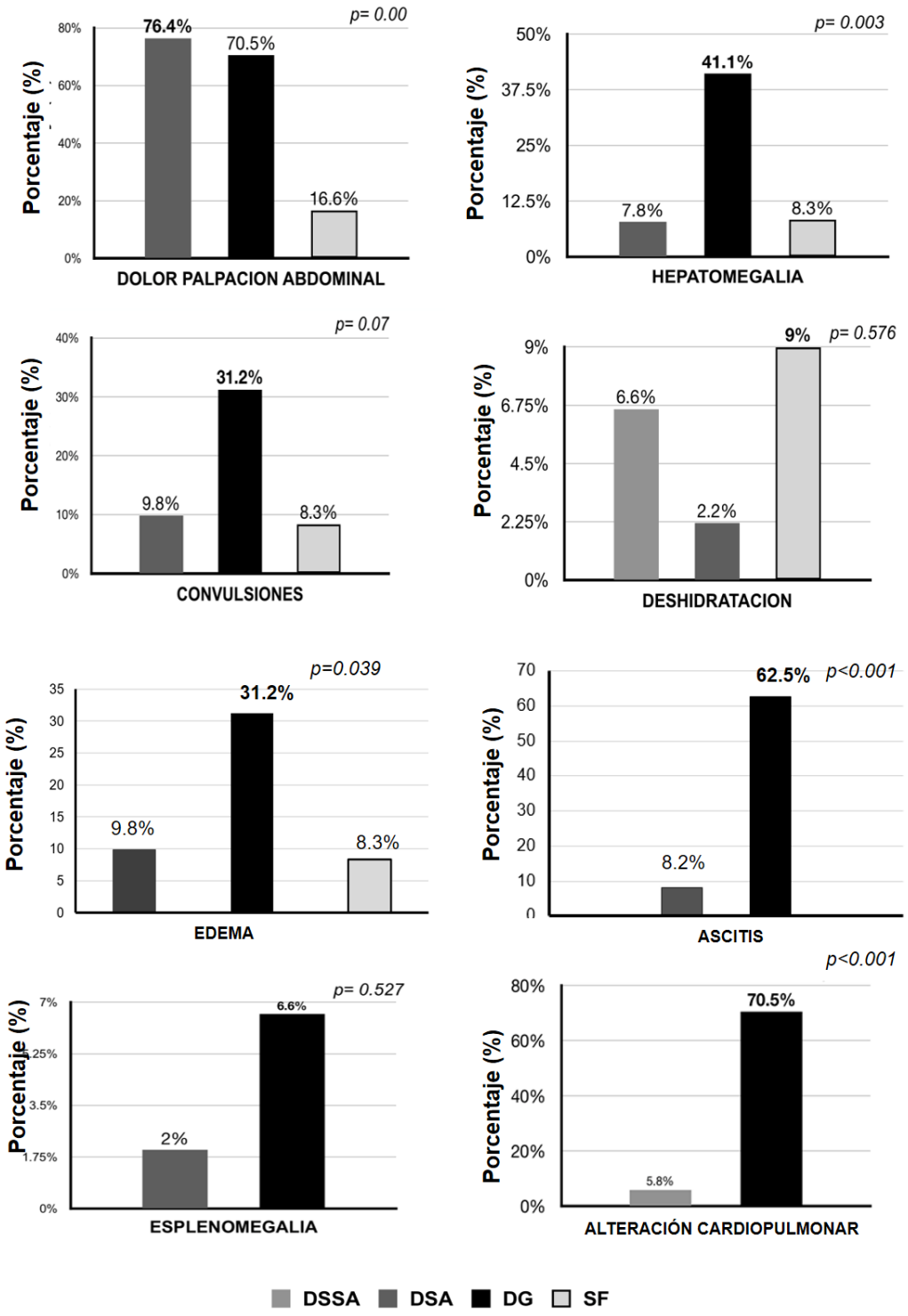

Figura 3. Hallazgos clínicos identificados por el médico en el momento de la valoración clínica.
DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Sindrome febriles.

7.1 Descripción de las variables hematológicas

Tomando como referencia las variaciones de algunas poblaciones celulares que se evidencian durante el curso de la infección por DENV, especialmente las células que componen el sistema hematopoyético así como de aquellas células que participan en la respuesta inmune, se realizó el análisis de los recuentos celulares y de los índices hematimétricos reportados en el hemograma.
La evaluación del recuento de leucocitos, el valor de la hemoglobina y el hematocrito entre los casos de dengue respecto a los valores obtenidos en el grupo de SF, no arrojó diferencias significativas (p=0.1778, p=0.2929, p=0.2668). Sin embargo, al analizar el número de plaquetas en estos pacientes se encontraron diferencias significativas (p=0.0019).

Por otro lado, cuando se analizó el número de leucocitos, el valor de la hemoglobina, el hematocrito y el recuento de plaquetas de forma simultánea los cuatro grupos de individuos febriles con diagnóstico confirmado (DSSA, DSA, DG y SF), no se observaron diferencias para estos parámetros. De forma contraria, cuando se evaluó el número de neutrófilos y el volumen plaquetario medio en los grupos de estudio los valores de p obtenidos fueron *p= 0.035* y *p=0.002* (Figura 5).

Tabla 4. Variables hematológicas en los individuos clasificados de acuerdo al diagnóstico**.**

Variable	DSSA 17 (17.5%)		DSA 51 (52.6%)		DG 17 (17.5%)		SF 12 (12.37%)		*p*
	n (%)	Mediana (RI)	n (%)	Mediana (RI)	n (%)	Mediana (RI)	n (%)	Mediana (RI)	
Leucocitos ($x10^3/mm^3$)		6.2 (4.3 - 7.2)		6 (4.2- 8.0)		6.1 (4.6 - 8.1)		8 (4.65 - 12.05)	***0.4946***
Leucopenia (Si)	5 (29.4%)		19 (37.2%)		3 (17.7%)		3 (25.0%)		*0.486 †*
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)		172 (123.9 - 270)		101 (65 -104)		105 (82 - 164)		225.5 (151.5 - 327.5)	*0.0001*
Trombocitopenia (Si)	6 (35.3%)		42 (82.4%)		11 (64.7%)		2 (25.0%)		*<0.001 †*
Neutrofilos ($x10^3/\mu L$)		1.8 (1.3 - 2.8)		1.9 (1.2 - 2.9)		2.2 (1.7 - 2.8)		4.4 (3.4 - 6.8)	*0.0356*
Linfocitos ($x10^3/\mu L$)		3.4 (1.3 - 2.8)		2.8 (1.6 - 4.8)		3.2 (2.0 - 5.2)		1.5 (0.5 - 2.8)	*0.1124*
Monocitos ($x10^3/\mu L$)		0.5 (0.3 - 0.6)		0.4 (0.33 - 0.7)		0.5 (0.4 - 0.6)		0.6 (0.2 - 0.7)	*0.8921*
Eosinófilos ($x10^3/\mu L$)		0.6 (0.0 - 0.2)		0.1 (0.0 - 0.2)		0.1 (0.06 - 0.3)		0 (0.0 - 0.1)	*0.1256*
Basófilos ($x10^3/\mu L$)		0 (0.0 - 0.2)		0.01 (0.0 - 0.1)		0 (0.0 - 0.02)		0 (0.0 -0.0)	*0.0227*
Eritrocitos ($X10^6/mm^3$)		4.4 (4.2 - 4.62)		4.5 (4.2 - 4.9)		4.4 (4.2 - 5.5)		4.4 (4.2 - 4.65)	*0.5574*
Hemoglobina (g/dl)		12.2 (11.3 - 13.0)		12.5 (11.7 - 13.8)		12.5 (11.6 - 14.7)		12.4 (11.1 - 12.9)	*0.300†*
Hematocrito (%)		36 (33.9 - 38.1)		36.9 (34.8 - 42.0)		35.7 (34.7 - 44.6)		35.2 (32.2 - 38.6)	*0.2669*
VCM (fL)		80.7 (78.8 - 87.8)		82.2 (79.6 - 85.5)		83 (80.3 - 85.6)		81.9 (79.2 - 83.4)	*0.8898*
HCM (pg)		27.6 (26.0 - 29.2)		28.4 (26.6 - 29.3)		27.9 (26.7 - 28.7)		27.95 (26.6 - 28.7)	*0.8846*
CCMH (g/dL)		33.8 (33.3-34.4)		33.9 (33.4 -35.0)		33.5 (33.0 - 34.2)		34.2 (33.6 - 34.7)	*0.1931*
VPM (fL)		8.7 (8.3 - 9.1)		9.8 (9.0 - 10.6)		9.8 (9.2 - 10.2)		8.8 (7.05 - 9.5)	*0.002*
Plaquetocrito (%)		1.8 (1.4- 2.4)		0.8 (0.5 - 1.3)		1.1 (0.8 - 1.7)		1.8 (1.1-1.9)	*0.0005*

Diferencias calculadas mediante la prueba de Kruskal Wallis † Diferencias calculadas con la prueba exacta de Fisher
ƒ Diferencia evaluada por ANOVA de una vía

DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Sindrome febriles.
VCM: Volumen Corpuscular Medio. HCM: Hemoglobina Corpuscular Media. CCMH: Concentración Corpuscular Media Hemoglobina corpuscular media. VPM: Volumen Plaquetario Medio.

7.2 Niveles de la proteína HMGB-1 en los grupos de estudio.

La determinación de la concentración de la proteína HMGB-1 mostró variaciones entre los grupos. La mediana obtenida en los casos de dengue fue de 3.7 ng/ml, en el grupo de SF de 3.2 ng/ml, mientras que el grupo control fue de 11.3 ng/ml (Tabla 5). Al evaluar las diferencias entre estos tres grupos de individuos mediante la prueba de Kruskal Wallis se observó un valor de *p* significativo (*p=0.0001*), mientras que al analizar por esta misma prueba el grupo de casos respecto al grupo de SF, no se identificaron diferencias entre estos grupos *p=0.5876* (Figura 4A).

Tabla 5. Niveles de la proteína HMGB-1 en los grupos de estudio**.**

Variable	Población	Dengue			Febril no dengue	Sin antecedente infección DENV	*Valor p*			
	N=123	DSSA 17 (13.8%)	DSA 51 (41.4%)	DG 17 (13.8%)	SF 12 (9.8%)	Control 26 (21.14%)	*Dengue vs. Control*	*SF vs. Control*	*Dengue (DSSA, DSA, DG)*	*Febriles Dengue vs. SF*
	Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)	Mediana (RI)				
HMGB-1 (ng/ml)	5.2 (2.4 - 11.5)	10.6 (2.5 -12.1)	3.4 (2.2 - 8.3)	3.2 (2.3 - 5.9)	3.2 (1.6 - 13.7)	11.2 (7.9 - 15.1)	*0.0001*	*0.0185*	*0.2620*	*0.4489*

DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Sindrome febriles.

La comparación de los niveles de esta proteína en los casos de dengue clasificados de acuerdo al grado de severidad, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, DSSA vs. DG *p= 0.1630,* DSA vs. DG *p= 0.9098 y D*SSA vs. DSA *p= 0.1261.* Por otro lado, al comparar los casos de dengue, el grupo SF, e incluir el grupo control, se encontraron diferencias entre los cinco grupos *(p=0.0001).* Estas diferencias se conservaron al comparar los niveles de HMGB-1 de DSA, DG y OFI respecto al grupo control *p=0.0001*, *p=0.0001* y *p=0.0185* respectivamente, mientras que al comparar la concentración en el grupo de DSSA y en el grupo control el valor de p obtenido fue *p=0.0757* (Figura 4B).

De forma complementaria, en el análisis realizado a partir de la concentración de la proteína HMGB-1 de acuerdo a la edad y el diagnóstico no se identificaron diferencias estadísticamente significativas. Un comportamiento similar se presentó cuando se analizó la concentración de HMGB1 de acuerdo al género en los casos de dengue, en los febriles no dengue y en los controles sanos *(p>0.005).*

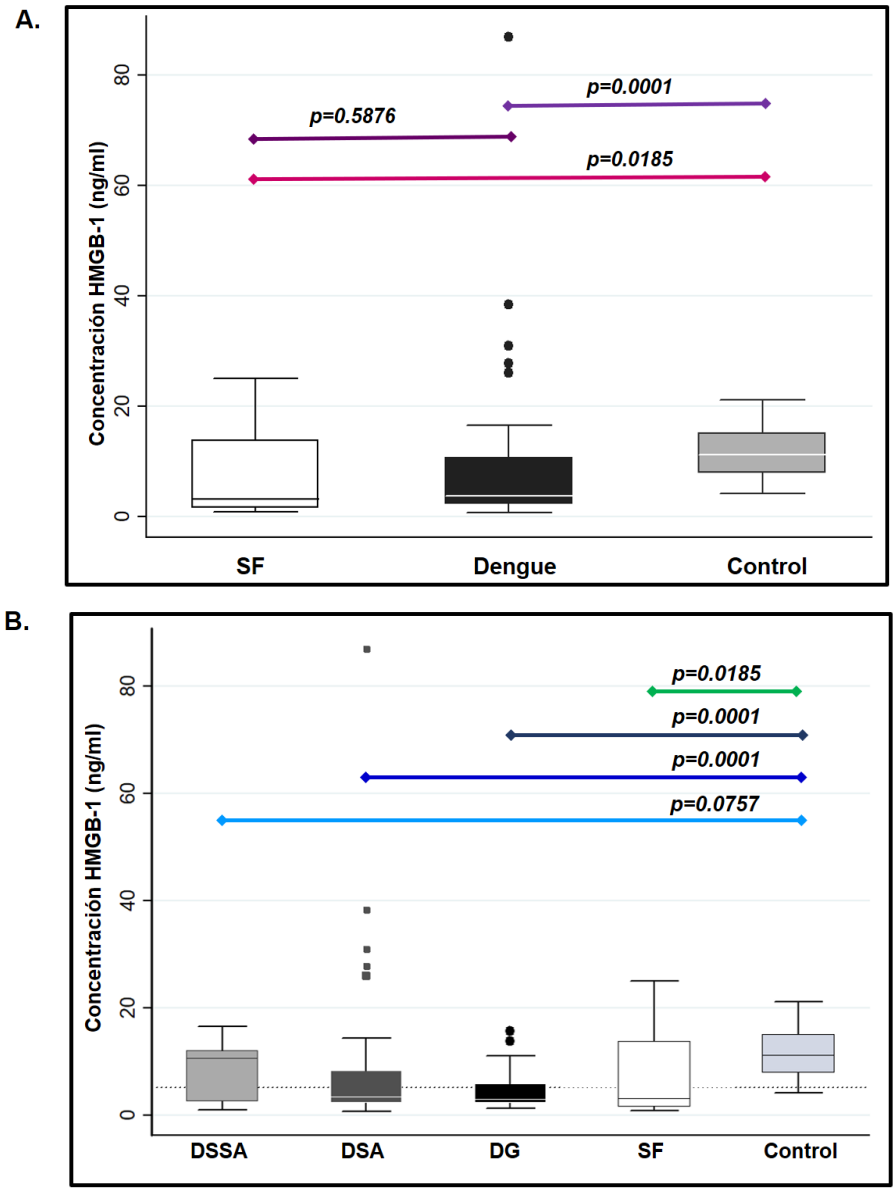

Figura 4. Concentración de la proteína HMGB-1 en menores de 18 años A. Comparación niveles HMGB-1 en pacientes con dengue, síndrome febril no dengue (SF) e individuos sanos (Control). B. Comparación de los niveles de HMGB-1 en individuos con dengue clasificados de acuerdo al grado de severidad, en individuos con síndrome febril y control. DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Síndromes febriles.

7.3 Correlación entre los niveles de HMGB-1 y las variables hematológicas

Tomando como referencia que la distribución de las variables hematológicas, así como la distribución de los niveles de la proteína HMGB-1 no fue normal, se realizó la determinación del coeficiente de correlación de Spearman para evaluar la fuerza de la asociación entre cada una de las variables hematológicas y la concentración de la proteína. Los valores de los coeficientes obtenidos no mostraron una correlación fuerte entre el recuento de leucocitos y la concentración de HMGB-1, así como los valores obtenidos cuando se evaluó el recuento de plaquetas y la concentración de la proteína HMGB-1, al comparar los casos de dengue respecto a los individuos de síndrome febril no dengue, y al comparar los grupos de dengue DSSA, DSA, DG y DF. (Figura 5).

Las tablas 6 y 7 describen los coeficientes de correlación de Spearman y el nivel de significancia estadística de las correlaciones realizadas. Como se aprecia en estos resultados, la fuerza de la asociación entre las variables hematológicas y los niveles de HMGB-1 de acuerdo al diagnóstico tuvieron una asociación débil.

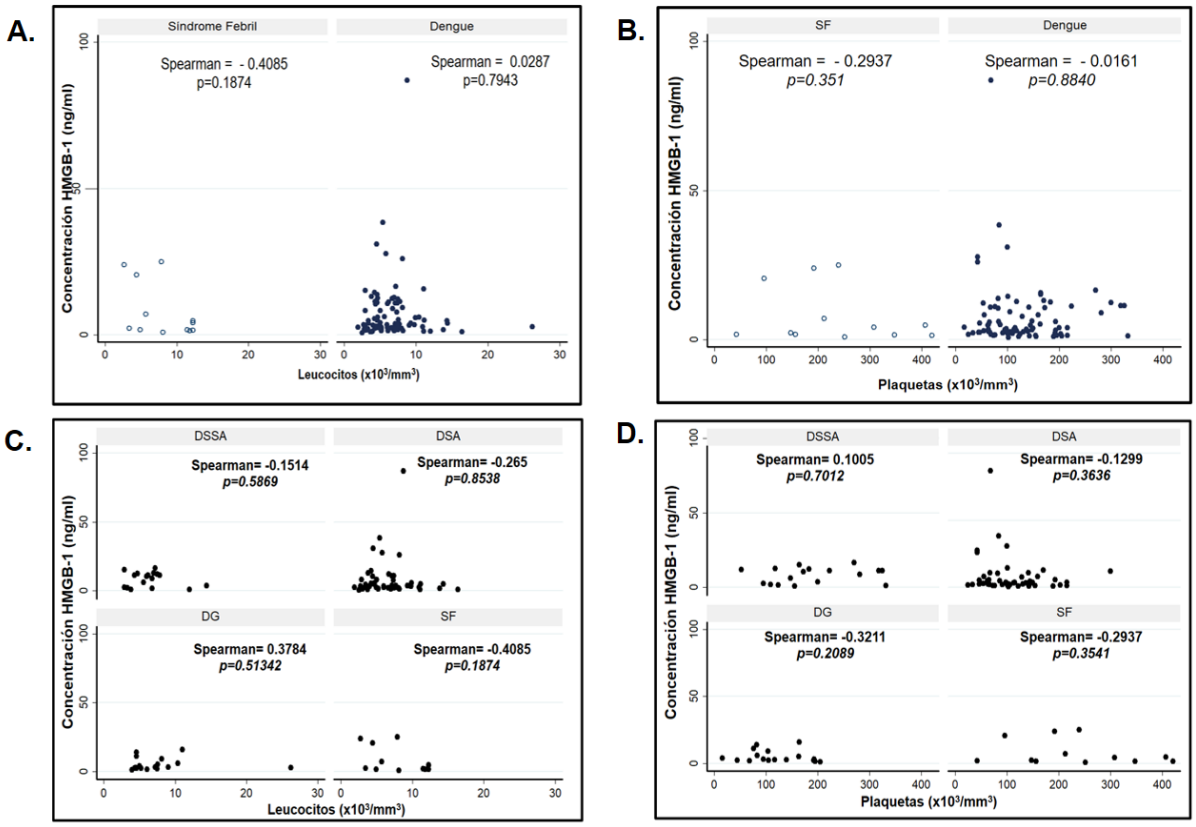

Figura 5. Correlación de los niveles de HMGB-1 con el recuento de leucocitos y el recuento de plaquetas en los casos de dengue y en los individuos con síndrome febril no dengue. A y C. Correlación recuento de leucocitos y concentración de HMGB-1 (Dengue vs. síndrome febril). B y D. Correlación recuento de plaquetas y concentración de HMGB-1 (Dengue vs. síndrome febril). DSSA: Dengue sin signos de alarma;DSA: Dengue con signos de alarma; DG: Dengue grave; OFI: Síndromes febriles.

Tabla 6. Coeficientes de correlación de Spearman entre las variables hematológicas y los niveles de la proteína HMGB-1 en los casos de dengue y los individuos con síndrome febril (SF)**.**

Correlación		**Diagnóstico**	
		Dengue	**SF**
Leucocitos	Spearman	0.0287	- 0.4085
	p	*0.7943*	*0.1874*
Neutrófilos	Spearman	- 0.0328	0.1398
	p	*0.7859*	*0.7001*
Linfocitos	Spearman	0.1019	- 0.7439
	p	*0.3978*	*0.0136*
Monocitos	Spearman	0.0394	- 0.2683
	p	*0.7443*	0.4536
Eosinófilos	Spearman	- 0.1408	- 0.0671
	p	*0.2416*	*0.8539*
Basófilos	Spearman	0.0227	ND
	p	*0.8510*	
Eritrocitos	Spearman	0.1129	- 0.4718
	p	0.3035	0.1215
Hemoglobina	Spearman	0.1751	- 0.0035
	p	0.1089	*0.9914*
Hematocrito	Spearman	0.1523	- 0.0210
	p	*0.1640*	*0.9484*
VCM:	Spearman	0.1092	0.2098

(Volumen Corpuscular Medio).	*p*	*0.3200*	*0.5128*
HCM: (Hemoglobina Corpuscular Media).	Spearman	0.1354	0.4196
	p	*0.2166*	*0.1745*
MCHC: (Concentración Corpuscular Media de la Hemoglobina).	Spearman	0.1372	0.4413
	p	*0.2106*	*0.1509*
Plaquetas	Spearman	-0.0161	- 0.2937
	p	*0.8840*	*0.3541*
VPM: (Volumen Plaquetario Medio).	Spearman	0.3958	0.0837
	p	*0.2028*	*0.4463*
Plaquetocrito	Spearman	0.0402	0.0952
	p	*0.7410*	*0.8225*

ND* No determinado

Tabla 7. Coeficientes de correlación entre las variables hematológicas y los niveles de la proteína HMGB-1 en los casos de dengue (DSSA, DSA y DG) y los individuos con síndrome febril (SF).

Correlación		**Casos**			**No casos**
		DSSA	**DSA**	**DG**	**SF**
Leucocitos	Spearman	0.0748	- 0.0265	0.3784	-0.4085
	p	0.7754	0.8538	0.1342	0.1874

Neutrófilos	Spearman	0.2637	- 0.1215	0.3344	0.1398
	p	0.3869	0.4321	**0.2425**	0.7001
Linfocitos	Spearman	0.0220	0.0317	0.5044	- 0.7439
	p	0.9432	0.8381	0.0659	0.0136
Monocitos	Spearman	0.1273	0.0626	0.0420	- 0.2683
	p	0.6787	0.6863	0.8867	0.4536
Eosinófilos	Spearman	0.0462	- 0.1075	- 0.0267	- 0.0671
	p	0.8808	0.4874	0.9278	0.8539
Basófilos	Spearman	- 0.2617	0.1416	- 0.1267	ND
	p	0.3877	0.3593	0.6659	
Eritrocitos	Spearman	0.1144	0.2272	0.0172	-0.4718
	p	0.6620	0.1089	0.9477	0.1215
Hemoglobina	Spearman	0.2759	0.2486	0.1152	- 0.0035
	p	0.2838	0.0785	0.6598	0.9914
Hematocrito	Spearman	0.3029	0.2276	0.1397	- 0.0210
	p	0.2373	0.1083	0.5928	0.9484
VCM: (Volumen Corpuscular Medio).	Spearman	0.3581	0.0439	0.1569	0.2098
	p	0.1582	0.7600	0.5477	0.5128
HCM: (Hemoglobina Corpuscular Media).	Spearman	0.2918	0.1120	0.1962	0.4196
	p	0.2557	0.4341	0.4504	0.1745
MCHC: (Concentración Corpuscular Media de la	Spearman	0.0429	0.2105	0.2357	0.4413
	p	0.8700	0.1382	0.3625	0.1509

Hemoglobina)					
Plaquetas	Spearman	0.1005	- 0.1299	- 0.3211	- 0.2937
	p	0.7012	0.3636	0.2089	0.3541
VPM (Volumen Plaquetario Medio).	Spearman	- 0.0307	0.2826	0.2149	0.3958
	p	0.9068	0.0445	0.4076	0.2028
Plaquetocrito	Spearman	0,0879	- 0.1357	- 0.1412	0.0952
	p	0.4463	0.3914	0.6157	0.8225

ND* No determinado

8. DISCUSIÓN.

El Dengue tiene una presentación clínica variada, la cual depende de la fase de evolución que se encuentre y de la edad del paciente que este cursando con esta infección. Esto dificulta el diagnóstico, pero teniendo en cuenta que en su patogénesis intervienen diferentes moléculas que participan en el proceso inflamatorio, estas podrían servir como marcadores bioquímicos de la enfermedad, con la finalidad de detectar tempranamente los casos, especialmente aquellos que pueden llegar a tener un mal pronóstico y con esto instaurar un monitoreo en un sitio de mayor complejidad de manera oportuna. Entre los marcadores bioquímicos se encuentra la proteína HMGB-1, una molécula con actividad pleiotrópica involucrada en la activación de diferentes células del sistema inmune e inductora de la respuesta inflamatoria ante estímulos inducidos por antígenos como los péptidos bacterianos y las proteínas de virales. En otras enfermedades autoinmunes e infecciosas como la sepsis bacteriana y algunas infecciones virales, se ha descrito la HMGB-1 como un posible candidato para establecer el pronóstico y desenlace de la enfermedad [11,55]. Hasta el momento, los trabajos publicados sobre los niveles de HMGB-1 en dengue se han orientado en la evaluación de muestras de población adulta, con el fin de identificar la utilidad de su medición para establecer diagnóstico y pronóstico de la enfermedad [54,56].

Al evaluar los niveles de la proteína HMGB-1 en los en casos de dengue y compararlos según los diferentes grados de severidad de la enfermedad, en el presente estudio encontramos que en los pacientes menores de 18 años de edad que consultaron por un síndrome febril de menos de 7 días de evolución, acompañados de los signos y síntomas de la clasificación sugerida por la OMS en 2009 para dengue, la determinación de la concentración de la proteína HMGB-1 fue de 3.7 ng/ml en los casos confirmados de dengue, 3.2 ng/ml en el grupo de síndrome febril (a quienes no se les confirmo dengue) y de 11.3 ng/ml en el grupo control sanos y al comparar la concentración de la proteína HMGB-1 entre el grupo de casos confirmados de dengue con el grupo de SF, no identificamos diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la proteína HMGB-1. Evidenciamos que la concentración promedio de HMGB-1 en los casos de dengue sin signos de alarma fue de 10,6 ng/ml, con signos de alarma fue 3.4 ng/ml y dengue grave 3.2 ng/ml, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos valores. No encontramos diferencias en la concentración de la proteína HMGB-1 de acuerdo a la edad, género y diagnóstico como sí lo muestra el estudio de Allonso y cols. Donde se encontró que los niveles en suero de la proteína son mayores en el grupo de muestras de individuos con dengue y que estos niveles varían de acuerdo al día de enfermedad y el tipo de infección ($p=0.0004$) [53]

En cuanto a los hallazgos clínicos, encontramos que el 60% de los niños con DSA y DG se encontraban entre el cuarto y séptimo día de enfermedad; similar a las características reportadas en el estudio de Alvarado-Castro y cols. (2016), que encontró que los pacientes con dengue no grave tuvieron contacto con los servicios de salud 4.6 días después del inicio de los síntomas y los pacientes con dengue grave 5 días después del inicio de los síntomas[15].

Los síntomas que predominaron fueron mialgias (76.7%), cefalea (71.6%) y dolor abdominal (62.6%). Hallazgos similares fueron reportados en el estudio de Hammond y cols. (año), el cual encontró que la cefalea, artralgias, mialgias y dolor abdominal se presentaba en más del 60% de los niños con infección confirmada por virus dengue[32]. En los individuos con síndrome febril (n=97), se confirmó caso de dengue en el 87.6% de los pacientes, entre ellos el grupo más frecuente fue el de dengue con signos de alarma 60%, seguido por dengue grave 20% y dengue sin signos de alarma 20%.

Al analizar las variaciones en los recuentos celulares y los índices hematimétricos obtenidos en el hemograma en los individuos con diagnóstico confirmado de dengue con respecto a los individuos con síndrome febril indiferenciado encontramos que no hubo diferencias con significancia estadística en el recuento de leucocitos, valor de hemoglobina y hematocrito. En cuanto al recuento plaquetario, encontramos que la trombocitopenia fue más frecuente en los pacientes con dengue con signos alarma y dengue grave, con un valor de P< 0,00.

Uno de los objetivos de este estudio era examinar la asociación entre los niveles de la proteína HMGB-1 y variables hematológicas en las muestras de los pacientes con diagnóstico confirmado de dengue. No se encontró una correlación fuerte entre los niveles de HMGB-1 y las variables hematológicas como recuento de leucocitos y recuento de plaquetas en los casos de dengue ni en los casos de síndrome febril no dengue, ni en los subgrupos de dengue, sin embargo es de resaltar que la fiebre en el momento de la atención solo estuvo presente en 13.7% de los pacientes que consultaron a la institución por síndrome febril y el comportamiento de esta proteína y los recuentos celulares e índices hematimétricos pueden ser diferentes durante la fase febril, teniendo un rendimiento mayor como predictor de severidad durante esta fase, adicionalmente reconocemos que menos de la mitad de los pacientes de la muestra en este estudio fueron clasificados como dengue grave y dengue con signos de alarma, y precisamente en los procesos infecciosos severos donde se ha demostrado la asociación entre la concentración de HMGB-1 con la gravedad de la enfermedad, como lo mostró Oliveira y Cols en su trabajo, el cual investigó la participación de HMGB-1 en casos fatales de dengue a través de análisis histopatológicos y ultraestructurales en muestras post-mortem de hígado, pulmón y corazón, encontrando un aumento de la expresión de HMGB-1 en el citoplasma en los tejidos extraídos en los casos de dengue comparado con los controles no dengue, evidenciándose la participación in situ de HMGB-1 en los casos de dengue grave[57]. Sin embargo, otros estudios realizados en patologías diferentes al dengue, como el de Angeletti y cols. que analizó los niveles de HMGB-1 en casos malaria con diferentes grados de severidad y encontró que la concentración de la proteína fue superior en el grupo de malaria no complicada respecto a los grupos de malaria cerebral o malaria severa. Un hallazgo similar fue encontrado en este estudio donde los niveles de la proteína se encuentran en menor concentración en el grupo de DG, respecto a los grupos de DSA, DSSA y al control respectivamente.

Como fortaleza del presente estudio destacamos que la muestra fue recolectada en un lugar del país con una alta prevalencia para dengue y que se utilizaron diferentes pruebas confirmatorias para aumentar la probabilidad de encontrar los casos, adicionalmente contó con dos grupos de comparación (control) pacientes con pruebas en su totalidad negativas para IgM y ELISA IgG Indirecta, es decir que no habían tenido infecciones por DENV y

pacientes con SF en los cuales también se descartó infección por DENV pero al momento de ingresar al estudio presentaron fiebre y síntomas sugestivos de infección por el virus, lo que permitió analizar el comportamiento de esta proteína no solo en infección por DENV sino en otros síndromes febriles.

Es necesario llevar a cabo más estudios que permitan establecer la asociación entre los niveles y la clasificación de la enfermedad de acuerdo al grado de severidad con mediciones seriadas de la proteína HMGB-1, que permitan observar el comportamiento está a través del curso de la infección.

9. CONCLUSIONES

- La concentración de la proteína HMGB-1 no mostró diferencias significativas según la edad, ni el género entre el grupo de casos confirmados de dengue respecto a los identificados en el grupo síndrome febril.

- No se observaron diferencias en los niveles de la proteína en los casos confirmados de dengue clasificados según el grado de severidad.

- Las variaciones en los recuentos celulares e índices hematimétricos obtenidos en el hemograma en los individuos con diagnóstico confirmado de dengue respecto a los individuos con síndrome febril indiferenciado no fueron estadisticamente significativas. La trombocitopenia fue más frecuente en los pacientes con dengue con signos alarma y dengue grave.

- No se observó una correlación entre los niveles de la proteína HMGB-1 y las variables hematológicas en las muestras de los pacientes con diagnóstico confirmado de dengue ni en los pacientes con síndrome febril no dengue.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Guzman, A. Istúriz R. Update on the global spread of dengue. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(SUPPL. 1):S40-S42. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.06.018.
2. Guzman, M.G. Gubler, D.J. Izquierdo, A. Martinez E. Dengue infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2. doi:10.1038/nrdp.2016.55.
3. Kumar A, Hilaire MGS, Nielsen AL. Epidemiological trends and clinical manifestations of dengue among children in one of the english-speaking caribbean countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2013;107:254–260. doi:10.1093/trstmh/trt007.
4. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec Program Res Train Trop Dis*. 2009:x, 147. doi:WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1.
5. Choudhury, J. Shastri D. Diagnosis and management of dengue in children: Recommendations and IAP ID chapter plan of action. *Indian Acad Pediatr Infect Dis Chapter*. 2014;6:54-62. doi:10.1016/j.pid.2014.07.009.
6. Verhagen, LM. de Groot R. Dengue in children. *J Infect*. 2014;69. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.020.
7. Salgado, DM. Panqueba, CA. Castro, D. Vega M. Miocarditis en Niños con Fiebre por Dengue Hemorrágico en un Hospital Universitario de Colombia. *Rev salud pùblica*. 2009;11(October 2005):591-600. doi:10.1590/S0124-00642009000400010.
8. Pothapregada, S. Kamalakannan, B. Thulasingham, M. Sampath S. Clinically profiling pediatric patients with dengue. *J Glob Infect Dis*. 2016;8(3):115. doi:10.4103/0974-777X.188596.
9. Kang R, Chen R, Zhang Q, et al. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med*. 1998. doi:10.1016/j.mam.2014.05.001.
10. Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Infect Dis (Auckl)*. 2013;26(3). doi:10.1016/j.vaccine.2011.07.022.
11. Kang, R. Chen, R. Zhang, Q. Hou, W. Wu S. HMGB1 in Health and Disease Rui. *Mol Asp Med*. 2015:1-116. doi:10.1016/j.mam.2014.05.001.HMGB1.
12. Yang, H. Wang, H. Czura JTK. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*. 2005;78(1):1-8. doi:10.1189/jlb.1104648.
13. Ministerio de la Protección Social Instituto Nacional de Salud, Organización Panamericana de la Salud. Guia Para La Antención Clínica Integral del Paciente Con Dengue. *Guía para la atención clínica Integr del paciente con Dengue*. 2010:45.
14. World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Spec Program Res Train Trop Dis*. 2009:x, 147. doi:WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1.
15. Alvarado, VM. Ramírez, E. Paredes, S. Legorreta, J. S, VG.Salas L. Caracterización clínica del dengue y variables predictoras de gravedad en pacientes pediátricos en un hospital de segundo nivel en Chilpancingo, Guerrero, México: serie de casos. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2016;73(4):237-242. doi:10.1016/j.bmhimx.2016.06.004.
16. Chau, TN. Anders, KL. Lien, LBi. Hung, NT. Hieu, LTM. Tuan, NM.Thuy T. Clinical and virological features of dengue in Vietnamese infants. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(4). doi:10.1371/journal.pntd.0000657.
17. Chambers, TJ. Hahn, CS. Galler, R. Rice C. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Mocrobiol*. 1990;44(649):88.

18. Heinz, FX. Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol*. 2012;55(4):289-295. doi:10.1016/j.jcv.2012.08.024.
19. Velandia M, Castellanos J. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*. 2011;15(1):33-43. doi:10.1016/S0123-9392(11)70074-1.
20. Whitehead, SS. Blaney, JE. Durbin, AP. Murphy B. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):518-528. doi:10.1038/nrmicro1690.
21. Guzman, MG. Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Lessons and challenges. *J Clin Virol*. 2003;27(1):1-13. doi:10.1016/S1386-6532(03)00010-6.
22. Padilla, JC. Rojas DSR. *Dengue en Colombia: Epidemiologia de la reemergencia a la hiperendemia*. Vol 35.; 2012. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
23. Villar, LAngel. Rojas, DP. Besada-Lombana, S. Sarti E. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Colombia (2000-2011): A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):1-16. doi:10.1371/journal.pntd.0003499.
24. Instituto Nacional de Salud. Informe final dengue, Colombia, 2014.
25. Instituto Nacional de Salud. Informe del evento dengue, Colombia, hasta el periodo epidemiológico XXI, 2015. *Instituto Nacional de Salud. 2015.*
26. Hasan, S. Jamdar S.F. Alalowi M. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2016;6(1). doi:10.4103/2231-0762.175416.
27. Horstick, O. Martinez, E. Guzman, MG. San-Martin J. WHO Dengue Case Classification 2009 and its usefulness in practice: an expert consensus in the Americas. *Pathog Glob Health*. 2015;109(1):19-25. doi:10.1179/2047773215Y.0000000003.
28. Ministerio de salud y la Protección Social. Guia para la atencion clinica integral del paciente con malaria. *Guía para la atención clínica Integr del paciente con Malar*. 2010:1-129.
29. Muller, DA. Depelsenaire, AC. Young P. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis*. 2017;215(Suppl_2):S89-S95. doi:10.1093/infdis/jiw649.
30. Beltrán-Silva, S.L. Chacón-Hernández, S.S. Moreno-Palacios, E. Pereyra-Molina JÁ. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Rev Médica del Hosp Gen México*. 2016;81(3):146-153. doi:10.1016/j.hgmx.2016.09.011.
31. Organización mundial de la salud (OMS), Programa Especial para la investigación y Capacitación de Enfermedades Tropicales (TDR), DENGUE: GUIA PARA EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL. 2009.
32. Hammond, SN. Balmaseda, A. Perez I, Tellez, Y. Saborio, SI. Al E. Differences in Dengue severity in infants, children and adults in a 3 year hospital based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(6):1063-1070.
33. Martínez-Gutiérrez, M. Castellanos J. Dengue hemorrágico. ¿Una aberración inmunológica? *Rev Fac Med*. 2016;11(2):10-19.
34. Yacouba, S. Mongkolsapayaa, J. Screatona G. The pathogenesis of dengue. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(3):284-289. doi:10.1097/QCO.0b013e32835fb938.
35. Arias, J. Valero, N. Mosquera, J. Montiel, M. Reyes, E. Larreal, Y. Alvarez-Mon M. Increased expression of cytokines, soluble cytokine receptors, soluble apoptosis ligand and apoptosis in dengue. *Virology*. 2014;452-453:42-51. doi:10.1016/j.virol.2013.12.027.
36. Wahala, MPB. de Silva A. The human antibody response to dengue virus infection.

Viruses. 2011;3(12):2374-2395. doi:10.3390/v3122374.
37. Mongkolsapaya, J. Dejnirattisai W, Xu, XN. Vasanawathana, S. Tangthawornchaikul, N. Chairunsri A. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*. 2003;9(7):921-927. doi:10.1038/nm887.
38. Sasaki, T. Setthapramote, C. Kurosu T, Nishimura, M. Asai, A. Omokoko M. Dengue virus neutralization and antibody-dependent enhancement activities of human monoclonal antibodies derived from dengue patients at acute phase of secondary infection. *Antiviral Res*. 2013;98(3):423-431. doi:10.1016/j.antiviral.2013.03.018.
39. Flesch, BK. Bauer, F. Neppert J. Rapid typing of the human FcGRIIa poylmorphism by PCR with allele soecific primers. *Transfusion*. 1998;38(February):174-176.
40. Boonnak, K. Dambach, KM. Donofrio, GC. Tassaneetrithep, B. Marovich M. Cell Type Specificity and Host Genetic Polymorphisms Influence Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *J Virol*. 2011;85(4):1671-1683. doi:10.1128/JVI.00220-10.
41. Ranzato, E. Martinotti, S. Patrone M. Emerging roles for HMGB1 protein in immunity, inflammation, and cancer. *ImmunoTargets Ther*. 2015;4:101-109. doi:10.2147/ITT.S58064.
42. Zurolo, E. Iyer, A. Maroso, M. Carbonell, C. Anink, JJ. Ravizza T. Activation of toll-like receptor, RAGE and HMGB1 signalling in malformations of cortical development. *Brain*. 2011;134(4):1015-1032. doi:10.1093/brain/awr032.
43. A de, Mendonça. Jupatanakul, N. Caetano, I. Carneiro V. The DNA chaperone HMGB1 potentiates the transcriptional activity of Rel1A in the mosquito Aedes aegypti. *Insect Biochem Mol Biol*. 2017;80:32-41. doi:10.1016/j.ibmb.2016.11.006.
44. Lotze, MT. Tracey K. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): Nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4):331-342. doi:10.1038/nri1594.
45. Zhao F, Fang Y, Deng S, et al. Glycyrrhizin Protects Rats from Sepsis by Blocking HMGB1 Signaling. 2017;2017. doi:10.1155/2017/9719647.
46. Ugrinova, I. Pasheva E. *HMGB1 Protein: A Therapeutic Target Inside and Outside the Cell*. Vol 107. 1st ed. Elsevier Inc.; 2017. doi:10.1016/bs.apcsb.2016.10.001.
47. NGUYEN, A.H. DETTY, S.Q. AGRAWAL D. Clinical Implications of High-mobility Group Box-1 (HMGB1) and the Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) in Cutaneous Malignancy: A Systematic Review. *Anticancer Res*. 2017;37:1-8. doi:10.21873/anticanres.11282.
48. Nogueira-Machado, JA. Oliveira- Volpe, CM. Veloso- Veloso, C. Martins- Chaves M. HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;1023(35). doi:10.1517/14728222.2011.575360.
49. Chen, Q. Guan, X. Zuo, X. Wang, J. Yin W. The role of high mobility group box 1 (HMGB1) in the pathogenesis of kidney diseases. *Acta Pharm Sin B*. 2016;6:183–188. doi:10.1016/j.apsb.2016.02.004.
50. Gentile, LF. Moldawer L. HMGB1 as a therapeutic target for sepsis: it´s all int he timing! *Expert Opin Ther Targets*. 2014;18(3):243-245. doi:10.1038/nn.3945.Dopaminergic.
51. Ito, T. Kawahara, K. Nakamura T, Yamada, S. Abeyama, K. Hashiguchi T, Maruyama I. High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats. *J Thromb Haemost*. 2007;5(1):109-116. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.02255.x.

52. Choi J, Min HJ, Shin J-S. Increased levels of HMGB1 and pro-inflammatory cytokines in children with febrile seizures. *J Neuroinflammation*. 2011;8:135. doi:10.1186/1742-2094-8-135.
53. Allonso D, Belgrano FS, Calzada N, Guzmán MG, Vázquez S, Mohana-Borges R. Elevated serum levels of high mobility group box 1 (HMGB1) protein in dengue-infected patients are associated with disease symptoms and secondary infection. *J Clin Virol*. 2012. doi:10.1016/j.jcv.2012.07.010.
54. Allonso, D. Vazquez, S. Guzmán MG. Short Report : High Mobility Group Box 1 Protein as an Auxiliary Biomarker for Dengue Diagnosis. *Am Soc Trop Med Hyg*. 2013;88(3):506-509. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0619.
55. Yang, H. Wang, H. Czura JTK. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*. 2005;78(1):1-8. doi:10.1189/jlb.1104648.
56. Allonso D, Belgrano FS, Calzada N, Guzmán MG, Vázquez S, Mohana-borges R. Elevated serum levels of high mobility group box 1 (HMGB1) protein in dengue-infected patients are associated with disease symptoms and secondary infection. *J Clin Virol*. 2012;55(3):214-219. doi:10.1016/j.jcv.2012.07.010.
57. Oliveira ERA, Póvoa TF, Nuovo GJ, et al. Dengue fatal cases present virus-specific HMGB1 response in peripheral organs. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-14. doi:10.1038/s41598-017-16197-5.