

	UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA GESTIÓN DE BIBLIOTECAS					 ISO 9001		 ISO 14001	 ISO 45001	 IQNET
	CARTA DE AUTORIZACIÓN									
CÓDIGO	AP-BIB-FO-06	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 2			

Neiva, febrero del 2026

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Johnatan Lozano Culma, con C.C. No. 1109843412,

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado Plaquetas Humanas Como Modelo Fisiopatológico y de Desenlace Clínico de DENGUE Pediátrico presentado y aprobado en el año 2026 como requisito para optar al título de Especialista en Pediatría;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
GESTIÓN DE BIBLIOTECAS**



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma:

Johnatan Lozano C.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 4

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Plaquetas Humanas Como Modelo Fisiopatológico y de Desenlace Clínico de DENGUE Pediátrico

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Lozano Culma	Johnatan

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Narváez Rojas	Carlos Fernando
Salgado de Panqueba	Martha Doris

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Especialista en Pediatría

FACULTAD: Salud

PROGRAMA O POSGRADO: Especialización en Pediatría

CIUDAD: Neiva **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2026 **NÚMERO DE PÁGINAS:**85

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías___ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general___ Grabados___
Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas
o Cuadros_X_



SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (*En caso de ser LAUREADAS o Meritoria*):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

Español

Inglés

- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| 1. dengue | Dengue |
| 2. dengue grave | Severe Dengue |
| 3. plaqueta | Platelet |
| 4. progresión de la enfermedad | Disease Progression |

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

Antecedentes. El dengue es la arbovirosis de mayor impacto mundial y, en Colombia, presenta ciclos epidémicos recientes con alta carga en departamentos como el Huila. Una característica distintiva de la infección por virus del dengue (DENV) es la trombocitopenia acompañada de alteración funcional plaquetaria; sin embargo, los mecanismos que vinculan la interacción virus-plaqueta con la severidad clínica en población pediátrica no están completamente dilucidados.

Objetivo. Determinar el efecto del DENV sobre las plaquetas de niños naturalmente infectados y evaluar su asociación con la gravedad clínica.

Métodos. Estudio longitudinal, analítico y observacional en 65 niños (1–14 años) con dengue confirmado atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva y de estos, 10 niños en fase de convalecencia entre marzo de 2023 y junio de 2024. Se aisló y purificó la fracción plaquetaria o se evaluaron las plaquetas en sangre total para: (1) la detección de NS1 por ELISA y de RNA viral por RT-qPCR; (2) el análisis fenotípico y funcional por citometría de flujo (marcadores CD62P, CD107 α , CD40L) en condiciones basales y tras estimulación *ex vivo*. La antigenemia y la viremia también se evaluaron en plasma. En una fracción de pacientes, los resultados se compararon entre las fases aguda y convaleciente y se correlacionaron con



parámetros clínicos y el recuento plaquetario.

Resultados. En fase aguda, las plaquetas mostraron un aumento de marcadores de activación (CD62P, CD107 α , CD40L) y una menor capacidad de respuesta tras la estimulación ex vivo, hallazgo que se normalizó en convalecencia, compatible con un estado de **agotamiento funcional** durante la fase aguda. La presencia de la proteína viral NS1 en las plaquetas se asoció significativamente con una mayor activación plaquetaria; en contraste, la detección de RNA viral en las plaquetas no se correlacionó con el patrón de activación. La carga de NS1 plaquetaria se correlacionó moderadamente con recuentos plaquetarios bajos, lo que sugiere un papel de NS1 en el consumo/"clearance" plaquetario. No se observaron diferencias claras en la activación basal al estratificar según la severidad clínica.

Conclusión. En niños con dengue, la proteína viral NS1 asociada a las plaquetas parece ser un determinante clave de la activación y del posible consumo plaquetario, mientras que la presencia de RNA viral no explica la activación observada. El hallazgo de activación simultánea al agotamiento funcional ofrece un marco fisiopatológico que contribuye a la trombocitopenia y podría orientar estrategias terapéuticas dirigidas a NS1 o a la preservación de la función plaquetaria.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Objective. To determine the effect of DENV on platelets from naturally infected children and to assess its association with clinical severity.

Methods. A Longitudinal, analytical, and observational study in 65 children (1–14 years old) with confirmed dengue treated at the Hernando Moncaleano Perdomo University Hospital in Neiva, and among these, 10 children in the convalescent phase between March 2023 and June 2024. Platelets were isolated and purified for: (1) detection of NS1 by ELISA and viral RNA by RT-qPCR in platelet and plasma fractions; (2) phenotypic and functional evaluation by flow cytometry (CD62P, CD107 α , CD40L) under basal conditions and after ex vivo stimulation with PMA. Results were compared between acute and convalescent phases and correlated with clinical parameters and platelet counts.

Results. During the acute phase, platelets exhibited increased activation markers (CD62P, CD107 α , CD40L) and reduced responsiveness to stimulation, which normalized during convalescence—consistent with **functional exhaustion** during active infection. Platelet-associated NS1 protein was significantly associated with greater activation, whereas detection of viral RNA in platelets did not correlate with activation profiles. Higher NS1 levels in platelets showed a moderate correlation with lower platelet counts, suggesting a role for NS1 in platelet consumption/clearance. No clear differences in basal activation were observed when the



DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

4 de 4

patients were stratified by clinical severity.

Conclusion. In children with dengue, the NS1 protein associated with platelets appears to be a key determinant of platelet activation and potential consumption. In contrast, viral RNA does not account for the observed activation pattern. The simultaneous presence of activation and functional exhaustion provides a pathophysiological framework that may contribute to thrombocytopenia and could guide therapeutic strategies targeting NS1 or preserving platelet function.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Jurado:

Néstor Daniel Ramirez B.

Firma:

Nombre Jurado:

Angela María Ortiz S.

Firma:

**Plaquetas Humanas Como Modelo Fisiopatológico y de Desenlace Clínico de Dengue
Pediátrico**

Johnatan Lozano Culma, MD

**Universidad Surcolombiana
Facultad de la Salud
Especialización en Pediatría
Neiva – Huila
2026**

**Plaquetas Humanas Como Modelo Fisiopatológico y de Desenlace Clínico de Dengue
Pediátrico**

**Johnatan Lozano Culma, Md
Residente De Pediatría**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de especialista
en pediatría**

**Tutores
Dr. Carlos Fernando Narváez Rojas
Dra. Martha Doris Salgado De Panqueba**

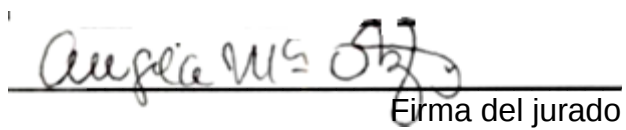
**Universidad Surcolombiana
Facultad De Salud
Especialización En Pediatría
Neiva – Huila
2026**

Nota de aceptación:

APROBADO



Firma del jurado



Firma del jurado

Neiva, febrero del 2026

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo, a la Universidad Surcolombiana y al Programa de Pediatría, que nos han brindado no solo los conocimientos necesarios para nuestra formación académica, sino también los valores y herramientas fundamentales para nuestro desarrollo profesional y personal.

A mis tutores: Sin su generosidad y disposición para compartir su tiempo y experiencia, este proyecto no habría sido posible. Esperamos que los resultados de nuestra investigación puedan aportar, de alguna manera, al desarrollo y la mejora continuos de los servicios de salud de nuestra población.

A todos los pediatras y profesores que, con su compromiso con la salud y el bienestar de la comunidad, han sido una fuente de inspiración para nosotros.

Agradecemos profundamente a los pacientes y sus familias, su disposición, paciencia y confianza fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

Dedicatoria

A Dios, que siempre nos ha acompañado, protegido y llenado con sus bendiciones.

A mi esposa y mis hijos, quienes vivieron conmigo cada sacrificio; que son y siempre serán mi refugio, mi zona segura y mi impulso para seguir adelante.

A mis padres, hermanos y demás familiares, cuyo amor incondicional y ejemplo nos llenan el corazón de amor cada día.

A los pacientes y sus familias, ustedes nos han enseñado el verdadero significado de la resiliencia, la esperanza y la importancia de escuchar con empatía. Agradecemos su confianza, la oportunidad de aprender de ustedes y el recordarnos que, más allá de cada diagnóstico, hay una vida, una historia y una persona con sueños y aspiraciones.

Johnatan

	Pág.
3.9. Vacunación en Dengue.	31
4. Objetivos.....	33
4.1. Objetivo General	33
4.2. Objetivos específicos.	33
5. Metodología Propuesta	34
5.1. Tipo de estudio.....	34
5.2. Período de Estudio.	34
5.3. Población y muestra.	34
5.3.1. Criterios de Inclusión	35
5.3.2. Criterios de exclusión.....	35
5.4. Procedimiento	36
5.4.1. Confirmación de la infección.....	36
5.4.2. Análisis de fenotipo, activación y funcionalidad plaquetaria	37
5.4.3. Estimulación de plaquetas periféricas con phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). 37	
5.4.4. Aislamiento de plaquetas en sangre periférica.....	38
5.4.5. Análisis de viabilidad.....	39
5.4.6. Detección de proteína NS1 y RNA viral en plaquetas purificadas	40
5.4.6.1. Detección de NS1 por ELISA.....	40
5.4.7. Detección de RNA viral por RT-PCR.....	41
5.5. Variables	41
5.6. Análisis estadístico.....	43
5.7. Control de Sesgos.....	44

6.	Consideraciones Éticas	46
6.1.	Código de NÜREMBERG:	46
6.2.	Resolución 8430 de 1993	47
6.3.	Alcance.....	47
6.4.	Riesgo.....	48
6.4.1.	Seguridad de la información:	48
6.4.2.	Declaración Del Helsinki:	49
6.5.	Costo y Beneficio:.....	49
6.6.	Para las Instituciones Participantes:	49
6.7.	Beneficio para los Investigadores	50
6.8.	Conflicto de Interés	51
7.	Resultados.....	52
7.1.	Caracterización Clínica de la Cohorte Pediátrica.....	53
7.1.	Características de laboratorio	54
7.2.	Análisis de la Activación Plaquetaria por Citometría de Flujo.....	55
7.3.	Relación de la activación plaquetaria y la gravedad clínica	58
7.4.	NS1 asociada a plaquetas induce activación celular y trombocitopenia.....	58
8.	Discusión	62
9.	Conclusiones.....	67
	Referencias Bibliográficas	68
	Anexos.....	74

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Ciclos epidémicos de dengue en Colombia, 2007–2025p	23
Tabla 2. Clasificación modificada de la gravedad del dengue, OPS/OMS (33).....	28
Tabla 3. Variables del estudio.....	42
Tabla 4. Características sociodemográficas de los pacientes incluidos.....	52
Tabla 5. Manifestaciones clínicas	53
Tabla 6. Pruebas de laboratorio	54

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Dengue, curso de la enfermedad	27
Figura 2. Cinética del virus del dengue, la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG en muestras de suero en infecciones primarias y secundarias.....	30
Figura 3. Evaluación de la activación plaquetaria mediante citometría de flujo.	56
Figura 4. Resumen de la activación plaquetaria en la fase aguda y en la convalecencia, y su relación con la gravedad clínica.	57
Figura 5. Efectos de la NS1 asociada a plaquetas.	60

Lista de Anexos

	Pág.
Anexo A. Flujograma selección de pacientes.	75
Anexo B. Jornada de actualización sobre dengue a secretaria de salud del Huila.....	77
Anexo C. División de Inmunología de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana y Bacteriología de secretaria de salud del Huila – jornada de capacitación en detección NS1 dengue por técnica ELISA.	78
Anexo D. Participación Jornadas académicas: XXXIII Jornadas Huilenses de Pediatría, realizadas el 31 de mayo de 2024.....	80
Anexo E. Participación Jornadas académicas: XIX Simposio Surcolombiano Medicina Tropical, Parasitología e Inmunodeficiencias, realizado el 4 de octubre de 2024	82
Anexo F. Participación PanDengue Medellín 2025 en modalidad de Póster	83

Resumen

Antecedentes. El dengue es la arbovirosis de mayor impacto mundial y, en Colombia, presenta ciclos epidémicos recientes con alta carga en departamentos como el Huila. Una característica distintiva de la infección por virus del dengue (DENV) es la trombocitopenia acompañada de alteración funcional plaquetaria; sin embargo, los mecanismos que vinculan la interacción virus–plaqueta con la severidad clínica en población pediátrica no están completamente dilucidados.

Objetivo. Determinar el efecto del DENV sobre las plaquetas de niños naturalmente infectados y evaluar su asociación con la gravedad clínica.

Métodos. Estudio longitudinal, analítico y observacional en 65 niños (1–14 años) con dengue confirmado atendidos en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva y de estos, 10 niños en fase de convalecencia entre marzo de 2023 y junio de 2024. Se aisló y purificó la fracción plaquetaria o se evaluaron las plaquetas en sangre total para: (1) la detección de NS1 por ELISA y de RNA viral por RT-qPCR; (2) el análisis fenotípico y funcional por citometría de flujo (marcadores CD62P, CD107 α , CD40L) en condiciones basales y tras estimulación *ex vivo*. La antigenemia y la viremia también se evaluaron en plasma. En una fracción de pacientes, los resultados se compararon entre las fases aguda y convaleciente y se correlacionaron con parámetros clínicos y el recuento plaquetario.

Resultados. En fase aguda, las plaquetas mostraron un aumento de marcadores de activación (CD62P, CD107 α , CD40L) y una menor capacidad de respuesta tras la estimulación *ex vivo*, hallazgo que se normalizó en convalecencia, compatible con un estado de agotamiento funcional durante la fase aguda. La presencia de la proteína viral NS1 en las plaquetas se asoció

significativamente con una mayor activación plaquetaria; en contraste, la detección de RNA viral en las plaquetas no se correlacionó con el patrón de activación. La carga de NS1 plaquetaria se correlacionó moderadamente con recuentos plaquetarios bajos, lo que sugiere un papel de NS1 en el consumo/”clearance” plaquetario. No se observaron diferencias claras en la activación basal al estratificar según la severidad clínica.

Conclusión. En niños con dengue, la proteína viral NS1 asociada a las plaquetas parece ser un determinante clave de la activación y del posible consumo plaquetario, mientras que la presencia de RNA viral no explica la activación observada. El hallazgo de activación simultánea al agotamiento funcional ofrece un marco fisiopatológico que contribuye a la trombocitopenia y podría orientar estrategias terapéuticas dirigidas a NS1 o a la preservación de la función plaquetaria.

Palabras clave: dengue, dengue grave, plaqueta, progresión de la enfermedad.

Abstract

Objective. To determine the effect of DENV on platelets from naturally infected children and to assess its association with clinical severity.

Methods. A Longitudinal, analytical, and observational study in 65 children (1–14 years old) with confirmed dengue treated at the Hernando Moncaleano Perdomo University Hospital in Neiva, and among these, 10 children in the convalescent phase between March 2023 and June 2024. Platelets were isolated and purified for: (1) detection of NS1 by ELISA and viral RNA by RT-qPCR in platelet and plasma fractions; (2) phenotypic and functional evaluation by flow cytometry (CD62P, CD107 α , CD40L) under basal conditions and after ex vivo stimulation with PMA. Results were compared between acute and convalescent phases and correlated with clinical parameters and platelet counts.

Results. During the acute phase, platelets exhibited increased activation markers (CD62P, CD107 α , CD40L) and reduced responsiveness to stimulation, which normalized during convalescence—consistent with functional exhaustion during active infection. Platelet-associated NS1 protein was significantly associated with greater activation, whereas detection of viral RNA in platelets did not correlate with activation profiles. Higher NS1 levels in platelets showed a moderate correlation with lower platelet counts, suggesting a role for NS1 in platelet consumption/clearance. No clear differences in basal activation were observed when the patients were stratified by clinical severity.

Conclusion. In children with dengue, the NS1 protein associated with platelets appears to be a key determinant of platelet activation and potential consumption. In contrast, viral RNA does not account for the observed activation pattern. The simultaneous presence of activation and

functional exhaustion provides a pathophysiological framework that may contribute to thrombocytopenia and could guide therapeutic strategies targeting NS1 or preserving platelet function.

Keywords (MeSH): Dengue, Severe Dengue, Platelet, Disease Progression.

1. Justificación

El dengue representa una de las principales causas de consulta, hospitalización y complicaciones graves en la población pediátrica de regiones endémicas como el departamento del Huila. A pesar de su elevada carga, los mecanismos que explican la aparición de trombocitopenia y disfunción plaquetaria (5) —hallazgos centrales en la fisiopatología del dengue— no se encuentran completamente dilucidados en niños. Esta brecha de conocimiento limita la identificación temprana de casos de enfermedad activa desde el punto de vista celular y restringe el desarrollo de intervenciones dirigidas.

Las plaquetas, tradicionalmente consideradas elementos hemostáticos, hoy se reconocen como componentes inmunes activos capaces de interactuar con patógenos virales (6). En la infección por el DENV, múltiples estudios (2)(7) sugieren que las plaquetas pueden activarse, expresar marcadores de degranulación, internalizar componentes virales o unirse a proteínas del virus, fenómenos que podrían contribuir a su consumo, disfunción y a su clearance acelerado. Sin embargo, existe poca evidencia directa derivada de población pediátrica y, menos aún, proveniente de niños infectados de forma natural, en los que los determinantes virológicos y la respuesta inmunológica pueden diferir de los observados en adultos o en modelos experimentales.

Una de las interrogantes fisiopatológicas clave es aclarar si la activación plaquetaria se debe a la presencia de RNA viral dentro de las plaquetas, a la unión de la proteína viral NS1, o a mecanismos inmunitarios indirectos. Asimismo, es necesario establecer si la activación inicial se acompaña de un estado de agotamiento funcional, lo cual podría explicar tanto la disminución de la capacidad de respuesta como la rápida caída de los conteos plaquetarios durante la fase aguda

del dengue. Conocer la relevancia de estos fenómenos permitiría comprender mejor la transición hacia formas graves, caracterizadas por extravasación plasmática, choque y hemorragias.

En Colombia no existen estudios que analicen simultáneamente la presencia de NS1 y de RNA viral en plaquetas purificadas de niños con dengue, ni su relación con marcadores de activación, de función plaquetaria y de gravedad clínica. Este vacío es particularmente relevante en un departamento hiperendémico como el Huila, donde la carga de enfermedad es alta y la población infantil constituye uno de los grupos más afectados.

Generar evidencia local, basada en muestras de pacientes y evaluada mediante técnicas avanzadas, como la citometría de flujo y la biología molecular, permitirá comprender mejor la fisiopatología de la enfermedad, fortalecer la capacidad diagnóstica y orientar futuras estrategias terapéuticas o la selección de biomarcadores de severidad. Los resultados de este estudio ofrecerán información original y necesaria para el contexto colombiano y contribuirán al entendimiento global del papel de las plaquetas en el dengue pediátrico.

2. Planteamiento del Problema

El dengue continúa siendo la enfermedad arboviral de mayor impacto en salud pública a nivel mundial y constituye una causa frecuente de hospitalización pediátrica en regiones endémicas como el departamento del Huila. Aunque la mayoría de los niños cursan con formas clínicas no graves, un porcentaje desarrolla complicaciones severas caracterizadas por extravasación plasmática, choque y hemorragia (1)(2). Entre los hallazgos hematológicos, la trombocitopenia es uno de los signos más tempranos y consistentes, y su aparición se ha asociado con un mayor riesgo de dengue grave (2). Sin embargo, la fisiopatología que explica la disminución del recuento plaquetario y la disfunción de estas células no ha sido completamente elucidada, especialmente en la población pediátrica.

Las plaquetas cumplen un papel fundamental en la hemostasia, pero también actúan como células inmunes capaces de reconocer patógenos, secretar mediadores y modular la respuesta inflamatoria (2). En la infección por el virus del dengue (DENV) se ha descrito activación plaquetaria, aumento de marcadores de desgranulación y alteración de la capacidad funcional(3). No obstante, en niños infectados naturalmente se desconoce si la proteína viral NS1 o el RNA viral—circulante o unido a la plaqueta— es el principal responsable del estímulo activador, o si los cambios observados corresponden a un estado de activación excesiva seguido de agotamiento funcional, lo que podría contribuir a su rápido consumo o remoción.

La mayoría de los estudios previos se han realizado en adultos o en modelos *in vitro*, con escasos análisis directos en plaquetas primarias de niños naturalmente infectados con DENV(4), pese a que las manifestaciones clínicas y la respuesta inmune pediátrica presentan particularidades propias. En Colombia no existen investigaciones que evalúen simultáneamente

la presencia de NS1 y de RNA viral en plaquetas de niños con dengue, ni que determinen cómo estos factores se relacionan con marcadores de activación plaquetaria y con la gravedad clínica.

Esta falta de evidencia genera un vacío importante en la comprensión de la fisiopatología del dengue pediátrico y limita la identificación de posibles biomarcadores tempranos de severidad. Por ello, es necesario estudiar directamente las plaquetas de niños naturalmente infectados para determinar si la activación plaquetaria está asociada a NS1, al RNA viral o a mecanismos inmunológicos alternos, y si estos procesos contribuyen a la severidad del cuadro clínico y al grado de trombocitopenia observado.

2.1. Pregunta de Investigación.

¿Cuáles son los efectos de la infección natural por DENV en las plaquetas de niños y cómo se relacionan estos efectos con la gravedad clínica?

3. Marco Teórico

3.1.Dengue

El dengue es reconocido como una de las arbovirosis de mayor impacto a nivel mundial, con etiología asociada a la infección por uno de los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1 a DENV-4). Su principal vector de transmisión son las hembras del género *Aedes*, con especial protagonismo de *Aedes aegypti* y, en menor medida, de *Aedes albopictus* (8). La enfermedad ha encontrado un medio favorable en las regiones tropicales y subtropicales, donde se ha establecido de forma endémica, representando un importante problema de salud pública (9,10)

3.2. La infección por Orthoflavivirus

Las similitudes genéticas y estructurales, así como la capacidad de cocirculación, gracias a que comparten el mismo vector, hacen que el DENV presente reacción cruzada a nivel humoral y celular (11). Paradójicamente, la inmunidad preexistente contra DENV es, en la actualidad, el mayor factor de riesgo inmune para desarrollar dengue grave, ya que existen 4 serotipos que difieren en los niveles de antigenicidad e inmunidad. Así, el paciente permanece vulnerable a reinfecciones heterotípicas (12).

El principal blanco de la respuesta de anticuerpos contra DENV es la proteína estructural de envoltura (E)(13). La amplificación dependiente de anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés) ocurre cuando un paciente presenta preexistencia de anticuerpos de reactividad cruzada entre los serotipos. Estos anticuerpos promueven el ingreso del virus a las células blanco por

medio de la unión de complejos anticuerpo-virus a través de los receptores Fc γ R, incrementando la carga viral, activación celular, liberación de mediadores inflamatorios y otros (14).

El tropismo celular determinado en modelos humanos y murinos muestra que las células del linaje monocito/macrófago y las células dendríticas son los mayores blancos de infección por DENV en órganos como la piel, hígado y tejido linfoide; sin embargo, los mecanismos involucrados en la trombocitopenia no se han establecido claramente (15).

3.3. Los Orthoflavivirus y las plaquetas

Los mecanismos involucrados en la trombocitopenia y el sangrado durante la infección por DENV no están completamente entendidos. Varias hipótesis han sido sugeridas para explicar los posibles mecanismos involucrados: disminución de la producción, incremento del consumo o lisis mediado por complejos inmunes. En este contexto, DENV podría directa o indirectamente afectar las células progenitoras en la médula ósea, ocasionando una reducción en la capacidad proliferativa de las células hematopoyéticas (16). De hecho, hay evidencia de que el DENV puede inducir hipoplasia de la médula ósea durante la fase aguda de la enfermedad (17).

Por otro lado, está descrito que la infección por DENV induce el consumo de plaquetas debido a la coagulación intravascular diseminada (CID), destrucción plaquetaria debido al incremento de la apoptosis, lisis mediada por el sistema de complemento y por la presencia de anticuerpos antiplaquetarios (6).

De igual manera, se ha documentado que la secreción de IL-10 requiere la interacción entre plaquetas apoptóticas con monocitos y las respuestas específicas de citoquinas podrían contribuir al bajo recuento plaquetario (18).

El efecto de DENV-2 en la morfología y el perfil de activación ha sido medido en plaquetas humanas aisladas de voluntarios sanos. Sus resultados mostraron que DENV-2 activa las plaquetas, con un incremento en la expresión de CD62P y en la unión al fibrinógeno. Adicionalmente, los cambios morfológicos relacionados con la activación, como la alteración de la arquitectura de la membrana, desgranulación, presencia de filopodios y dilatación en el sistema canalicular abierto en las plaquetas expuestas a la infección, pero no en los controles (19).

3.4. Epidemiología

Colombia ha experimentado desde el año 2007 un comportamiento epidemiológico variable, documentando ciclos epidémicos aproximadamente cada tres años (2010, 2013, 2016, 2019 y durante el brote de 2024 se registró la incidencia más alta de dengue a nivel nacional con un indicador de 969,3 casos por 100,000 habitantes, aunque con la menor tasa de letalidad al compararla con epidemias previas (ver Tabla 1) (20).

Durante el 2025 (corte a la semana epidemiológica 12) (20), la incidencia de dengue a nivel nacional es de 142.6 casos por 100 000 habitantes. Las entidades territoriales de Vichada, Putumayo, Cartagena de Indias D.T., Guaviare, Meta, Cundinamarca, Caquetá, Vaupés, Arauca, Amazonas y Huila presentan las mayores incidencias, registrando tasas superiores a 200 casos por 100,000 habitantes.

Así mismo, en 2024 la letalidad por dengue fue de 0,08 % con la confirmación de 270 muertes notificadas al Sistema de Vigilancia en Salud Pública – SIVIGILA, indicador que es inferior a la meta establecida a nivel nacional en el Plan Decenal de Salud Pública (PDSP) 2022-

2031 del 0,1 % son: Guainía, Risaralda, Arauca, Cartagena de Indias D.T., Sucre, Putumayo, Caldas y Quindío.

Tabla 1.

Ciclos epidémicos de dengue en Colombia, 2007–2025p

Epidemias	Años	Semanas de duración	Casos totales	Casos dengue grave	Muertes	Letalidad general (%)	Letalidad por dengue grave (%)	Serotipos circulantes
2010	2009-2010	79	191 208	14 988	295	0,15	2,0	DENV - 1,-2,-3,-4
2013	2012-2014	69	155 086	3 853	232	0,15	6,0	DENV - 1,-2,-3,-4
	2014-2015	18	38 531	917	65	0,17	7,1	DENV - 1,-2,-3,-4
2016	2015-2016	34	88 878	1 078	132	0,15	12,2	DENV - 1,-2,-3,-4
2019	2019-2020	56	150 563	1 589	127	0,08	7,9	DENV - 1,-2,-3,-4
2023	2023-2025p	126	498 622	5 213	365	0,07	7,1	DENV - 1,-2,-3,-4

Fuente: SIVIGILA, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2007-2025.

3.4.1. Papel de la plaqueta en la severidad del dengue

3.4.1.1. Trombocitopenia en la infección por dengue

Las plaquetas son fragmentos de células producidos por los megacariocitos durante la trombopoyesis. El recuento normal de plaquetas varía entre 150.000 y 450.000 por microlitro de sangre, aunque, debido a su pequeño tamaño, representan sólo una pequeña fracción del volumen sanguíneo. No obstante, son metabólicamente activas y contienen diversos orgánulos funcionales, como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y las mitocondrias (21). También poseen una amplia gama de receptores en su superficie, moléculas de adhesión y gránulos (22). Así, se ha descrito que la trombocitopenia es uno de los factores que podrían servir como marcadores de actividad y predictivos independientes del dengue grave (3). Por ello, tanto la cantidad de plaquetas, como su estado de activación, desempeñan un papel clave en la

evolución de la enfermedad, y las alteraciones en los parámetros plaquetarios podrían estar asociadas con el incremento en el riesgo de desarrollar dengue grave.

3.4.1.2. Mecanismos de la trombocitopenia en la infección por dengue

La infección por DENV puede afectar la producción de plaquetas en la médula ósea y/o incrementar su eliminación, lo que conduce a trombocitopenia. Se han descrito en la literatura los efectos de la infección por dengue sobre la megacariopoyesis y la trombopoyesis, así como sobre la activación y la depuración plaquetaria (21), los cuales describiremos a continuación.

3.4.1.3. La infección por virus del dengue y la reducción de la producción de plaquetas

La megacariopoyesis comienza con las células madre hematopoyéticas (HSC) que se diferencian en progenitores mieloides comunes (CMP). Los CMP luego se diferenciarán en progenitores megacariocito-eritrocitos (MEP). Los MEP continuarán diferenciándose a lo largo del linaje megacariocítico para producir progenitores de megacariocitos (MKP) y eventualmente formarán megacariocitos maduros para producir plaquetas(23).

El DENV provoca una reducción de plaquetas en los pacientes, mediante la infección directa y eficaz de líneas celulares de megacariocitos, especialmente relacionado con el compromiso de la línea celular MEG-01, comprometiendo la vía PI3K/AKT/mTOR que es esencial en la supervivencia y maduración de los megacariocitos causando así la muerte celular significativa y reprimiendo la expresión de factores de transcripción relacionados con la megacariopoyesis, a saber, GATA-1, GATA-2 y NF-E2 (24).

Otro mecanismo potencial implica al receptor de esfingosina-1-fosfato (S1pr). En particular, el subtipo S1pr1 ha sido investigado en el contexto de la infección por DENV, aunque principalmente por su papel en la regulación de la permeabilidad vascular(25). En este sentido,

se ha observado que los niveles de esfingosina-1-fosfato (S1P) están significativamente disminuidos en pacientes con dengue.

A su vez, se ha destacado el papel de la proteasa NS3 del DENV, al desempeñar un papel en la escisión del homólogo 1 de la proteína GrpE (GrpEL1), una cochaperona de la proteína de choque térmico mitocondrial 70 (mtHSP-70). La reducción de GrpEL1 compromete la vida y la función mitocondrial, lo que conduce a trombocitopenia (26). En resumen, el DENV puede infectar a los megacariocitos en diferentes etapas de diferenciación celular y perjudicar la producción de plaquetas, lo que lleva a una reducción en la liberación medular de plaquetas.

3.4.1.4. El dengue aumenta la activación y la depuración plaquetaria

Los patógenos invasores, incluidos bacterias, parásitos y virus, inducen la activación de las plaquetas mediante receptores de reconocimiento de patrones, como los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores de lectina tipo C (CLR). Además, participan otros receptores como los FcR de las inmunoglobulinas, los CR del complemento, el complejo principal de histocompatibilidad de clase I, entre otros (27).

Entre los mecanismos fisiopatológicos de la infección por DENV se encuentra el uso de la maquinaria de traducción para producir nuevas proteínas virales, como la proteína no estructural 1 (NS1) del DENV, y nuevos viriones. La unión de NS1 a TLR4 en plaquetas humanas primarias incrementa la activación plaquetaria, marcada por una mayor expresión de P-selectina, lo que provoca apoptosis plaquetaria (28) y la liberación de quimiocinas almacenadas en gránulos, como RANTES, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y PF4 (21).

El aumento de la expresión de P-selectina en las plaquetas activadas por NS1 promueve la adherencia de las plaquetas a las células endoteliales y los macrófagos, comprometiendo la permeabilidad endotelial y aumentando la fagocitosis plaquetaria, respectivamente (28). De igual

manera, la proteína NS1 también amplifica las respuestas tromboinflamatorias e induce la síntesis de pro-IL-1 β , pero no su secreción, ya que la secreción de IL-1 β por las plaquetas activadas por NS1 es mediada por nucleótidos (26).

Se describe, a su vez, que en pacientes con dengue durante las fases febril y defervescencia, se observa una activación plaquetaria excesiva y apoptosis, determinadas por niveles elevados de P-selectina y anexina V, lo que provoca trombocitopenia en estos pacientes en comparación con controles sanos, pacientes febriles sin dengue y pacientes con dengue no trombocitopénicos (2).

3.5. Manifestaciones Clínicas y de Laboratorio

La infección por dengue presenta un amplio espectro clínico, que va desde una forma asintomática hasta manifestaciones graves. Se estima que entre el 75% y el 80% de las personas infectadas no presentan síntomas(29). Sin embargo, alrededor del 5% sí puede experimentar complicaciones más serias. A pesar de esta clasificación, en la práctica clínica estas fases no siempre son tan claras (30).

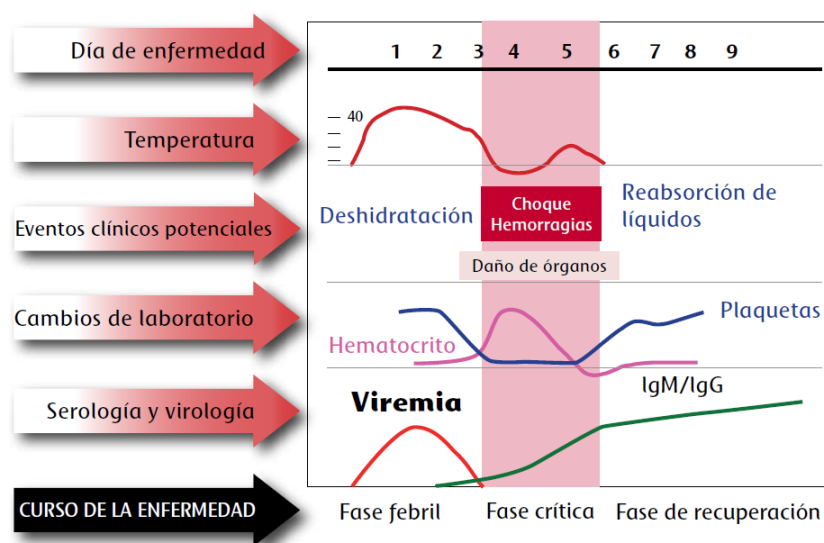
Cuando los pacientes no presentan un incremento significativo de la permeabilidad capilar, tienden a recuperarse rápidamente (31). Además de los síntomas hemodinámicos, el dengue puede afectar múltiples órganos desde las etapas iniciales de la infección, que incluyen encefalitis, hepatitis, miocarditis y nefritis, lo que evidencia el impacto multisistémico y multifacético de la infección (31).

La fase de convalecencia se caracteriza por la reabsorción progresiva del líquido extravasado previamente, lo que se traduce en una mejora clínica evidente (32). No obstante,

algunos pacientes pueden presentar una erupción cutánea característica que provoca un intenso prurito(32). Esta erupción, a menudo descrita como "islas blancas en un mar rojo", se debe a la liberación de histamina por los mastocitos.

Figura 1.

Dengue, curso de la enfermedad



Tomado de: Organización Panamericana de la Salud. Dengue: guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas. 2.ed. Washington, DC: OPS, 2016.

3.6. Clasificación según la gravedad

En el año 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) presentó un nuevo sistema de clasificación para los casos de dengue, Tabla 2, abandonando los términos tradicionales de "fiebre hemorrágica del dengue" y "síndrome de choque del dengue" y reemplazarlos por dengue con o sin signos de alarma (33) y dengue grave.

Tabla 2.

Clasificación modificada de la gravedad del dengue, OPS/OMS (33)

Dengue sin signos de alarma - DSSA	Dengue con signos de alarma - DCSA	Dengue grave - DG
Persona que vive o ha viajado en los últimos 14 días a zonas con transmisión de dengue y presenta fiebre habitualmente de 2 a 7 días de evolución y 2 o más de las siguientes manifestaciones: 1. Náuseas / vómitos 2. Exantema 3. Cefalea / dolor retroorbital 4. Mialgia / artralgia 5. Petequias o prueba torniquete (+) 6. Leucopenia También puede considerarse caso todo niño proveniente o residente en zona con transmisión de dengue, con cuadro febril agudo, usualmente entre 2 a 7 días y sin foco aparente.	Todo caso de dengue que cerca de y preferentemente a la caída de la fiebre presenta uno o más de los siguientes signos: 1. Dolor abdominal intenso o dolor a la palpación del abdomen 2. Vómitos persistentes 3. Acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, derrame pericárdico) 4. Sangrado de mucosas 5. Letargo / irritabilidad 6. Hipotensión postural (lipotimia) 7. Hepatomegalia >2 cm 8. Aumento progresivo del hematocrito	Todo caso de dengue que tiene una o más de las siguientes manifestaciones: 1. Choque o dificultad respiratoria debido a extravasación grave de plasma. Choque evidenciado por: pulso débil o indetectable, taquicardia, extremidades frías y llenado capilar >2 segundos, presión de pulso ≤ 20 mm Hg: hipotensión en fase tardía. 2. Sangrado grave: según la evaluación del médico tratante (ejemplo: hematemesis, melena, metrorragia sangrado del sistema nervioso central (SNC)) 3. Compromiso grave de órganos, como daño hepático (AST o ALT ≥ 1000 UI), SNC (alteración de conciencia), corazón (miocarditis) u otros órganos

Tomado de: Organización Panamericana de la Salud. Dengue: guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas. 2.ed. Washington, DC: OPS, 2016.

3.7. Enfoque diagnóstico

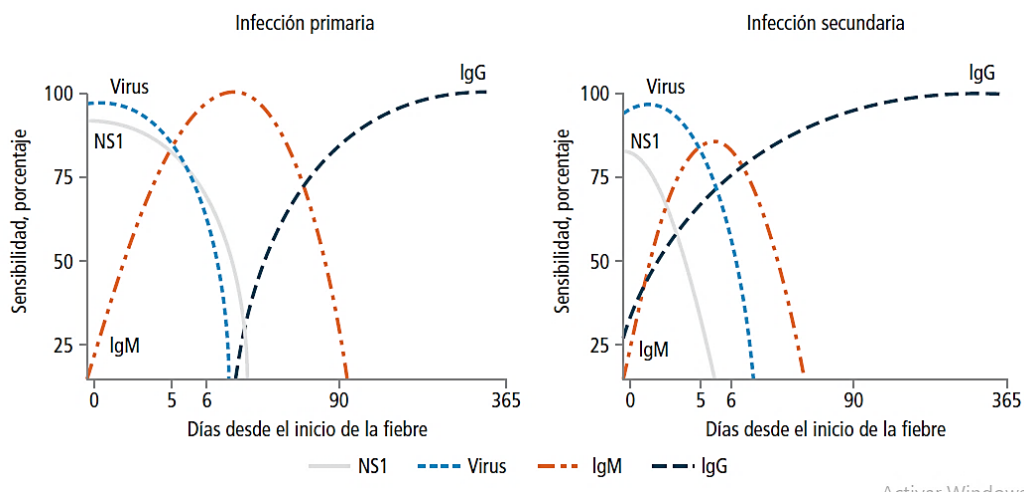
3.7.1. Diagnóstico específico

El diagnóstico de esta infección viral requiere pruebas especializadas que varían según la etapa clínica en la que se encuentre el paciente. Durante los primeros 5 días de enfermedad, correspondientes a la fase febril inicial, las pruebas orientadas a detectar la presencia del virus, su RNA, o sus antígenos específicos son las más adecuadas.

Uno de estos antígenos, la proteína viral NS1, puede identificarse en el suero del paciente hasta el noveno día de síntomas en el caso de una infección primaria y hasta el séptimo día en el caso de una infección secundaria (Ver figura 2) (34), con una especificidad que ronda entre el 90% y el 100% y una sensibilidad que, aunque varía según la prueba comercial utilizado, suele oscilar entre el 60% y el 90% (34)(35).

Figura 2.

Cinética del virus del dengue, la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG en muestras de suero en infecciones primarias y secundarias



Fuente: Adaptada de Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Dengue Clinical Case Management (DCCM) course. Atlanta: CDC; 2018.

Métodos relevantes en el diagnóstico temprano del dengue es la amplificación directa de ácido nucleico en muestras biológicas que permite detectar el ARN del virus del dengue (DENV) incluso 24 a 48 horas antes de la aparición de síntomas, como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), la RT-PCR en tiempo real, y otros métodos de amplificación isotérmica (36). Estos tests son altamente sensibles (80-100%) y específicos (99-100%).

3.8.Tratamiento.

El tratamiento del dengue es principalmente de soporte y el objetivo es manejar y reducir

los síntomas del paciente, así como prevenir complicaciones graves. No hay tratamiento antiviral específico para el dengue.

3.8.1. Atención de Soporte

La piedra angular del tratamiento del dengue es la atención de apoyo y el reconocimiento temprano de los signos de alarma.

Los fármacos preferibles para controlar la temperatura son el paracetamol, debido a su perfil de seguridad. Se deben evitar los antiinflamatorios no esteroideos y el ácido acetilsalicílico debido a su riesgo de hemorragia gastrointestinal y síndrome de Reye (9).

3.9. Vacunación en Dengue.

El desarrollo de vacunas contra dengue ha estado condicionado por la compleja inmunopatogenia del virus y el fenómeno de potenciación dependiente de anticuerpos (ADE), que explica la mayor eficacia en individuos con inmunidad previa. Dengvaxia®, vacuna viva atenuada tetravalente de tres dosis, indicada a partir de los 9 años de edad, con previa confirmación serológica positiva para dengue, ha demostrado alta eficacia para prevenir dengue sintomático, hospitalización y formas graves en niños seropositivos. Sin embargo, en individuos seronegativos se asoció a mayor riesgo de enfermedad grave posterior (37).

Qdenga® (TAK-003) es una vacuna viva atenuada tetravalente de dos dosis, aprobada a partir de los 4 años de edad, ha mostrado eficacia tanto en individuos seropositivos como seronegativos, especialmente en la prevención de hospitalización y dengue grave. No obstante, su efectividad varía según el serotipo, con menor protección frente a DENV-3 y DENV-4 en

población seronegativa. Su aprobación por agencias regulatorias internacionales y la recomendación de la OMS para su uso en áreas de alta transmisión, como Colombia, respaldan su potencial impacto en la reducción de desenlaces graves en la población pediátrica (37).

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Determinar el efecto del DENV sobre las plaquetas de niños naturalmente infectados y su asociación con la gravedad clínica.

4.2. Objetivos específicos.

- Caracterizar clínica y epidemiológicamente a los pacientes con dengue durante el periodo del estudio.
- Identificar cambios fenotípicos y funcionales de las plaquetas primarias de niños naturalmente infectados con DENV.
- Determinar el efecto de NS1 y RNA viral sobre la plaqueta de niños con dengue.
- Conocer la relación entre los cambios plaquetarios y la severidad clínica pediátrica en el dengue.

5. Metodología Propuesta

5.1. Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo longitudinal, analítico y observacional, se desarrolló en el Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo (HUHMP) y en la División de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Surcolombiana, donde se realizaron las pruebas y técnicas especializadas para la evaluación de los efectos de la infección de plaquetas primarias aisladas de niños infectados naturalmente con DENV que consultaron al departamento de pediatría del HUHMP que es centro de referencia para el manejo del dengue pediátrico en la región.

5.2. Período de Estudio.

El estudio fue llevado a cabo en el HUHMP, institución pública de tercer nivel, descentralizada, que presta servicios de salud de alta complejidad, ubicada en la ciudad de Neiva, capital del Huila, zona sur de Colombia, durante el periodo de marzo de 2023 a junio de 2024.

5.3. Población y muestra.

Los pacientes incluidos fueron niños de 1 a 14 años, admitidos al servicio de pediatría del HUHMP, con diagnóstico de dengue con signos de alarma o grave.

Las muestras de sangre total fueron recolectadas por personal entrenado de enfermería

siguiendo los protocolos de venopunción en tubos al vacío Improvacuter con EDTA K⁺⁺ (Ref: 682041202, IMPROVE, Guangzhou, China). El volumen de sangre se ajustó en cada caso según la edad y el peso del participante, aunque el volumen requerido estuvo entre 1 y 3 mL de sangre venosa total. Cada tubo fue rotulado con un código, la fecha y la hora de toma de la muestra, y el responsable del procedimiento. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas a la División de Inmunología siguiendo el protocolo de transporte de muestras biológicas.

Una segunda muestra se obtuvo durante la fase de convalecencia (15–30 días posteriores al egreso hospitalario) únicamente en los pacientes que asistieron de manera voluntaria a la visita de control ambulatorio. El control fue realizado por personal médico especializado del servicio de pediatría. Esta muestra fue tomada bajo las mismas condiciones de riesgo mínimo y sirvió para identificar cambios en las plaquetas no inducidos por la infección aguda y para confirmar el diagnóstico de la infección mediante la seroconversión de IgM y IgG virus-específicas.

5.3.1. Criterios de Inclusión

- Pacientes de entre 1 y 14 años.
- Pacientes atendidos en el servicio de Pediatría del HUHMP.
- Pacientes que cumplan con la definición de dengue con signos de alarma o dengue grave y confirmación diagnóstica según guía OMS
- Pacientes cuyos padres o tutores legales acepten participar en el estudio.

5.3.2. Criterios de exclusión

- Pacientes que no cumplan con la definición de caso confirmado de dengue
- Pacientes con sospecha de dengue que tengan una comorbilidad que afecte las

plaquetas, como enfermedades autoinmunes.

- Pacientes con enfermedades hematológicas, inmunológicas o infecciosas que alteraran la función plaquetaria.
- Transfusión de hemoderivados en los 7 días previos.
- Muestras insuficientes o con hemólisis significativa.
- Pacientes con datos incompletos.

5.4. Procedimiento

Inicialmente, el proyecto fue presentado a la unidad de investigación y al Comité de Ética, Bioética e Investigación del HUHMP para su evaluación. Tras recibir la aprobación para su implementación, se llevó a cabo la socialización de sus objetivos y metodología, así como de los pacientes de interés, con el personal de enfermería, los médicos residentes e internos del servicio de urgencias, infectología pediátrica, y UCI pediátrica del HUHMP.

También se explicó a los residentes de pediatría, pediatras y médicos internos del servicio de pediatría del HUHMP los criterios de inclusión y exclusión del presente proyecto, logrando así la captación del paciente, el diligenciamiento del consentimiento informado y la recolección de la muestra durante la primera venopunción indicada por el especialista tratante.

5.4.1. Confirmación de la infección

La infección por DENV en niños fue confirmada mediante la detección de ARN viral por medio de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) multiplex serotipo-específica, usando un protocolo ampliamente difundido (38), la identificación de NS1 circulante

por ELISA o cromatografía de flujo lateral y la detección de anticuerpos virus-específicos de isotipo IgM y IgG evaluados en la fase aguda y de convalecencia si disponible (39).

5.4.2. *Análisis de fenotipo, activación y funcionalidad plaquetaria*

El fenotipo plaquetario se analizó en sangre total. Se identificaron las plaquetas mediante anticuerpos acoplados a fluorocromos dirigidos contra las proteínas de superficie exclusivamente expresadas por plaquetas CD42a y CD42b (Cat:303912, BioLegend, California, USA) para caracterizar la expresión de moléculas de superficie marcadoras de activación. La activación plaquetaria se evaluó mediante la detección de dos marcadores granulares: el CD40L (Cat:313004, BioLegend, California, USA) y el CD107b (marcador de degranulación celular). Adicionalmente, la activación se evaluó mediante la expresión de la selectina CD62P, perteneciente a las moléculas de adhesión, con un anticuerpo monoclonal anti-CD62P (Cat:304905, BioLegend, California, USA), y se analizó por citometría de flujo en un instrumento FACSCanto II (Becton Dickinson, CA, USA).

5.4.3. *Estimulación de plaquetas periféricas con phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)*

La activación funcional de las plaquetas se evaluó mediante la estimulación ex vivo con phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), un potente análogo de diacilglicerol que activa la proteína quinasa C (PKC) y promueve la degranulación y la expresión de marcadores de superficie celulares. El procedimiento se realizó utilizando sangre total anticoagulada con EDTA-K⁺⁺ para no alterar el fenotipo plaquetario durante la estimulación.

Para cada niño incluido, las plaquetas se prepararon en dos condiciones experimentales:

no estimuladas (PMA-) y estimuladas (PMA+). Para la estimulación, se adicionó PMA (Sigma-Aldrich®, P8139) a una concentración final de 50 nM y se incubó durante 20 minutos a 37 °C, con agitación suave. En la condición control (PMA-), se añadió un volumen equivalente de vehículo de la PMA (dimetilsulfóxido, DMSO). Transcurrido el tiempo de incubación, las células se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, con el fin de preservar la expresión de las moléculas de superficie para el análisis por citometría.

Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se procedió a la marcación inmunofenotípica con anticuerpos monoclonales conjugados a CD42b (para identificación plaquetaria), CD62P (P-selectina), CD107 α (LAMP-1) y CD40L (CD154), siguiendo las recomendaciones del fabricante (BD Biosciences®), con concentraciones apropiadas previamente tituladas de cada anticuerpo. Tras la incubación con los anticuerpos durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, las células se lavaron nuevamente y se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Los resultados se expresaron como porcentaje de plaquetas CD42b⁺ positivas para cada marcador y, adicionalmente, como incremento del % de la población celular que expresa el respectivo marcador, inducido por la estimulación PMA ($\Delta = \text{PMA}^+ - \text{PMA}^-$), el cual se utilizó como un índice de capacidad funcional. Los análisis de datos se realizaron con FlowJo v10 (Tree Star Inc.), aplicando la misma estrategia de gating para todas las muestras.

5.4.4. Aislamiento de plaquetas en sangre periférica

Se obtuvo una muestra de sangre periférica de cada participante en tubos con anticoagulante citrato sódico, en las primeras 24 horas de la admisión hospitalaria. Las muestras

fueron procesadas en un plazo máximo de 60 minutos tras la venopunción, evitando la agitación mecánica y la exposición a temperaturas superiores a 25 °C para minimizar la activación plaquetaria ex vivo.

El aislamiento de plaquetas se realizó a partir de sangre total mediante centrifugación diferencial. En primer lugar, la muestra se centrifugó a $200 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener el plasma rico en plaquetas (PRP), el cual se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo sin perturbar la capa leucocitaria. Posteriormente, el PRP se diluyó en PBS estéril y se centrifugó nuevamente a $800 \times g$ durante 10 minutos para sedimentar las plaquetas. El pellet resultante se resuspendió en un buffer fosfato salino estéril. La fracción fue posteriormente lavada con PBS estéril.

La pureza de la fracción plaquetaria se verificó mediante citometría de flujo, utilizando un panel que incluyó de nuevo al CD42b (GPIb α) como marcador plaquetario y al CD45 como marcador panleucocitario para evaluar la contaminación de la fracción plaquetaria con otros tipos de leucocitos. El análisis de gating consideró la población con baja dispersión lateral (SSC), tamaño intermedio en FSC, CD42b⁺ y CD45⁻. La pureza promedio obtenida fue del 93% (rango de 90–97%). Las muestras con pureza inferior al 90% fueron descartadas de los análisis posteriores. En los experimentos funcionales se usaron plaquetas tanto en sangre total como en fracción purificada, según el diseño experimental descrito.

5.4.5. Análisis de viabilidad

Para evaluar la viabilidad de las plaquetas primarias humanas purificadas a partir de sangre periférica, se realizó un conteo manual y se determinaron los niveles de muerte celular mediante tinción de exclusión con tripán azul (Cat: 111732, Merck, Darmstadt, Alemania). En

todos los experimentos, la viabilidad plaquetaria fue superior al 95%.

5.4.6. Detección de proteína NS1 y RNA viral en plaquetas purificadas

La detección de proteína no estructural 1 (NS1) y del RNA del DENV en las fracciones plaquetarias purificadas tuvo como objetivo evaluar la posible interacción directa del virus con las plaquetas y su posible participación en los mecanismos de activación y trombocitopenia.

Tras la purificación plaquetaria, se separaron alícuotas paralelas de la fracción celular y del plasma correspondiente para el análisis de NS1 y de RNA viral en plaquetas y plasma. Cada muestra fue evaluada bajo condiciones estandarizadas y en cabina de bioseguridad tipo II, utilizando material libre de RNasas y endotoxinas.

5.4.6.1.Detección de NS1 por ELISA

La cuantificación de NS1 se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich (Panbio® Dengue Early NS1 Antigen ELISA, Abbott Diagnostics, Australia), siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Se analizaron 100 µL de lisado plaquetario y 100 µL del plasma pareado en duplicado por niño. Los lisados plaquetarios se obtuvieron mediante la resuspensión del pellet en 100 µL de PBS y la posterior lisis mediante tres ciclos de congelación–descongelación a –80 °C. Las lecturas se realizaron a 450 nm en un lector de microplacas automatizado multiuso (Varioskan de Lux, Thermo Scientific). Los resultados se expresaron como índice de absorbancia (muestra/valor de corte). Se consideró positivo un índice $\geq 1,0$ según el criterio del fabricante. Para minimizar interferencias, se incluyeron controles negativos con buffer de lavado y lisado de plaquetas de donantes sanos.

5.4.7. *Detección de RNA viral por RT-PCR*

El RNA total se extrajo del pellet plaquetario o del plasma utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen®, Alemania) según las especificaciones del fabricante, eluyendo el RNA en 50 µL de buffer AVE. La detección de DENV se realizó mediante RT-PCR en tiempo real, con un protocolo multiplex previamente publicado y de uso extendido (38). Cada reacción incluyó controles positivos (sobrenadante de cultivo celular infectado con DENV1-4), controles negativos (agua libre de nucleasas y mock) y un control interno de amplificación que consistió en el gen constitutivo Rnasa P. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Quantstudio 5™ (Applied Biosystems®, Thermo Scientific) con el siguiente programa: 10 min a 55 °C (retrotranscripción), 2 min a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 95 °C por 10 s y 60 °C por 60 s. Se consideró positiva para DENV aquella con un valor de *cycle threshold* (Ct) menor que 37.5 y una curva de amplificación sigmoide típica. Los resultados se reportaron como positivos/negativos y, cuando fue posible, se expresó la mediana de Ct.

Los análisis de NS1 y de RNA viral se realizaron en paralelo en la fracción plaquetaria y en el plasma, con el fin de diferenciar la presencia de componentes virales asociados directamente a las plaquetas de la que circula en el compartimento plasmático. Para descartar contaminación, cada corrida experimental incluyó un control de lavado final del aislamiento plaquetario sometido a las mismas condiciones analíticas.

5.5. Variables

La siguiente tabla muestra las variables analizadas.

Tabla 3. Variables del estudio

Grupo	Variable	Definición	Escala de medición
Sociodemográfico	Edad	Tiempo de vida	Años (cuantitativo)
	Género	Sexo con el que se identifica	F/M (cualitativo)
	Procedencia	Lugar de origen	Ubicación (cualitativa)
	Días de enfermedad	Tiempo de síntomas	Días (cuantitativo)
	Fiebre	Temperatura corporal >37.5	Presencia/ausencia (cualitativo)
	Nauseas	Sensación de vómito	Presencia/ausencia (cualitativo)
	vómito	Expulsión súbita de contenido estomacal.	Presencia/ausencia (cualitativo)
	Cefalea	Dolor de cabeza	Presencia/ausencia (cualitativo)
	Mialgia/artralgia	Dolor en músculos y articulaciones.	Presencia/ausencia (cualitativo)
	Petequias	Puntos de microhemorragias	Presencia/ausencia (cualitativo)
Clínicos	Sangrado de mucosas	Pérdida de sangre por mucosas	Presencia/ausencia (cualitativo)
	Choque	Caída significativa de la presión arterial media	Presencia/ausencia (cualitativo)
	Organopatía	Disminución de la funcionalidad de corazón, hígado, riñón o cerebro.	Presencia/ausencia (Cualitativa)
	Dolor abdominal	Síntoma	Presencia/ausencia (cuantitativo continua)
	Rash	Reacción dérmica	Presencia/ausencia (Cualitativa)
	Leucocitos	Células blancas	#/uL (cuantitativo continua)
	Hemoglobina	Proteína sanguínea	mg/dL (cuantitativo continua)
	Hematocrito	Masa eritrocitaria	mm (cuantitativo continua)
	Plaquetas	Células que participan en la hemostasia.	#/uL (cuantitativo continua)
	Proteína C reactiva	Proteína de fase aguda	mg/dL (cuantitativa continua)
Inmunológicos - Biomarcadores	AST - ALT	Enzimas hepáticas	mg/dL (cuantitativa continua)
	TP	Tiempo de protrombina	Segundos (cuantitativa, continua)
	TPT	Tiempo Parcial de	Segundos (cuantitativa, continua)

Tromboplastina Tisular		
CK, CK-MB	Isoenzimas miocárdicas	mg/dL (cuantitativa continua)
CD62P	Molécula de adhesión	IMF (cuantitativa continua).
CD41	Marcador plaquetario	IMF (cuantitativa continua).
CD61	Marcador de plaqueta madura	IMF (cuantitativa continua).
CD107a	Marcador de desgranulación plaquetaria	IMF (cuantitativa continua).
NS1	Proteína no estructural del DENV	Densidad óptica (cuantitativa continua).

IMF: Intensidad media de fluorescencia. Las moléculas inmunes también pueden expresarse como frecuencias relativas (%) en una población celular. Fuente: Elaboración propia del autor.

5.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando los programas GraphPad Prism v10.0 (GraphPad Software®, San Diego, EE. UU.) y SPSS Statistics v26.0 (IBM®, Armonk, NY, EE. UU.). Se evaluó la normalidad de las variables mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y de Kolmogorov–Smirnov. Dado que la mayoría de los datos no presentaron distribución normal, los resultados se expresaron como medianas y rangos o rangos intercuartílicos (RIC). Las comparaciones entre dos grupos independientes (por ejemplo, pacientes con dengue con signos de alarma [DCSA] y dengue grave [DG]) se realizaron utilizando la prueba de Mann–Whitney U para variables continuas y la prueba exacta de Fisher o la prueba χ^2 para variables categóricas. Para el análisis pareado entre la fase aguda y la convaleciente del mismo paciente, se empleó la prueba de rangos de Wilcoxon. Las correlaciones entre variables continuas (por ejemplo, niveles de NS1, recuento plaquetario, expresión de CD62P, CD107 α o CD40L) se determinaron mediante el coeficiente de correlación de Spearman (ρ). Se interpretó la fuerza de la correlación según el valor absoluto de ρ : débil (0.10–0.29), moderada (0.30–0.59) o fuerte (≥ 0.60). Para

interpretar cada resultado, se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

5.7. Control de Sesgos

Para asegurar la validez interna del estudio y minimizar posibles sesgos, se implementaron diversas estrategias desde la selección de los participantes hasta el análisis de los datos. La inclusión de los pacientes se realizó de manera consecutiva, incorporando a todos los niños que cumplieron los criterios de elegibilidad durante el periodo del estudio, lo que evitó la selección preferencial y garantizó una muestra representativa de los casos pediátricos de dengue atendidos en el HUHMP. Los criterios de inclusión y exclusión fueron definidos previamente y aplicados de manera uniforme por el equipo clínico, reduciendo la probabilidad de errores de clasificación o de incorporación de pacientes con condiciones que alteraran la función plaquetaria.

Para minimizar el sesgo de información clínica, todos los casos fueron confirmados virológicamente mediante detección de NS1 y/o RT-qPCR, lo que disminuyó la posibilidad de clasificar erróneamente otras infecciones febriles como “dengue”. La clasificación de la severidad clínica se realizó siguiendo los lineamientos de la guía revisada de la WHO 2009. La información clínica y laboratorio se obtuvo directamente de la atención en curso, evitando reconstrucciones retrospectivas y reduciendo el sesgo derivado de registros incompletos o de la memoria del personal asistencial.

En cuanto a los procedimientos de laboratorio, se aplicaron protocolos estandarizados para disminuir la variabilidad y los sesgos de medición. Todas las muestras se analizaron en la primera hora posterior a la toma para evitar la activación plaquetaria inducida por el

almacenamiento. El aislamiento de plaquetas, la extracción de RNA, las determinaciones por RT-qPCR y la detección de NS1 se realizaron según procedimientos validados y reproducibles. Las mediciones críticas se realizaron por duplicado y la citometría de flujo incluyó controles fluorescentes. El personal del laboratorio que analizó las muestras desconocía la clasificación clínica de los pacientes, lo que redujo el riesgo de sesgo.

También se excluyeron pacientes con enfermedades hematológicas o inmunológicas y con exposición reciente a transfusiones, lo que permitió aislar los efectos propios de la infección por DENV sobre la fisiología plaquetaria. Además, se realizaron análisis estratificados entre las fases aguda y convaleciente y entre categorías de severidad, con el fin de identificar patrones diferenciales sin atribuir asociaciones erróneas a la variabilidad biológica. Aunque el tamaño muestral limitó modelos multivariados, se aplicaron correlaciones apropiadas para explorar la relación entre NS1, RNA viral, marcadores de activación y recuentos plaquetarios, evitando asociaciones débiles.

Las pérdidas de seguimiento se mantuvieron al mínimo mediante el contacto activo con los acudientes para obtener la muestra de convalecencia. Todos los casos con datos incompletos fueron documentados adecuadamente. Finalmente, el análisis estadístico se realizó sobre una base de datos previamente codificada y anonimizada, lo que evitó interpretaciones influidas por el conocimiento del estado clínico de cada niño. Las pruebas estadísticas utilizadas se seleccionaron según las características reales de la distribución de las variables, evitando supuestos incorrectos que pudieran distorsionar los resultados.

6. Consideraciones Éticas

Según la Resolución 008430 del 04 de octubre de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, este estudio se considera de riesgo mínimo. La decisión de participar en el estudio fue completamente voluntaria. Todos los participantes o sus acudientes firmaron un consentimiento informado plenamente explicado, ya que nuestra población de estudio es menor de edad. La participación o el retiro del estudio fue completamente voluntaria.

El estudio fue aprobado mediante el acta 02-07 del 21 de febrero de 2023 del comité de ética institucional, lo que garantiza el cumplimiento de los estándares éticos y legales vigentes.

El presente proyecto de investigación se encuentra acorde con disposiciones legales y ajustado a principios éticos y científicos de la investigación con el fin de que se preserven y se garanticen los derechos de los sujetos en estudio, para lo cual se tendrán en cuenta los siguientes principios:

6.1.Código de NÜREMBERG:

A cada participante y a su familiar/representante legal se les explicó el trabajo de investigación de forma clara y entendible; además, se les pidió que, de manera completamente autónoma, leyera y firmara el consentimiento informado autorizando su participación. Cada participante que esté en cualquier etapa de la investigación podrá retirarse por las razones que sean, independientemente del motivo, y no se emitirán represalias de ningún tipo o índole, dándole libertad para tomar su decisión.

6.2.Resolución 8430 de 1993

Establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud con el fin de reglamentar la investigación en seres vivos. Como figura en el artículo 5 del capítulo I del título II, respecto a los participantes, la investigación será realizada teniendo en cuenta estándares internacionales; dado que el conocimiento buscado no se puede obtener de otra manera; la investigación será realizada por personal capacitado. Una vez terminada la investigación, toda la información de carácter personal que figure en las bases de datos será destruida y eliminada, de modo que la información que quede en ellas sea completamente anónima. Dado que la investigación en algunas condiciones se realizará en menores de edad (<18 años), considerando el capítulo III, artículo 23: además de las disposiciones generales de ética que deben cumplirse en toda investigación en seres humanos, aquella que se realice en menores de edad deberá satisfacer plenamente todas las exigencias establecidas en este capítulo.

6.3.Alcance

Se verá reflejado en la retroalimentación que se realizará de los hallazgos del estudio a las instituciones participantes, con el fin de que se pueda evaluar el llevar a cabo la modificación y mejoramiento de guías y lineamientos institucionales, causas de trombocitopenia profunda y su asociación con eventos patogénicos responsables de manifestaciones clínicas.

6.4.Riesgo

Se considera una investigación con riesgo mínimo teniendo en cuenta que los estudios observacionales y analíticos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico, la realización de procedimientos mínimamente invasivos como recolección de muestra sanguínea periférica o tratamientos rutinarios; además por la población objeto (niños con sospecha de dengue) requiere de consentimiento y asentimiento informado. Todo paciente que cumplía con los criterios de ingreso al estudio contó con la firma del consentimiento informado institucional y el asentimiento, dependiendo de su edad.

6.4.1. Seguridad de la información:

Los autores garantizaron la protección de datos y confidencialidad de estos de acuerdo con la normatividad nacional e internacional, acogiéndose a la normatividad vigente, permitiendo garantizar las políticas institucionales respecto a la protección de datos y confidencialidad médica. Se realizó la aleatorización y enmascaramiento de los datos personales de las muestras para garantizar la confidencialidad de los datos, se realizó recolección de información proveniente de las historias clínicas de los pacientes, se tuvo en cuenta que no se extrajeron datos más allá de los límites, lineamientos y objetivos de la investigación, propendiendo salvaguardar la identidad de los pacientes, que fueron reconocidos solo mediante un código dentro del estudio, La base de datos fue manejada solo por un miembro del grupo de investigación. Además, los investigadores firmaron un acuerdo de confidencialidad, con el compromiso de proteger la privacidad de toda la información recolectada.

6.4.2. Declaración Del Helsinki:

Se propendió por proteger la intimidad y la confidencialidad de la información personal de cada historia clínica de los pacientes que hicieron parte en esta investigación; el proyecto de investigación no fue ejecutado hasta que fue aprobado por el comité de ética pertinente; el investigador principal y coinvestigadores estuvieron debidamente capacitados para realizar una investigación de este tipo.

6.5. Costo y Beneficio:

A todos los participantes en el estudio se les realizaron ensayos moleculares y serológicos diagnósticos para dengue, además se identificó el serotipo que está causando la infección actual. Estas pruebas no se realizaron en el laboratorio del HUHMP ni mucho menos en los hospitales de los municipios del departamento. Esta información se hizo llegar al personal médico para confirmar y continuar con el abordaje médico, además, fortaleció datos virológicos y epidemiológicos del departamento del Huila. Con esta propuesta se buscó identificar blancos terapéuticos que a mediano plazo podrán mejorar el abordaje de niños con trombocitopenia profunda secundaria a la infección por orthoflavivirus e impactar, por tanto, una de las causas de complicaciones y mortalidad de la infección por DENV.

6.6. Para las Instituciones Participantes:

La visibilidad en eventos académicos o científicos que se logró, además de un

mejoramiento potencial a mediano plazo de guías y protocolos de manejo de las complicaciones de la infección por DENV. El HUHMP se beneficia, ya que se logra el nivel de un nuevo médico especializado en pediatría mediante la ejecución de la propuesta.

6.7.Beneficio para los Investigadores

Conocimiento otorgado de los resultados del estudio sobre el manejo de esta población de riesgo. Los investigadores obtendrán reconocimiento por la publicación, siempre que esta sea considerada de interés científico. El médico residente de pediatría se beneficiará puesto que realizará su trabajo de grado dentro del marco de la propuesta.

Los Autores se acogen a las normativas establecidas en la normatividad nacional e internacional a saber:

- Declaración de Helsinki
- Guidelines for Ethical Review of Epidemiological Studies
- Pautas éticas internacionales para la investigación relacionada con la salud con seres humanos
- Pacto Internacional de los Derechos Civiles y Políticos de Naciones Unidas
- Ministerio de Salud, Resolución 8430 de 1993, Colombia.

Impacto esperado de los resultados y su aplicación: Esperamos que este estudio permita conocer los mecanismos de trombocitopenia en niños con infección por DENV y, a mediano plazo, impactar en el abordaje de las complicaciones de la infección por este arbovirus, además de obtener nuevos problemas de investigación para futuras propuestas.

6.8. Conflicto de Interés

Los investigadores proponentes de este proyecto manifestamos que no tenemos ningún conflicto de interés para la realización de este.

7. Resultados

En este estudio se incluyeron 65 pacientes con diagnóstico confirmado de infección por DENV, atendidos en el HUHMP y de estos, 10 pacientes en fase de convalecencia entre marzo de 2023 y junio de 2024. De ellos, 25 (38.5%) presentaron dengue con signos de alarma (DCSA) y 40 (61.5%) dengue grave (DG). La mediana de edad fue de 10 años (RIC: 7–11) en DCSA y 7.5 años (RIC: 4.7–11) en DG, sin diferencias estadísticamente significativas ($p=0.25$). La distribución por sexo fue similar en ambos grupos (52% femenino en DCSA vs. 42.5% en DG; $p=0.62$).

Tabla 4.

Características sociodemográficas de los pacientes incluidos.

PARÁMETROS	DCSA (n= 25)	DG (n= 40)	Valor-p (<0.05)
Femenino (n. %)	13 (52.0%)	17 (42.5%)	0.6229
Masculino (n. %)	12 (48.0%)	23 (57.5%)	0.6229
Edad (mediana RIC)	10.00 (7.00–11.00)	7.50 (4.75–11.00)	0.2502
Días de enfermedad (mediana RIC)	6.00 (6.00–7.00)	6.50 (6.00–8.00)	0.3114
Días de hospitalización (mediana RIC)	4.00 (3.00–5.00)	6.00 (5.00–8.00)	<0.0001

DCSA: dengue con signos de alarma, DG: dengue grave, RIC: rango intercuartílico.

Los días de enfermedad no mostraron diferencias significativas (mediana: 6 días [RIC: 6–7] en DCSA vs. 6.5 en DG [RIC: 6–7]; $p=0.31$). Sin embargo, la estancia hospitalaria fue significativamente mayor en el grupo con DG (6 días (RIC: 5–8) vs. 4 días (RIC: 3–5); $p<0.0001$) (Tabla 4). La cohorte fue homogénea en las demás variables sociodemográficas y el tiempo de hospitalización el único parámetro significativamente mayor en los pacientes con DG.

7.1. Caracterización Clínica de la Cohorte Pediátrica

Para la caracterización clínica, se siguió la guía revisada de la OMS de 2009 y actualizada en 2015 (33). En relación con las manifestaciones clínicas, los síntomas más frecuentes en ambos grupos fueron fiebre (76% en DCSA vs. 75% en DG) y cefalea (72% vs. 52.5%), aunque sin diferencias significativas. En contraste, la presencia de ascitis (22.5% vs. 0%; $p=0.0046$), choque por dengue (42.5% vs. 0%; $p<0.0001$), daño orgánico (32.5% vs. 0%; $p=0.0006$) y sangrado (55% vs. 20%; $p=0.008$) se observó con mayor frecuencia en el grupo de dengue grave (Tabla 5).

Tabla 5.

Manifestaciones clínicas

PARÁMETROS	DCSA (n= 25)	DG (n= 40)	Valor-p (<0.05)
Frecuencia cardiaca (lpm) (mediana RIC)	108.0 (100.0–120.0)	110.0 (100.0–129.0)	0.4582
Frecuencia respiratoria (rpm) (mediana RIC)	24.0 (22.00–28.00)	26.0 (22.00–30.00)	0.3744
Temperatura (°C) (mediana RIC)	37.30 (36.60–38.00)	37.10 (36.70–37.80)	0.9147
Fiebre (n. %)	19 (76.0%)	30 (75.0%)	1
Cefalea (n. %)	18 (72.0%)	21 (52.5%)	0.1609
Emesis (n. %)	17 (68.0%)	22 (55.0%)	0.4512
Dolor abdominal (n. %)	11 (44.0%)	23 (57.5%)	0.3481
Hepatomegalia (n. %)	7 (28.0%)	18 (45.0%)	0.2702
Sangrado (n. %)	5 (20.0%)	22 (55.0%)	0.008
Dolor retroocular (n. %)	9 (36.0%)	10 (25.0%)	0.4235
Mialgias (n. %)	17 (68.0%)	18 (45.0%)	0.1097
Artralgias (n. %)	8 (32.0%)	8 (20.0%)	0.3758
Rash (n. %)	12 (48.0%)	15 (37.5%)	0.4667
Somnolencia o irritabilidad (n. %)	8 (32.0%)	18 (45.0%)	0.4286
Ascitis (n. %)	0 (0.0%)	9 (22.5%)	0.0046
Choque por dengue (n. %)	0 (0.0%)	17 (42.5%)	<0.0001
Daño de órgano (n. %)	0 (0.0%)	13 (32.5%)	0.0006

DCSA: dengue con signos de alarma, DG: dengue grave, RIC: rango intercuartílico.

7.1. Características de laboratorio

Las pruebas de laboratorio clínico mostraron diferencias marcadas entre pacientes con DCSA y aquellos con DG (Tabla 6). El recuento plaquetario fue significativamente menor en DG (mediana $58.5 \times 10^3/\mu\text{L}$, RIC 35–88) comparado con DCSA ($115 \times 10^3/\mu\text{L}$, RIC 73–170), ($p = 0.0002$). Los índices de tamaño y heterogeneidad plaquetaria se encontraron aumentados en DG (MPV: 11.4 fL vs 10.6 fL, $p = 0.0242$; PDW: 13.9% vs 12.8%, $p = 0.0199$), hallazgo compatible con un aumento del recambio plaquetario.

Tabla 6.

Pruebas de laboratorio

PARÁMETROS (mediana RIC)	DCSA (n= 25)	DG (n= 40)	Valor-p (<0.05)
Leucocitos (/μL)	5,600.0 (4.200.00–8.200.00)	6,400.0 (4.300.00–9.750.00)	0.4301
Hematocrito (%)	38.40 (35.20–41.00)	39.70 (35.70–43.80)	0.2165
Plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	115.00 (73.00–170.00)	58.50 (35.00–88.00)	0.0002
MPV (fL)	10.60 (9.60–11.45)	11.40 (10.10–12.30)	0.0242
PCT (%)	0.15 (0.10–0.22)	0.12 (0.09–0.17)	0.1181
PDW (%)	12.80 (11.70–14.20)	13.90 (12.50–15.60)	0.0199
AST (TGO) (UI/L)	77.00 (40.00–195.00)	148.50 (74.75–310.00)	0.0312
ALT (TGP) (UI/L)	52.00 (23.00–118.00)	83.50 (37.25–175.25)	0.1192
CPK (U/L)	140.00 (74.00–269.00)	204.00 (83.00–512.00)	0.3112
CK-MB (U/L)	20.00 (16.00–25.00)	22.00 (17.00–30.00)	0.2662
Albumina (g/dL)	3.60 (3.30–3.80)	3.40 (3.10–3.70)	0.0678
Dimero D (ng/mL)	650.0 (500.0–1.000.0)	1.000.0 (700.0–2.000.0)	0.0211
Creatinina (mg/dL)	0.50 (0.40–0.60)	0.60 (0.40–0.80)	0.0547
PT (seg)	13.90 (13.10–14.50)	14.70 (13.80–16.10)	0.003

PTT (seg)	31.50 (29.20–35.20)	34.80 (31.80–40.00)	0.0048
INR	1.06 (1.00–1.12)	1.14 (1.06–1.28)	0.0022

DCSA: dengue con signos de alarma, DG: dengue grave, RIC: rango intercuartílico.

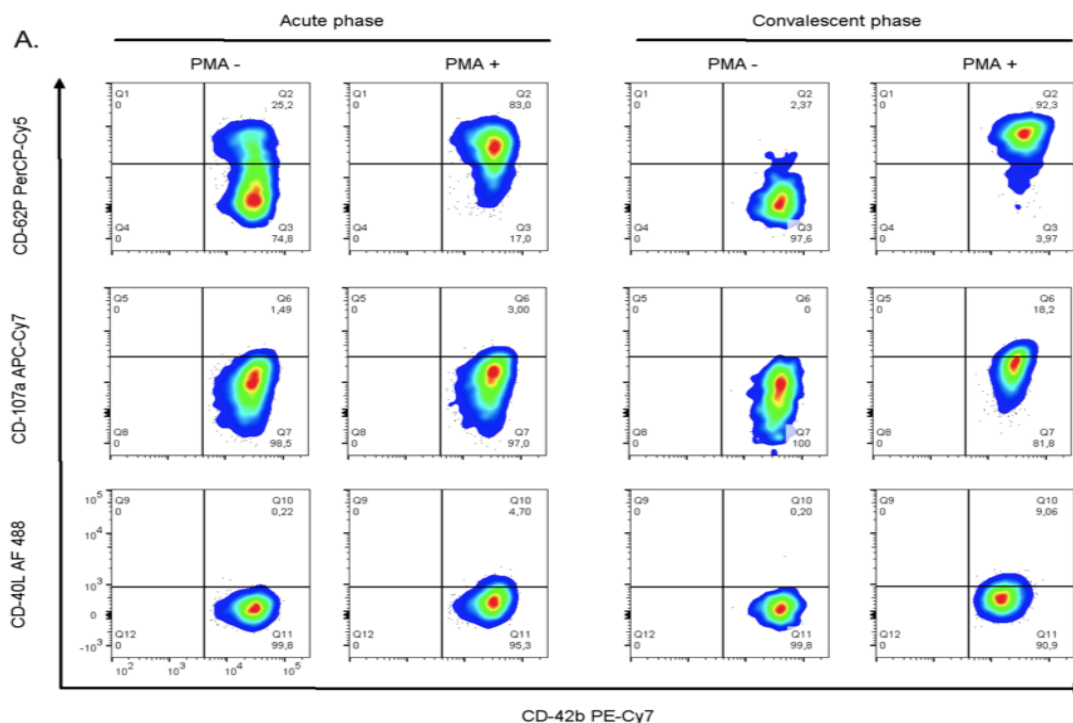
En relación con la función hepática y la hemostasia, los pacientes con DG presentaron elevación de AST (mediana 148.5 U/L vs 77 U/L; $p = 0.0312$) y alteraciones del sistema de coagulación: mayor dímero-D (1,000 ng/mL vs 650 ng/mL; $p = 0.0211$) y prolongación de TP ($p = 0.003$), TPT ($p = 0.0048$) e INR ($p = 0.0022$). Estos resultados indican activación del sistema de coagulación y posible coagulopatía de consumo o alteración de la síntesis hepática en los casos graves. No se observaron diferencias significativas en leucocitos ni hematocrito entre los grupos. En conjunto, estos resultados destacan la adecuada clasificación de los pacientes del estudio.

7.2. Análisis de la Activación Plaquetaria por Citometría de Flujo

La evaluación por citometría de flujo de plaquetas CD42b⁺ en sangre total reveló un fenotipo de activación celular diferencial entre la fase aguda y la convaleciente de la infección por DENV (Figura 3). En la fase aguda de la infección, las plaquetas no estimuladas mostraron una expresión basal elevada de CD62P, CD107 α y CD40L, lo que evidencia una activación *in vivo* asociada a la infección natural por DENV (Figura 3).

Figura 3.

Evaluación de la activación plaquetaria mediante citometría de flujo.



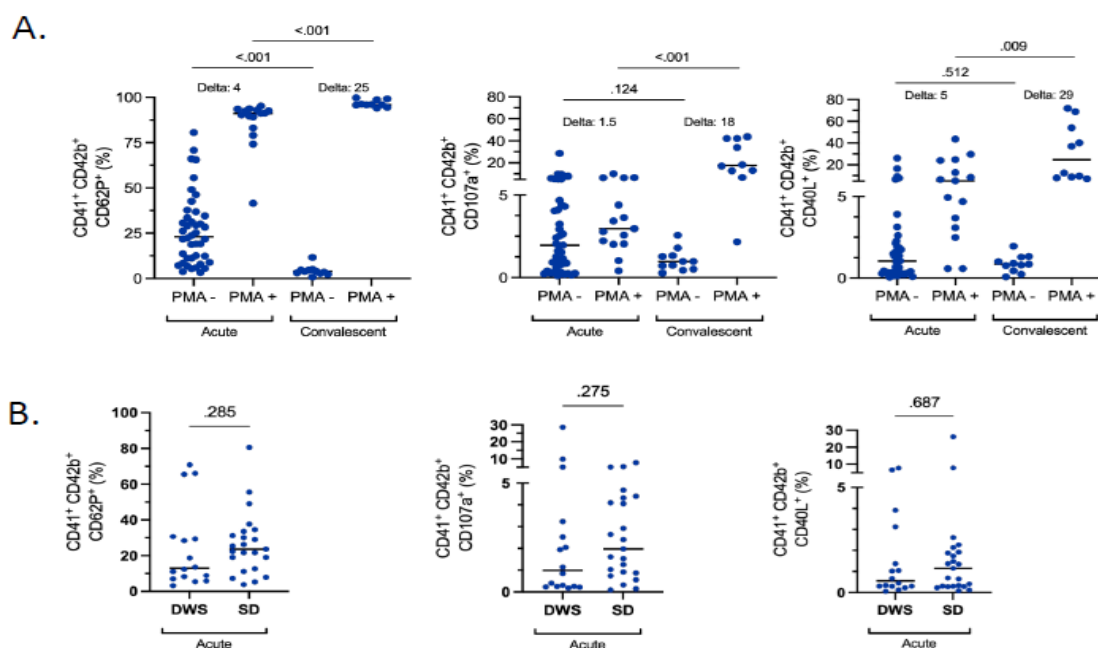
Plaquetas identificadas como CD42b⁺ fueron analizadas por citometría de flujo en sangre total de pacientes durante las fases aguda y convaleciente de la infección por DENV. Se evaluó la expresión basal (PMA-) y la respuesta a la estimulación con phorbol 12-myristate 13-acetato (PMA+). Los paneles muestran la proporción de plaquetas positivas para CD62P (P-selectina, marcador de desgranulación alfa), CD107α (LAMP-1, marcador de desgranulación lisosomal) y CD40L (CD154, ligando coestimulador).

Sin embargo, tras la estimulación ex vivo con PMA, la capacidad de respuesta adicional fue limitada (Δ CD62P: 3.6; CD107α: 1.83; CD40L: 4.8), lo que sugiere un fenómeno de agotamiento plaquetario funcional inducido por la infección (Figura 4A). En contraste, en la fase de convalecencia, las plaquetas presentaron niveles bajos de activación basal (sin estímulo,

PMA-), pero una respuesta muy robusta ante la estimulación con PMA (Δ CD62P: 24.3; CD107 α : 14.0; CD40L: 10.5) (Figura 4A), lo que indica una restauración progresiva de la capacidad funcional plaquetaria tras la infección. Estos hallazgos confirman que el dengue induce una activación plaquetaria significativa en fase aguda y que dicha activación se acompaña de una menor capacidad de respuesta a estímulos adicionales, fenómeno que se normaliza en convalecencia.

Figura 4.

Resumen de la activación plaquetaria en la fase aguda y en la convalecencia, y su relación con la gravedad clínica.



(A) Boxplots que muestran el % de plaquetas CD42b⁺ positivas para CD62P, CD107 α y CD40L en condiciones basales (PMA-) y tras estimulación con PMA (PMA+), en fase aguda y en convalecencia. (Δ

= PMA+ – PMA–). En fase aguda y convalecencia; p-valor por prueba de Wilcoxon pareada. (B) Boxplots estratificados por severidad clínica (dengue con signos de alarma [DWS en inglés] vs. Dengue grave [SD en inglés]) mostrando activación basal no significativa. Pruebas: Wilcoxon pareada para comparaciones pareadas, Mann–Whitney para comparaciones entre grupos no pareados. $p < 0.05$.

Esto respalda el papel del DENV como inductor directo de la activación plaquetaria y aporta un mecanismo para la trombocitopenia y la disfunción inmune y hemostática observadas clínicamente.

7.3.Relación de la activación plaquetaria y la gravedad clínica

Posteriormente, analizamos la relación entre los marcadores de activación plaquetaria evaluados y la gravedad clínica de los pacientes . Como se observa en la Figura 4B, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de DCSA y DG en la fase aguda de la enfermedad.

7.4. NS1 asociada a plaquetas induce activación celular y trombocitopenia.

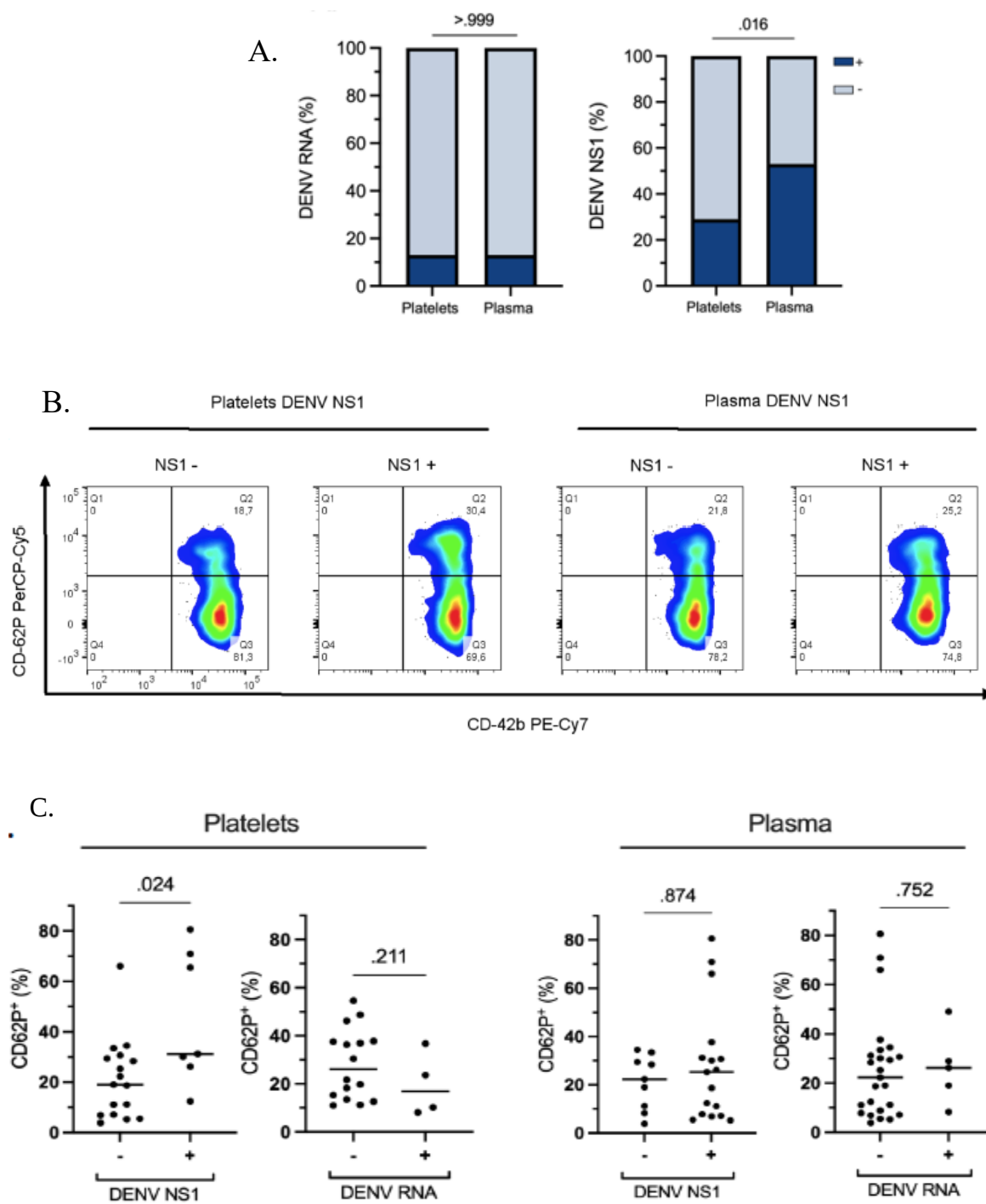
En las plaquetas purificadas por centrifugación y en el plasma pareado de los niños del grupo de estudio se evaluó la presencia de RNA viral mediante RT-qPCR y de la proteína NS1 mediante ELISA. Tras el análisis preliminar, no se observaron diferencias en la frecuencia de detección de RNA viral ni de NS1 entre las plaquetas y los plasmas de todos los niños evaluados (Figura 5A).

Posteriormente se analizó por citometría de flujo multiparamétrica el fenotipo plaquetario dependiendo de la presencia o ausencia de NS1 en las plaquetas o en el plasma pareado (Figura

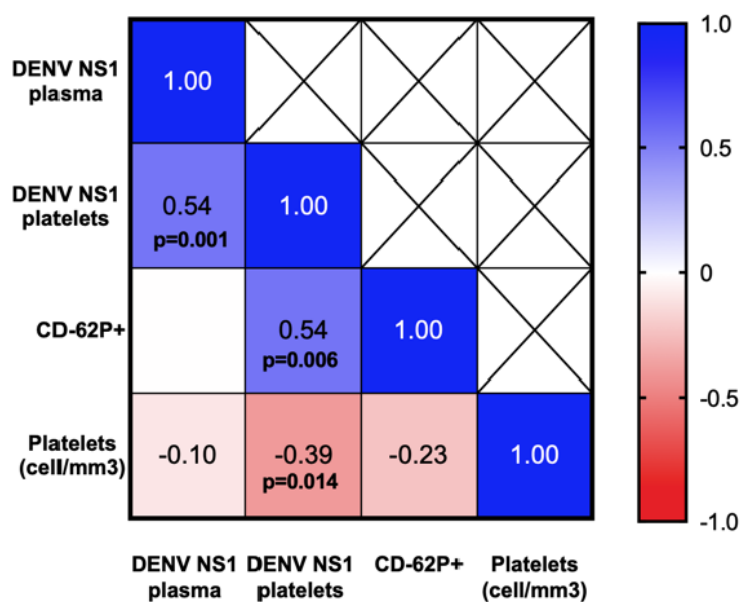
5B). La presencia de NS1, pero no del RNA viral, en las plaquetas se asoció con una mayor expresión de CD62P, lo que demuestra el efecto activador de la proteína viral sobre esta célula. La Figura 5C muestra el resumen de los experimentos y demuestra que la presencia de NS1, pero no el RNA viral en la plaqueta o en el plasma induce una significativa expresión de CD62P en superficie, soportando que particularmente la NS1 asociada a plaquetas, pero no la soluble en plasma es un fuerte estímulo activador para esta célula (Figura 5C).

Posteriormente, determinamos el efecto biológico de la adhesión de NS1 en plaquetas y, para ello, buscamos correlaciones entre la NS1 asociada a plaquetas y diversos eventos patogénicos característicos de la infección por DENV. La cantidad relativa de NS1 en plaquetas, se asoció moderadamente a la cantidad de NS1 encontrada en el plasma, lo que demuestra que el plasma y las plaquetas son compartimentos relacionados, pero no del todo dependientes durante la infección por DENV (Figura 5D).

Consistentemente, se encontró una correlación positiva moderada entre el nivel de NS1 plaquetaria y los bajos recuentos plaquetarios ($\rho = 0.39$, $p = 0.014$). En conjunto, estos hallazgos indican que NS1 asociada a plaquetas está relacionada con la activación plaquetaria *in vivo* y con mecanismos que podrían favorecer el consumo/”clearance” plaquetario observado en los pacientes con dengue.

Figura 5.*Efectos de la NS1 asociada a plaquetas.*

D.



(A) Detección de RNA viral por RT-PCR y NS1 por ELISA en plaquetas purificadas y plasma. (B) Expresión de marcadores de activación en plaquetas CD42b⁺ (CD62P) en fase aguda en plaquetas purificadas y plasma dependiendo de la presencia o ausencia de NS1. (C) Resumen de los experimentos mostrados en B. Las medianas son mostradas. (D) Matriz de correlación de Spearman y diagrama de densidad que muestra la fuerza de la correlación y el valor estadístico de la prueba de Spearman. Considera como significativo $p < 0.05$

8. Discusión

Los resultados de este estudio en población pediátrica con dengue permiten profundizar en los mecanismos clínicos y fisiopatológicos que subyacen a la progresión hacia formas graves de la enfermedad. Una primera observación fue la similitud en las características sociodemográficas entre los pacientes con DCSA y los con DG. La edad, el sexo y los días de fiebre al momento de la consulta fueron comparables entre ambos grupos, lo que indica que dichos factores no constituyen factores determinantes de la severidad. El único parámetro con diferencia significativa fue la duración de la hospitalización, mayor en los casos de DG, lo que refleja la necesidad de un manejo clínico más intensivo. Este hallazgo coincide con lo reportado en cohortes asiáticas y latinoamericanas, donde las variables demográficas no fueron, en su mayoría, determinantes asociados a DG, siendo los parámetros hematológicos y bioquímicos los principales factores descritos (40).

En nuestro estudio, los síntomas clásicos de dengue —como fiebre, cefalea, mialgias, artralgias, dolor retroocular y rash— no mostraron diferencias significativas entre los grupos analizados. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito previamente en cohortes pediátricas, en las que las manifestaciones clínicas iniciales no permiten discriminar el riesgo de progresión a formas graves. Esto tiene implicaciones relevantes para la práctica clínica, ya que en la población infantil la semiología clásica del dengue resulta poco específica y no refleja necesariamente la magnitud del compromiso endotelial ni la activación plaquetaria subyacente. La interpretación de estos datos refuerza la necesidad de contar con biomarcadores objetivos, como los derivados del laboratorio hematológico y las pruebas plaquetarias funcionales, que permitan evaluar y, posiblemente, anticipar con mayor precisión la evolución clínica.

Los resultados de laboratorio aportaron información crítica a nuestro análisis. En los pacientes con DG se observó una trombocitopenia significativamente más profunda que en los niños con DCSA, acompañada de incrementos en los índices de tamaño plaquetario. Estos hallazgos sugieren un aumento del recambio plaquetario, con liberación de plaquetas jóvenes de mayor tamaño, aunque posiblemente con funcionalidad alterada. Estudios previos han descrito que un MPV elevado es un marcador indirecto de la destrucción acelerada de plaquetas y se ha asociado con una evolución desfavorable en el dengue (5). Además, se observaron alteraciones significativas en las pruebas de coagulación, incluyendo prolongación del TP y del TPT, aumento del INR y niveles elevados de dímero D, junto con un incremento de AST como marcador de daño hepático. Este perfil corresponde a una coagulopatía de consumo y a una disfunción hepática, características que han sido vinculadas con el desarrollo de shock y hemorragia en DG (19). Fisiopatológicamente, estas alteraciones reflejan la activación del sistema de coagulación inducida por el virus y la pérdida de la capacidad reguladora del endotelio

Un hallazgo central de este trabajo fue la evidencia de un estado de activación elevado de las plaquetas durante la fase aguda del dengue, acompañado de una capacidad reducida de respuesta ante estímulos exógenos, como la PMA. Esta combinación configura un fenotipo de agotamiento plaquetario funcional. Las plaquetas de los niños en fase aguda mostraron un incremento de CD62P, CD107 α y CD40L, marcadores reconocidos como de activación y desgranulación, incluso sin estímulo *in vitro*, lo que indica una activación *in vivo* inducida por el DENV y el ambiente inflamatorio. Al mismo tiempo, la baja respuesta frente al PMA sugiere que las plaquetas activadas circulantes ya están parcialmente “consumidas” en términos de su reserva funcional. Este patrón ha sido descrito en otros modelos infecciosos, pero cobra especial

relevancia en el dengue, donde se ha demostrado que la proteína viral NS1 puede inducir la activación plaquetaria a través del TLR4 y favorecer la desgranulación (41). Clínicamente, este estado de agotamiento funcional limita la capacidad de las plaquetas para responder ante lesiones vasculares, lo que contribuye al riesgo hemorrágico observado en los pacientes.

La comparación entre pacientes con DCSA y DG evidenció una tendencia no significativa entre el grado de activación plaquetaria y la severidad clínica. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que la activación plaquetaria exacerbada podría asociarse a formas severas de la enfermedad, aunque está pendiente de extender estos estudios incluyendo por ejemplo niños con dengue sin signos de alarma. Varios estudios han mostrado que los niveles de CD62P y CD40L se encuentran más elevados en el dengue y que la disfunción plaquetaria es un componente crítico en la fisiopatología (41). Desde una perspectiva clínica, la monitorización de la activación plaquetaria mediante citometría de flujo o biomarcadores solubles podría ser una potencial herramienta de estratificación de riesgo, aunque su implementación requeriría validación en entornos hospitalarios e infraestructura más compleja.

Otro aspecto especialmente relevante de este estudio fue la detección pareada de NS1 y de RNA viral tanto en plaquetas purificadas como en plasma. La presencia de estos componentes virales en la fracción plaquetaria constituye evidencia de que las plaquetas pueden actuar como blancos directos o como reservorios transitorios de partículas virales o sus componentes. Esta observación es congruente con lo descrito por Platel y colaboradores, quienes demostraron la relación de NS1 con la activación plaquetaria y la formación de agregados (4)(43). En nuestro estudio, la presencia de NS1 en plaquetas se asoció con una mayor activación, una menor capacidad de respuesta a estímulos y una trombocitopenia más profunda. Este patrón apoya el modelo fisiopatológico en el cual NS1 contribuye directamente al consumo plaquetario,

favoreciendo la fagocitosis o el “clearance” mediado por el complemento (42). Trabajos previos han mostrado que NS1 puede activar plaquetas mediante receptores inmunitarios y aumentar su agregación (28). Estas evidencias sugieren que terapias dirigidas contra NS1 podrían mitigar parte del daño plaquetario observado en DG, aunque dicha hipótesis requiere validación experimental y clínica.

Una visión integradora de los resultados de este trabajo muestra que la trombocitopenia observada en el dengue y sus formas graves no es únicamente cuantitativa, sino también funcional. Las plaquetas no solo se encuentran disminuidas en número, sino que además presentan un fenotipo activado y funcionalmente agotado, con alteraciones en su capacidad de respuesta y en su rol hemostático y de regulación de las funciones inmunes. Esta doble dimensión del problema —disminución numérica y alteración funcional— permite explicar con mayor precisión la complejidad clínica del dengue, caracterizado por fuga vascular, sangrados y alteraciones de la coagulación que generalmente no se correlacionan con la magnitud de la trombocitopenia. Esta concepción coincide con modelos fisiopatológicos integrales que describen la interacción entre NS1, la activación del complemento, la disfunción endotelial y la activación plaquetaria como elementos clave en la fisiopatología del DG (42). La integración de estos hallazgos abre la puerta a explorar estrategias terapéuticas que no solo busquen mantener el recuento plaquetario, sino también preservar la función plaquetaria y modular los efectos directos de NS1 sobre estas células sanguíneas.

Este trabajo presenta limitaciones que deben considerarse. En primer lugar, el tamaño muestral, aunque suficiente para describir patrones fisiopatológicos, limitó la potencia de detección de diferencias entre categorías de severidad clínica. A esto se suma que no se incluyeron niños con diagnóstico de dengue sin signos de alarma, lo que restringe el análisis al

espectro clínico de mayor complejidad y dificulta establecer comparaciones que permitan comprender completamente la progresión desde formas leves hacia cuadros graves. Solo un subgrupo de pacientes retornó para la toma de la muestra de convalecencia, lo que limitó el análisis longitudinal.

9. Conclusiones

- El DENV induce activación plaquetaria dado el incremento de los marcadores CD62P, CD107 α y CD40L, evidenciando un estado de activación plaquetaria in vivo durante la fase aguda.
- La detección de RNA viral y proteína NS1 tanto en plasma como en plaquetas demuestra que ambos compartimentos participan en la infección; sin embargo, la correlación entre las concentraciones en plasma y en plaquetas indica que son compartimentos parcialmente dependientes, con dinámicas de replicación y aclaramiento diferentes.
- A pesar de su fenotipo activado, las plaquetas muestran una capacidad reducida de respuesta a estímulos, lo que refleja disfunción o agotamiento. Este hallazgo, sumado a la trombocitopenia y a las alteraciones en los parámetros de coagulación, sugiere que la disfunción plaquetaria en el dengue no es solo cuantitativa, sino también funcional, lo que podría explicar algunas manifestaciones clínicas observadas en los casos graves.
- La presencia de NS1 en plaquetas se correlacionó con una mayor expresión de CD62P y con recuentos plaquetarios más bajos, lo que indica que NS1 asociada a plaquetas es un factor clave en la activación y el consumo plaquetario. Este mecanismo podría representar un eje fisiopatológico relevante en el desarrollo de la trombocitopenia y la severidad clínica en el dengue pediátrico, abriendo la posibilidad de intervenciones terapéuticas dirigidas a bloquear la interacción NS1–plaqueta.

Referencias Bibliográficas

1. Nachman RL, Rafii S. Platelets, Petechiae, and Preservation of the Vascular Wall. *New England Journal of Medicine*. 2008 Sep 18;359(12):1261–70.
2. Hottz ED, Medeiros-de-Moraes IM, Vieira-de-Abreu A, de Assis EF, Vals-de-Souza R, Castro-Faria-Neto HC, et al. Platelet Activation and Apoptosis Modulate Monocyte Inflammatory Responses in Dengue. *The Journal of Immunology*. 2014 Aug 15;193(4):1864–72.
3. Yun SH, Sim EH, Goh RY, Park JI, Han JY. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. Vol. 2016, *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2016.
4. García-Larragoiti N, Kim YC, López-Camacho C, Cano-Méndez A, López-Castaneda S, Hernández-Hernández D, et al. Platelet activation and aggregation response to dengue virus nonstructural protein 1 and domains. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2021 Oct 1;19(10):2572–82.
5. Arora S, Gupta M, Tahlan A, Gupta S, Jesrani G. Role of mean platelet volume and platelet distribution width in assessing the severity of dengue fever: An observational study. *J Dr NTR Univ Health Sci*. 2022 Oct;11(4):328.
6. Hottz ED, Bozza FA, Bozza PT. Platelets in immune response to virus and immunopathology of viral infections. Vol. 5, *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.; 2018.
7. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PCG, Nogueira RMR, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell

- death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2013 May;11(5):951–62.
8. Whitehorn J, Kien DTH, Nguyen NM, Nguyen HL, Kyrylos PP, Carrington LB, et al. Comparative susceptibility of *aedes albopictus* and *aedes aegypti* to dengue virus infection after feeding on blood of viremic humans: Implications for public health. *Journal of Infectious Diseases*. 2015 Oct 15;212(8):1182–90.
 9. Danis-Lozano R, Díaz-González EE, Malo-García IR, Rodríguez MH, Ramos-Castañeda J, Juárez-Palma L, et al. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and its role in the epidemiological persistence of dengue in Central and Southern Mexico. *Tropical Medicine and International Health*. 2019 Nov 1;24(11):1311–9.
 10. Reveiz L. Evidence synthesis: guidelines for diagnosis and treatment of dengue, chikungunya, and zika in the Region of the Americas. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*. 2022;46.
 11. Wen J, Tang WW, Sheets N, Ellison J, Sette A, Kim K, et al. Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8⁺ T cells. *Nat Microbiol*. 2017 Mar 13;2.
 12. Ngono AE, Shresta S. Immune Response to Dengue and Zika. 2025; Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol->
 13. Wen J, Shresta S. Antigenic cross-reactivity between Zika and dengue viruses: is it time to develop a universal vaccine? Vol. 59, *Current Opinion in Immunology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 1–8.
 14. Halstead SB. Seminar Dengue [Internet]. Vol. 370, www.thelancet.com. 2007.

Available from: www.thelancet.com

15. McArthur MA, Sztein MB, Edelman R. Dengue vaccines: Recent developments, ongoing challenges and current candidates. Vol. 12, Expert Review of Vaccines. 2013. p. 933–53.
16. Kar M, Singla M, Chandele A, Kabra SK, Lodha R, Medigeshi GR. Dengue virus entry and replication does not lead to productive infection in platelets. Open Forum Infect Dis. 2017 Mar 1;4(2).
17. Tsai JJ, Liu LT, Chang K, Wang SH, Hsiao HM, Clark KB, et al. The importance of hematopoietic progenitor cells in dengue. Vol. 3, Therapeutic Advances in Hematology. 2012. p. 59–71.
18. Huang J, Liang W, Chen S, Zhu Y, Chen H, Mok CKP, et al. Serum Cytokine Profiles in Patients with Dengue Fever at the Acute Infection Phase. Dis Markers. 2018;2018.
19. De Azeredo EL, Monteiro RQ, De-Oliveira Pinto LM. Thrombocytopenia in dengue: Interrelationship between virus and the imbalance between coagulation and fibrinolysis and inflammatory mediators. Vol. 2015, Mediators of Inflammation. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
20. Colombia, I., 2025, Boletín Epidemiológico Semanal, Semana Epidemiológica 13, 23 al 29 de marzo de 2025.
21. Khazali AS, Hadrawi WH, Ibrahim F, Othman S, Nor Rashid N. Thrombocytopenia in dengue infection: mechanisms and a potential application. Vol. 26, Expert Reviews in Molecular Medicine. Cambridge University Press; 2024.
22. Yadav S, Storrie B. The cellular basis of platelet secretion: Emerging

- structure/function relationships. Vol. 28, Platelets. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 108–18.
23. Dib PRB, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, Pinheiro MBM, Rozini SV, Andrade FB, et al. Innate immune receptors in platelets and platelet-leukocyte interactions. Vol. 108, *Journal of Leukocyte Biology*. John Wiley and Sons Inc; 2020. p. 1157–82.
 24. Lahon A, Arya RP, Banerjea AC. Dengue Virus Dysregulates Master Transcription Factors and PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Megakaryocytes. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Aug 26;11.
 25. Malavige GN, Ogg GS. Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. Vol. 151, *Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 261–9.
 26. Gandikota C, Mohammed F, Gandhi L, Maisnam D, Mattam U, Rathore D, et al. Mitochondrial Import of Dengue Virus NS3 Protease and Cleavage of GrpEL1, a Cochaperone of Mitochondrial Hsp70 [Internet]. 2020. Available from: <https://doi.org/10>
 27. Bermejo-Jambrina M, Eder J, Helgers LC, Hertoghs N, Nijmeijer BM, Stunnenberg M, et al. C-type lectin receptors in antiviral immunity and viral escape. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
 28. Chao CH, Wu WC, Lai YC, Tsai PJ, Perng GC, Lin YS, et al. Dengue virus nonstructural protein 1 activates platelets via Toll-like receptor 4, leading to thrombocytopenia and hemorrhage. *PLoS Pathog*. 2019;15(4).
 29. Grange L, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A, Gresh L, Paul R, Harris E. Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research

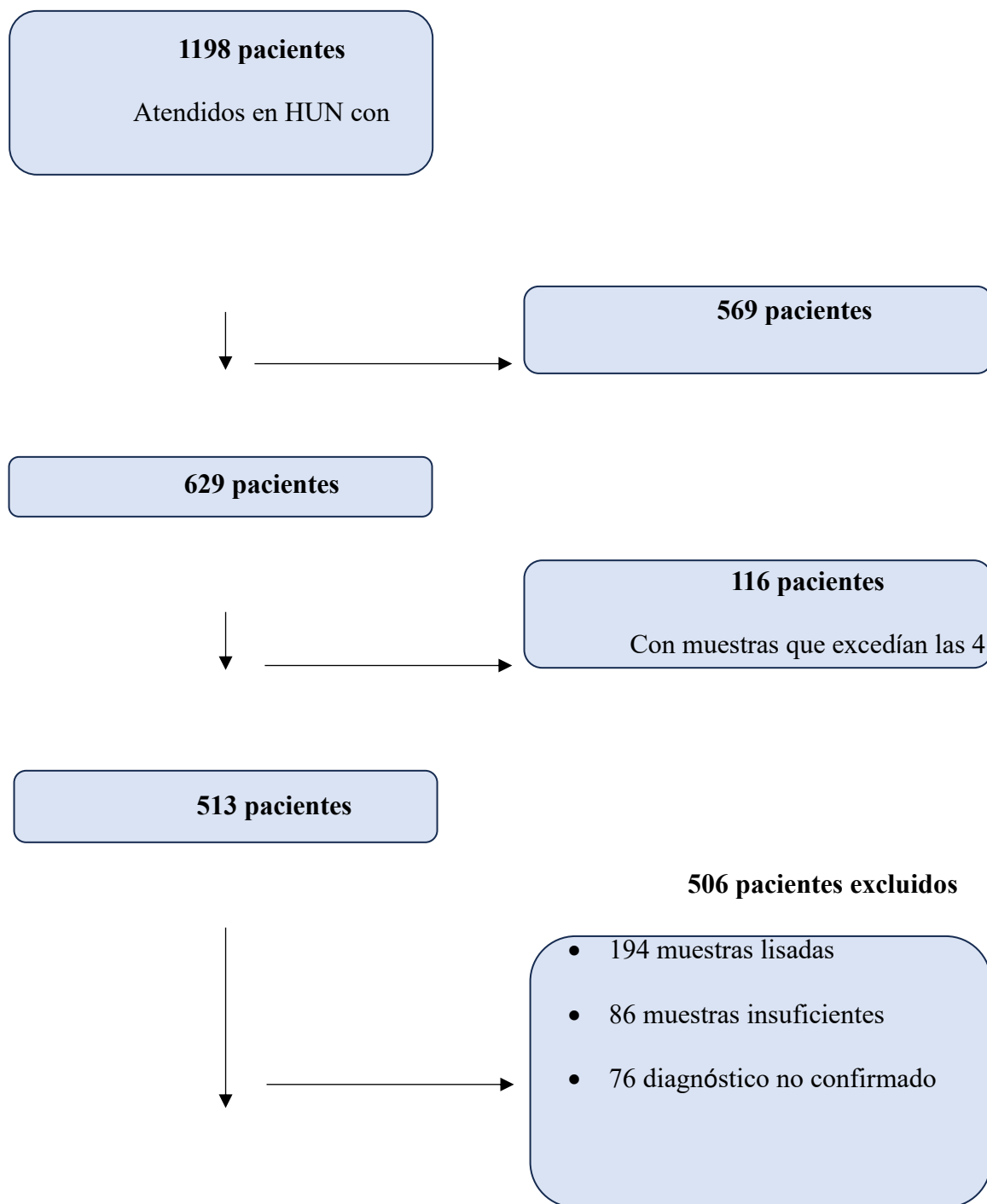
- Foundation; 2014.
30. Wilder-Smith A, Ooi EE, Horstick O, Wills B. Dengue. Vol. 393, The Lancet. Lancet Publishing Group; 2019. p. 350–63.
 31. Organización Panamericana de la Salud. Dengue: guías para la atención de enfermos en la Región de las Américas. 2.ed. Washington, DC: OPS, 2015.
 32. Lee TH, Lee LK, Lye DC, Leo YS. Current management of severe dengue infection. Vol. 15, Expert Review of Anti-Infective Therapy. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 67–78.
 33. Dengue: Guidelines for diagnosis treatment prevention and control (New edition). World Health Organization; 2014. Available from: www.who.int/tdr [Internet]. Available from: www.who.int/tdr
 34. Parkash O, Shueb RH. Diagnosis of dengue infection using conventional and biosensor based techniques. Vol. 7, Viruses. MDPI AG; 2015. p. 5410–27.
 35. Kok BH, Lim HT, Lim CP, Lai NS, Leow CY, Leow CH. Dengue virus infection – a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. Vol. 324, Virus Research. Elsevier B.V.; 2023.
 36. Tejo AM, Hamasaki DT, Menezes LM, Ho YL. Severe dengue in the intensive care unit. Vol. 4, Journal of Intensive Medicine. Chinese Medical Association; 2024. p. 16–33.
 37. Paz-Bailey G, Adams LE, Deen J, Anderson KB, Katzelnick LC. Dengue. Vol. 403, The Lancet. Elsevier B.V.; 2024. p. 667–82.
 38. Delgado SL, Perilla PM, Salgado DM, Rojas MC, Narváez CF. Efficiency of Automated Viral RNA Purification for Pediatric Studies of Dengue and Zika in

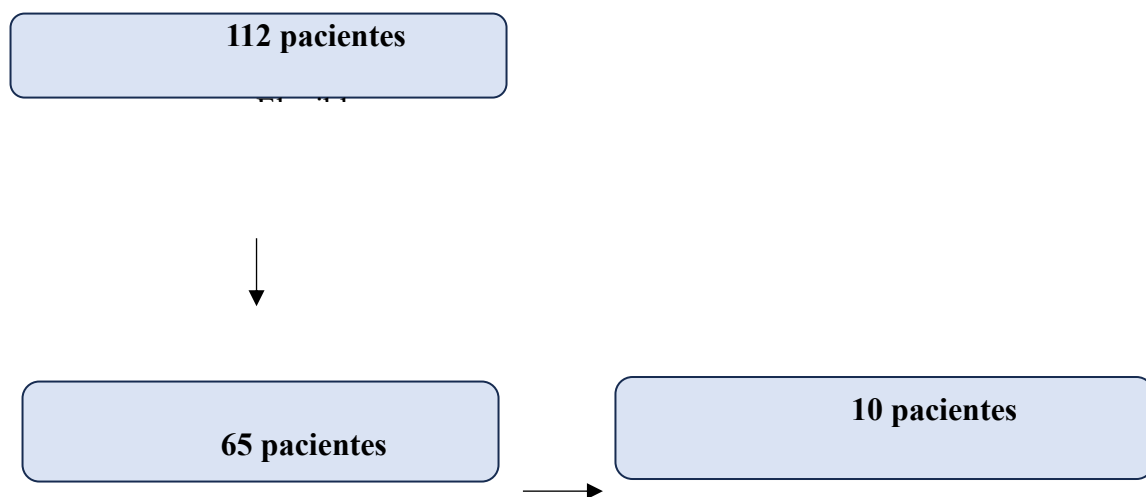
- Hyperendemic Areas. *J Trop Med*. 2023;2023.
39. Sánchez JL, Salgado DM, Vega MR, Castro-Trujillo S, Narváez CF. Utility of the WHO dengue guidelines in pediatric immunological studies. *J Trop Pediatr*. 2024 Aug 1;70(4).
 40. Wei KC, Sy CL, Wang WH, Wu CL, Chang S, Huang YT. Major acute cardiovascular events after dengue infection—A population-based observational study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 Feb 1;16(2).
 41. Aguilar-Briseño JA, Upasani V, Ellen BM ter, Moser J, Pauzuolis M, Ruiz-Silva M, et al. TLR2 on blood monocytes senses dengue virus infection and its expression correlates with disease pathogenesis. *Nat Commun*. 2020 Dec 1;11(1).
 42. Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, et al. Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity [Internet]. 2015. Available from: www.ScienceTranslationalMedicine.org

ANEXOS

Anexo A.

Flujograma selección de pacientes.





Anexo B.*Jornada de actualización sobre dengue a secretaria de salud del Huila*

La Jornada de actualización sobre dengue dirigida al personal de la Secretaría de Salud del Huila tuvo como objetivo fortalecer los conocimientos técnicos y clínicos sobre la vigilancia, el diagnóstico y el manejo integral del dengue, con énfasis en los criterios de gravedad y la atención oportuna. Durante la jornada se abordaron aspectos epidemiológicos actuales, lineamientos normativos y estrategias de prevención y control, contribuyendo a la toma de decisiones informadas y al fortalecimiento de la respuesta institucional frente a esta enfermedad endémica en la región.

Anexo C.

División de Inmunología de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana y Bacteriología de secretaria de salud del Huila – jornada de capacitación en detección NS1 dengue por técnica ELISA.



La jornada de capacitación en detección de NS1 de dengue por técnica ELISA, desarrollada por la División de Inmunología de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana en articulación con el área de Bacteriología de la Secretaría de Salud del Huila, estuvo orientada al fortalecimiento de las capacidades diagnósticas del personal de laboratorio. La actividad abordó los fundamentos inmunológicos de la detección del antígeno NS1, los principios técnicos del ELISA, así como aspectos de calidad analítica e interpretación de

resultados, contribuyendo a mejorar la detección temprana y la vigilancia del dengue en el departamento.

Anexo D.

Participación Jornadas académicas: XXXIII Jornadas Huilenses de Pediatría, realizadas el 31 de mayo de 2024.





UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA

ACREDITACIÓN INSTITUCIONAL
**DE ALTA CALIDAD
MULTICAMPUS**

REG. MIN. No. 000012 del 11 de 2012

**LA SUSCRITA COORDINADORA DE LA ESPECIALIZACIÓN EN
PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EN LA SALUD DE LA
UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA DE NEIVA**

HACE CONSTAR

Que, el Dr. JOHNATAN LOZANO CULMA con cedula 1109843412, residente de la Especialización en Pediatría de la Facultad de Ciencias en la Salud de la Universidad Surcolombiana, participo en la realización del poster:

- PLAQUETAS EN DENGUE: COMPARTIMIENTO VIRAL E INMUNE, en las XXXIII Jornadas Huilenses de Pediatría, realizadas el 31 de mayo de 2024, en el Centro de Convenciones José Eustasio Rivera

El presente certificado se expide a solicitud del interesado.

Dado en Neiva a los cuatro (4) días del mes de junio de 2024.



SANDRA DEL PILAR PÉREZ LOPEZ
Coordinadora Postgrado de Pediatría
Universidad Surcolombiana.

La participación en las XXXIII Jornadas Huilenses de Pediatría, realizadas el 31 de mayo de 2024, representó un espacio académico para la actualización y el intercambio de conocimientos en temas relevantes de la práctica pediátrica. El evento permitió fortalecer competencias clínicas, discutir avances científicos y promover la integración entre profesionales

de la salud, contribuyendo a la mejora continua de la atención pediátrica en la región.

Anexo E.

Participación Jornadas académicas: XIX Simposio Surcolombiano Medicina Tropical, Parasitología e Inmunodeficiencias, realizado el 4 de octubre de 2024



**LA SUSCRITA COORDINADORA DE LA ESPECIALIZACIÓN EN
PEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EN LA SALUD DE LA
UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA DE NEIVA**

HACE CONSTAR

Que, el Dr. JOHNATAN LOZANO CULMA con cedula 1109843412, residente de la Especialización en Pediatría de la Facultad de Ciencias en la Salud de la Universidad Surcolombiana, participo en la realización del poster:

- PAPEL DE LAS PLAQUETAS EN DENGUE: COMPARTIMIENTO VIRAL E INMUNE, en el XIX Simposio Surcolombiano Medicina Tropical, Parasitología e Inmunodeficiencias, realizado el 4 de octubre de 2024, en el Centro de Convenciones José Eustasio Rivera

El presente certificado se expide a solicitud del interesado.

Dado en Neiva a los ocho (8) días del mes de octubre de 2024.

SANDRA DEL PILAR PÉREZ LOPEZ
Coordinadora Postgrado de Pediatría
Universidad Surcolombiana.

cación

La participación en el XIX Simposio Surcolombiano de Medicina Tropical, Parasitología e Inmunodeficiencias, realizado el 4 de octubre de 2024, constituyó un escenario académico de actualización en enfermedades infecciosas y condiciones inmunológicas de relevancia regional y nacional. El simposio favoreció la discusión de avances diagnósticos, terapéuticos y de investigación, así como el fortalecimiento del enfoque integral para la atención y el control de estas patologías.

Anexo F.

Participación PanDengue Medellín 2025 en modalidad de Póster

NS1 and IgG-NS1 associated to platelets modulate cell activation and clinical severity in children with dengue

Sebastián Castro-Trujillo¹, Johnatan Lozano^{2,3}, Doris Salgado², Andrés Felipe Romero^{2,3}, Darling Carvajal^{2,3}, Carlos F. Narváez^{1,2}

¹ División de Inmunología, Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva 4001, Huila, Colombia. ² Área de Pediatría, Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila, Colombia. ³ Servicio de Pediatría, Hospital Universitario de Neiva, Neiva, Huila, Colombia.

Background

Platelets play an immune role in dengue virus (DENV) infection, potentially influencing disease progression. Platelets interact with DENV, and the non-structural protein 1 (NS1) activates them, releasing inflammatory mediators that increase endothelial permeability in vitro. Furthermore, platelet-associated DENV-specific IgM and IgG are linked to severe disease, but the role of NS1-specific immunoglobulins and immune complexes remains unknown.

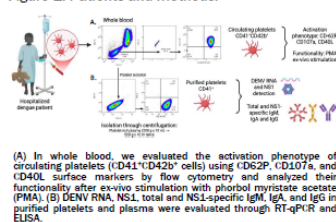
Study aim

We evaluate the relationship between platelet activation phenotype with circulating and platelet-associated DENV RNA, NS1, and NS1-specific immunoglobulins during pediatric natural DENV infection and its impact on disease severity.

Methods

We included 67 hospitalized children with dengue with warning signs (DWS, n=27) and severe dengue (SD, n=40), along with a subset evaluated in the convalescence. The methods applied are shown in Figure 1.

Figure 1. Patients and methods.



Results

Table 1. Clinical and laboratory features of children with dengue.

	Dengue with warning signs n=27	Severe dengue n=40	P
Age (years), median (range)	7.5 (3.8-12)	9 (3-14)	0.88
Male/Female (%)	50/50	46/54	0.89
Days after fever onset, median (range)	6 (3-8)	6 (3-10)	0.73
Laboratory, median (range)			
Platelets (cells/mm ³)	115,500 (33,000-308,000)	45,500 (18,000-174,000)	<0.001
GOT (U/L)	92 (17-248)	209 (35-1485)	0.006
GPT (U/L)	50 (10-8405)	87 (47-2496)	0.029

GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, pyruvic transaminase, continuous and categorical variables were analyzed using the Mann-Whitney test and Fisher's exact test, respectively.

Figure 2. Platelets exhibited an activated and exhausted phenotype during DENV infection.

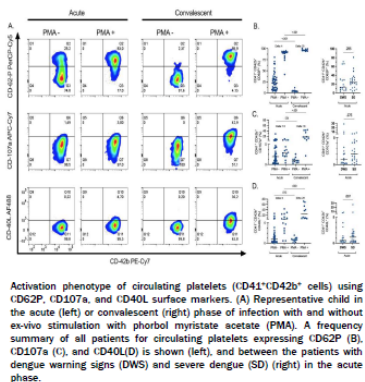
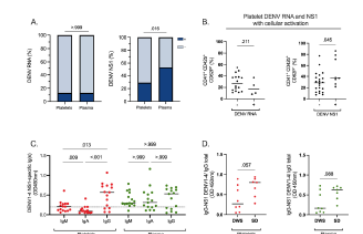


Figure 3. Circulating and platelet-associated DENV RNA, NS1 and NS1-specific immunoglobulins.



(A) Detection rate of DENV RNA and NS1 in purified platelets and plasma. Fisher's exact test is shown. (B) Frequency of circulating platelets (CD41⁺CD42b⁺ cells) expressing CD62P surface marker with the presence or absence of DENV RNA (left) or NS1 (right) in paired purified platelets. Mann-Whitney test is shown. (C) Relative levels of DENV-1 NS1-specific IgM, IgA, and IgG in purified platelets and plasma. Dunn's post-test is shown. (D) The ratio of IgG-NS1 DENV-1 over total IgG relative levels in patients with dengue with warning signs and severe dengue in purified platelets (right) and plasma (left). Mann-Whitney test is shown.

Main Findings

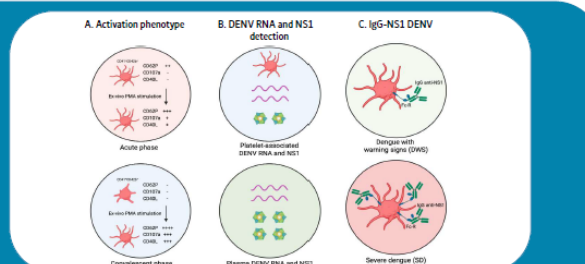
Children with dengue displayed higher CD62P expression in platelets compared to those in the convalescent phase, although exhibited an exhausted phenotype after ex-vivo stimulation.

Platelets interact directly with DENV and NS1, and platelet-associated NS1 levels influenced the expression of CD62P.

We found higher levels of platelet-associated NS1-IgG/IgA total in children with SD compared to those with DWS.

Platelets exhibited an exhausted phenotype and serve as viral carriers and immunological compartments, possibly influencing disease progression.

Grant to CEN-23660



La participación en PanDengue Medellín 2025 en modalidad de póster permitió la

socialización de resultados y experiencias académicas en el campo del dengue, promoviendo el

intercambio científico con investigadores y profesionales de la salud a nivel nacional e internacional. Este espacio contribuyó a la discusión de hallazgos relevantes, al fortalecimiento de redes de colaboración y a la actualización en aspectos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio relacionados con la enfermedad.