

Signos de alarma en el dengue: su asociación a la infección secuencial

Warning signs in dengue: their association with sequential infection

Ana Beatriz Pérez Díaz^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-0468-0213>

Raiza Martínez Casanueva² <https://orcid.org/0000-0001-9058-2697>

Gissel García Menéndez³ <https://orcid.org/0000-0002-9851-2041>

Eglis Aguirre Pérez¹ <https://orcid.org/0000-0003-1834-9983>

Beatriz Sierra Vázquez¹ <https://orcid.org/0000-0002-0164-3353>

Mery Leydi Torres Lahera² <https://orcid.org/0000-0003-1683-247X>

Daynelis Pardo Martínez⁴ <https://orcid.org/0000-0002-6239-8574>

Didye Ruiz Amores¹ <https://orcid.org/0000-0003-4392-3326>

Rosa Ramírez Bartutis¹ <https://orcid.org/0000-0001-6634-5341>

María Guadalupe Guzmán Tirado¹ <https://orcid.org/0000-0003-3927-0844>

¹Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. La Habana, Cuba.

²Hospital Clínico Quirúrgico “Salvador Allende”. La Habana, Cuba.

³Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. La Habana, Cuba.

⁴Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. La Habana, Cuba.

* Autor para la correspondencia: anab@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El virus del dengue es hoy la enfermedad viral de mayor importancia transmitida por artrópodos del género *Aedes*, fundamentalmente del *Aedes aegypti*. Esta última, es la especie que más afecta al hombre en términos de morbilidad y mortalidad. Anualmente se reportan más de 390 millones de infecciones, de las cuales más de 96 millones desarrollan el cuadro clínico, lo que denota la alta incidencia de la enfermedad causada por este vector.

Objetivos: Identificar la frecuencia de aparición y cuáles son los principales signos de alarma en pacientes cubanos por dengue, así como evaluar la posible asociación de estos con los conteos relativos de linfocitos T CD4+ que expresan la molécula CD25.

Métodos: Se realizó un estudio de los signos de alarma en pacientes adultos con diagnóstico confirmado de infección por dengue. Se exploró la asociación de estos signos con la clasificación de la infección y el comportamiento de los conteos relativos de la población de células sanguíneas que expresa los marcadores CD4 y CD25 por citometría de flujo.

Resultados: Alrededor del 50 % de los pacientes presentaron signos de alarma durante la infección por dengue. Entre los más frecuentes se detectaron la trombocitopenia (53 %) y el dolor abdominal (27 %), los cuales se observaron asociados a la infección secundaria ($p=0,04$). La frecuencia de células T CD4+CD25+ predominó en pacientes con signos de alarma, aunque no fue estadísticamente significativo.

Conclusiones: Los signos de alarma predominantes en la infección secundaria por dengue, así como la evolución de la enfermedad a cuadros graves pudieran estar relacionados con una pérdida de la regulación ejercida a través de las células T.

Palabras clave: dengue; signos de alarma; respuesta inmune; células T.

ABSTRACT

Introduction: Dengue virus is currently the most important viral disease transmitted by arthropods of the genus *Aedes*, mainly *Aedes aegypti*. The latter is the species that most affects humans in terms of morbidity and mortality. More than 390 million infections are reported every year, of which more than 96 million develop clinical symptoms, indicating the high incidence of the disease caused by this vector.

Objective: To identify the frequency of appearance and the main warning signs in Cuban patients with dengue, and the possible association of these with the relative counts of CD4+ T lymphocytes expressing the CD25 molecule.

Methods: A study was carried out on the warning signs in adult patients with a confirmed diagnosis of dengue infection. The association of these signs was explored with respect to the classification of the infection and the behavior of the relative counts of the blood cell population that expressed CD4 and CD25 markers by flow cytometry.

Results: About 50% of patients presented warning signs during dengue infection. Among the most frequently reported are thrombocytopenia (53%) and abdominal pain (27 %), observed in association with secondary infection ($P=0.04$). The frequency of CD4+ and CD25+ T cells predominated in patients with warning signs, although it was not statistically significant.

Conclusions: The warning signs predominating in secondary dengue infection, as well as the disease evolution to severe clinical stages, could be related to a loss of regulation exerted through T cells.

Keywords: dengue; warning signs; immune response; T cells.

Recibido: 03/09/2021

Aprobado: 02/12/2021

Introducción

El virus del dengue (VD) es hoy la enfermedad viral de mayor importancia transmitida por artrópodos del género *Aedes*, fundamentalmente del *Aedes aegypti*. Esta última, es la especie que más afecta al hombre en términos de morbilidad y mortalidad. Las zonas tropicales y subtropicales del planeta son las regiones más afectadas por las epidemias del VD. Anualmente se reportan más de 390 millones de infecciones, de las cuales más de 96 millones desarrollan el cuadro clínico, lo que denota la alta incidencia de la enfermedad causada por este virus.⁽¹⁾

La infección posee un espectro que varía desde formas asintomáticas, pasando por formas clínicas leves hasta las formas más graves de la enfermedad, caracterizadas por un aumento de la permeabilidad vascular, alteraciones en el número y función de los leucocitos, aumento del hematocrito y trombocitopenia, hasta llegar a la muerte en algunos casos.⁽²⁾

En 2009 la OMS publicó la nueva clasificación de la infección por dengue.⁽³⁾ Esta clasificación tiene en cuenta la presencia de signos predictivos de las formas graves, a los cuales se les denomina signos de alarma.⁽⁴⁾ Según esta clasificación, la enfermedad se clasifica en caso sospechoso de dengue, dengue con signos de alarma y caso grave. Dentro de los signos de alarma está descrito el aumento del hematocrito con disminución de las plaquetas, el dolor abdominal y los vómitos, la astenia y el aumento de las transaminasas. Su identificación permite iniciar de forma precoz la reposición de líquidos por vía intravenosa para prevenir el *shock*, con la consecuente disminución de la mortalidad.⁽⁵⁾

La infección secuencial por dengue con serotipos distintos es considerada el factor de riesgo más importante para el desarrollo de las formas graves de la enfermedad.⁽⁶⁾ Durante la infección secundaria heterotípica por los virus del dengue se ha demostrado que el sistema inmune responde en algunos individuos de forma exagerada y anómala. Dicha respuesta inmune conduce a la activación precoz de células de memoria con reactividad cruzada que no son capaces de controlar eficazmente la infección y dan lugar a la producción de diversas citoquinas proinflamatorias. Este tipo de citoquinas han sido implicadas en la patogenia de la enfermedad.⁽⁷⁾

Kurane y otros (1991)⁽⁸⁾ fundamentaron tempranamente que la activación de células T en la sangre de los pacientes graves era mayor que en pacientes de cuadros clínicos leves, basándose en el hallazgo de mayores niveles solubles de moléculas CD25, CD4 y CD8 asociados a la mayor severidad.

Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar la frecuencia de aparición y cuáles son los principales signos de alarma en pacientes cubanos por dengue, así como evaluar la posible asociación de estos con los conteos relativos de linfocitos T CD4+ que expresan la molécula CD25.

Métodos

Se realizó un estudio de tipo descriptivo correlacional en pacientes atendidos en el Hospital Clínico Quirúrgico “Salvador Allende”, en el periodo de noviembre de 2013 hasta marzo de 2014. Se incluyeron individuos mayores de 18 años de ambos sexos ingresados durante los cuatro primeros días del inicio de la fiebre y con diagnóstico presuntivo de infección por dengue.

Los pacientes se clasificaron teniendo en cuenta los criterios para el diagnóstico clínico, según la clasificación revisada de dengue de la OMS (2009), sin signos de alarma (fiebre y cefalea, mialgias y/o artralgias, erupción cutánea, y leucopenia) o dengue con signos de alarma (dolor abdominal intenso o mantenido, vómitos persistentes, hipotermia, a veces con lipotimia asociada, decaimiento o postración excesiva, sangrado de mucosas, derrames serosos, letargia, somnolencia, irritabilidad, inquietud o agitación, hepatomegalia mayor de 2 cm, aumento del hematocrito o rápida disminución de la cifra de plaquetas).

El diagnóstico se confirmó por ensayo inmunoenzimático (ELISA) mediante la detección de IgM específica antidengue en el suero de los pacientes a partir del 6to día de inicio de los síntomas.⁽⁹⁾ Los casos se clasificaron de acuerdo al título de anticuerpos séricos detectados por un ELISA de inhibición, tomando como criterio de infección secundaria un título de IgG antidengue ≥ 1280 .⁽¹⁰⁾

Previo consentimiento informado, se les extrajo a los pacientes sangre con anticoagulante (*Ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) durante los días del 1ro al 4to. del cuadro clínico febril. Las muestras de sangre se procesaron para aislamiento de células mononucleares por el método de separación por gradiente de densidad.⁽¹¹⁾ Las células mononucleares se conservaron en medio de congelación (dimetilsulfóxido 10 % en suero fetal ovino) y se almacenaron en congelación a -80°C hasta su uso.

Conteo relativo de la subpoblación de células T sanguíneas

Las células mononucleares de sangre periférica aisladas se descongelaron en medio RPMI 1640 y se lavaron dos veces por centrifugación a 400 xg, 10 min a temperatura ambiente. Luego se distribuyeron en tubos de 12x75 (Falcon, USA) para ser marcadas con los anticuerpos monoclonales Anti-CD4 y Anti-CD25 (MiltenyiBiotec, Alemania) conjugados con los fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) y alofocianina (APC). Los anticuerpos se añadieron a una dilución de 1/10 y después de una incubación de 30 min a temperatura ambiente se realizaron dos lavados con una solución compuesta por buffer fosfato salino (PBS), 0,5 % de suero fetal bovino (SFB), y azida sódica 0,1 %.

Finalmente, se resuspendió el botón celular en 400 μL de solución de fijación (PBS, paraformaldehído libre de metanol 1 %) y se procedió a la adquisición y análisis en el citómetro de flujo (MACSquant, MiltenyiBiotec, Alemania). Para la adquisición y análisis de datos se empleó el programa MACSQuantify versión 2.5 (MiltenyiBiotec, SA, Alemania).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS Statistics versión 17.0. La comparación de proporciones entre pacientes con y sin signos de alarma según la clasificación de la infección se realizó por la prueba exacta de Fisher. La comparación de los conteos relativos de la subpoblación de células sanguíneas entre grupos de pacientes con y sin signos de alarma se realizó mediante la prueba no paramétrica de

Mann Whitney. Se consideraron como significativos valores de los estadígrafos mayores que 1 y $p < 0,05$.

Consideraciones éticas

El procedimiento de la investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), que contempla los principios enunciados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial para las investigaciones médicas en seres humanos.⁽¹²⁾ Fue recogido por escrito el consentimiento informado y voluntario de cada persona involucrada en el estudio.

Resultados

Caracterización clínica de los pacientes

En el presente estudio se involucró un total de 30 pacientes; 17 hombres y 13 mujeres, confirmados como enfermos en el transcurso de una infección por dengue. De estos, 11 tuvieron una infección primaria y 19 una infección secundaria.

Se detectó que la fase febril se extendió en el 94,3 % de los pacientes estudiados, desde el 1er. al 4to día. La mayoría de los signos de alarma descritos se presentaron entre las 48 h. y el 4to día. Particularmente, los sangramientos y el valor más bajo de plaquetas se reportaron a los 4 días en la mayoría de los pacientes que los presentaron. Se constató un predominio de la trombocitopenia, el dolor abdominal, los sangramientos de mucosas, la lipotimia y los vómitos persistentes en los pacientes estudiados (Fig. 1).

Signos de alarma

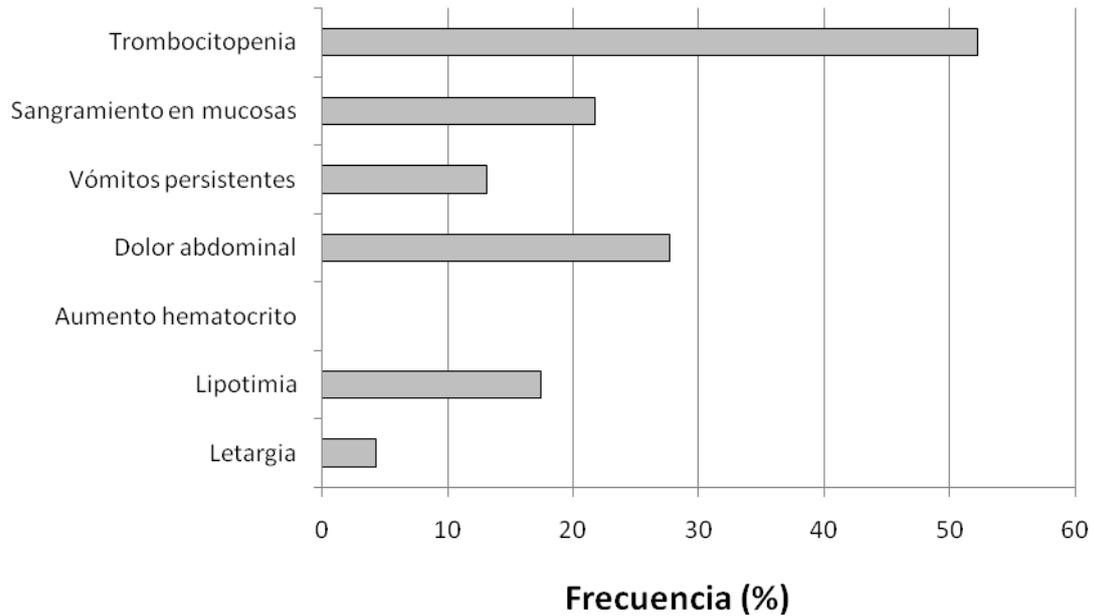


Fig. 1 - Frecuencia de los diferentes signos de alarma en la muestra de pacientes de dengue estudiados.

Al analizar la presencia de signos de alarma en los pacientes según el tipo de infección primaria o secundaria (Fig. 2) se puede observar que casi el 80 % (15/19) de los pacientes con signos de alarma presentaban infecciones secundarias, lo cual confirma una asociación de la tendencia a la severidad con la infección secuencial ($p=0,04$).

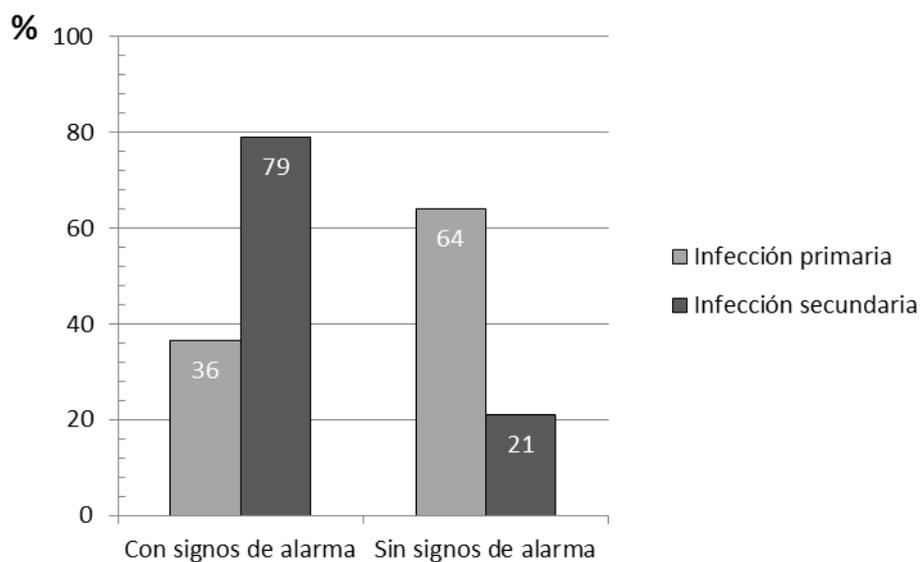


Fig. 2 - Distribución de pacientes con y sin signos de alarma según el tipo de infección primaria o secundaria. Conteo relativo de células T CD4+CD25+.

Se observó una mayor frecuencia de las poblaciones celulares T CD4+CD25+ en aquellos pacientes con infección secundaria, aunque esta diferencia no mostró significación estadística ($p=0,11$) (Fig. 3).

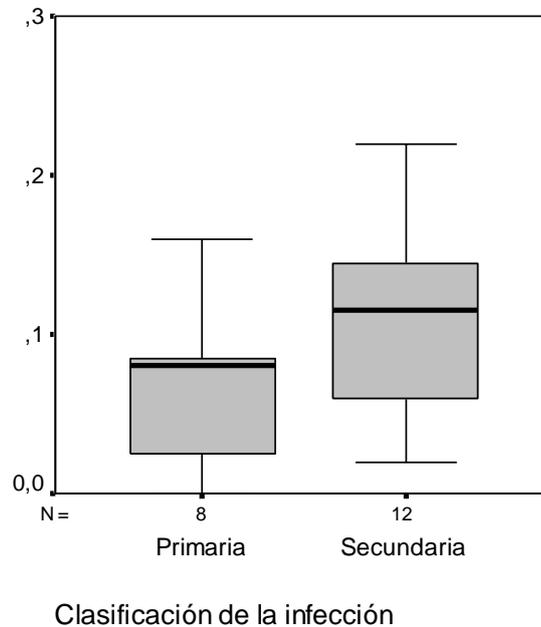


Fig. 3 - Frecuencia de células CD4+CD25+ en pacientes con infección primaria y secundaria.

Al comparar los conteos relativos de células T CD4+CD25+ se observaron mayores valores en pacientes con signos de alarma. Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,07$) (Fig. 4a). El análisis del comportamiento de los conteos de células CD4+CD25+, según la presencia de los signos de alarma independientes, al parecer muestra una mayor frecuencia de esa población celular en pacientes con signos que se vinculan a la extravasación de plasma en tubo digestivo (vómitos y dolor abdominal) (Fig. 4b y 4c), aunque no hubo significación estadística ($p=0,19$ y $p=0,07$, respectivamente). No se encontraron diferencias en las frecuencias de esta subpoblación celular sanguínea entre los pacientes que presentaron o no signos de alarma vinculados a manifestaciones hemorrágicas (trombocitopenia o sangramiento de mucosas) ($p=0,51$ y $p=0,62$, respectivamente).

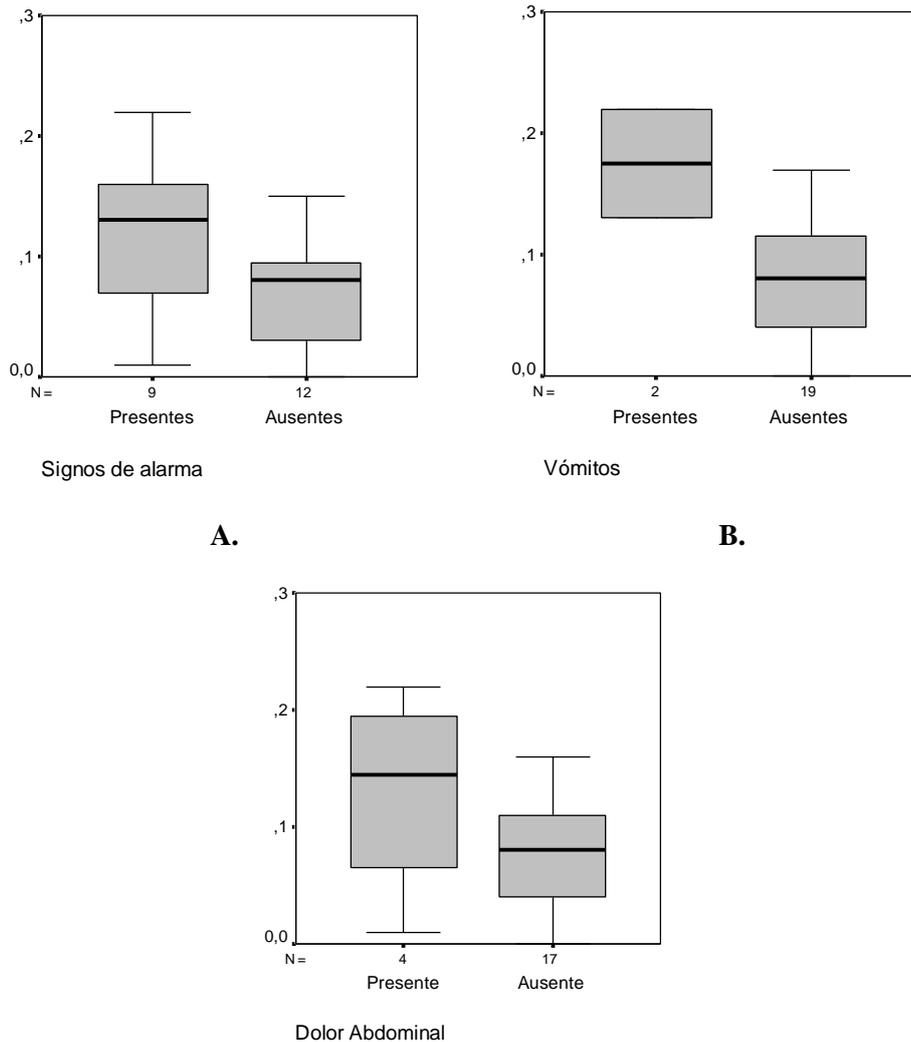


Fig. 4 - Frecuencia de las células T CD4+CD25+ en pacientes de dengue con y sin signos de alarma. **A.** De acuerdo a la presencia de signos de alarma. **B.** De acuerdo a la presencia o no de vómitos. **C.** De acuerdo a la presencia o no de dolor abdominal.

Discusión

Está demostrado que el sistema inmune influye en la patogenia de la enfermedad grave por dengue, y uno de los mecanismos más divulgados es a través del fenómeno denominado inmunoamplificación o amplificación mediada por anticuerpos (*antibody dependent enhancement, ADE*).⁽¹²⁾ Ocurre debido a que la infección por un serotipo brinda inmunidad homotípica de por vida. Esta se caracteriza por la presencia de anticuerpos de alta afinidad y capacidad neutralizante frente al serotipo infectante (anticuerpos homotípicos) pero que, si bien reconocen otros serotipos del complejo

dengue, no son capaces de neutralizarlos (anticuerpos subneutralizantes y no neutralizantes).

Cuando ocurre una segunda infección por serotipos heterólogos, se produce una alta concentración de inmunocomplejos del nuevo virus con inmunoglobulina G (IgG), los cuales infectan con mayor eficiencia las células mononucleares. Unido a esto, las células T, en particular las T de memoria de reactividad cruzada, juegan un papel esencial en la patogenia del dengue grave durante una infección secundaria. Esta hipótesis se basa en las observaciones de que las células de memoria activadas son más abundantes en pacientes con formas graves de la enfermedad.⁽¹³⁾

El reconocimiento de las células T a otros serotipos de VD diferentes al causante de la infección inicial y su reacción frente a estos (reactividad cruzada) hacen posible que, tras la infección secundaria heterotípica, se activan principalmente las poblaciones de células T de memoria, inducidas durante la infección primaria. Estas células activadas inducen y producen una serie de citoquinas inflamatorias que actúan a nivel del endotelio vascular, aumentando la permeabilidad del mismo y con ello la extravasación de plasma, fenómenos descritos en el desarrollo del dengue grave.⁽¹⁴⁾

La mayor frecuencia de signos de alarma, encontrada en pacientes con infecciones secundarias en el presente estudio, coincide con lo reportado en la literatura,⁽¹⁵⁾ y es concordante con el reconocimiento de la infección secundaria como el factor de riesgo individual más importante para el desarrollo de enfermedad grave por dengue.

Varios autores también describen a la trombocitopenia y el sangrado como los signos de alarma más frecuentes encontrados en pacientes hospitalizados por dengue.^(16,17)

Otros metaanálisis que incluyen 198 y 6643 estudios, respectivamente, reportaron asociación entre el dolor abdominal, los vómitos, la trombocitopenia, el sangramiento mucoso espontáneo o la letargia y el desarrollo de formas graves.^(18,19)

El dolor abdominal, las náuseas y los vómitos pudieran asociarse con el mayor grado de permeabilidad vascular y consiguiente extravasación plasmática a nivel de la mucosa gastrointestinal. Sin embargo, algunos autores la han vinculado también con distensión de la cápsula hepática, la estimulación de los plexos nerviosos por la distensión del espacio retroperitoneal a causa del edema o por perfusión mesentérica disminuida. También se ha relacionado con pequeñas hemorragias en la cavidad peritoneal⁽²⁰⁾ a la hepatitis, la pancreatitis, la colecistitis alitiásica y la enfermedad ácido péptica.⁽²¹⁾

Las causas de la trombocitopenia han tratado de ser explicadas a través de diferentes hipótesis. Entre ellas se propone que el virus pudiera infectar las células progenitoras en la médula ósea. También se ha invocado un aumento del consumo plaquetario en circulación periférica, así como la destrucción de las plaquetas por apoptosis, o por la acción de anticuerpos antiplaquetarios y activación del complemento.⁽²²⁾

En el presente trabajo exploramos la posible asociación entre la expresión en la superficie de los linfocitos T sanguíneos, de la molécula CD25 con el desarrollo de las formas graves de la enfermedad. Estas células, cruciales en la respuesta inmune antiviral, también participan en la patogenia de la enfermedad. Encontramos una mayor proporción de células T CD4+CD25+ en pacientes con infección secundaria y especialmente aquellos que tenían determinados signos de alarma. Sin embargo, la comparación entre grupos no arrojó diferencias estadísticamente significativas, lo cual puede deberse en primer lugar al reducido número de pacientes incluidos en el estudio.

Por otra parte, no todas las personas que desarrollan una infección secuencial transitan hacia una mayor gravedad, lo cual depende de varios factores que incluyen, entre otros, el serotipo de la primoinfección, los mecanismos reguladores de la respuesta inmune y la genética del hospedero, así como el tratamiento que oportunamente reciben y que puede modificar la evolución natural de la enfermedad.

La molécula CD25 es la cadena α de 55 kDa del receptor de interleucina 2 (IL-2), que se expresa en linfocitos activados y en estadios tempranos del desarrollo tímico de los linfocitos T. La IL-2 es un mediador soluble considerado un potente factor de crecimiento de los linfocitos T, clave en la respuesta inmune T dependiente, por lo que CD25 se había reconocido como un marcador de activación de los linfocitos T CD4+. Por esta razón, los niveles elevados de esta molécula soluble en sangre de los pacientes de dengue hemorrágico se asociaron a la mayor activación de células T durante la gravedad.⁽⁸⁾ Sin embargo, en los últimos tiempos, es reconocido su papel central en el desarrollo y mantenimiento de las células T reguladoras (Treg) y la entrada de estas a los ganglios linfáticos. Se ha asociado la función de esa molécula a la supresión de la respuesta inmune mediante la secreción de mediadores inhibitorios tales como la IL-10, o a través de contacto célula-célula.⁽²³⁾

A diferencia de nuestros resultados, *Tillu* y otros⁽²⁴⁾ encontraron conteos de plaquetas en correlación directa con las frecuencias de células Treg, así como una asociación entre mayores conteos de dichas células y una evolución benigna de la infección.

Si consideramos que la mayor activación inmune y una potente respuesta proinflamatoria, vinculada a la fisiopatología del dengue, debe inducir una mayor respuesta de células Treg que regulen la respuesta inmune, nuestros resultados son explicables a partir de una nueva hipótesis. Los signos de alarma relacionados con una mayor extravasación de plasma, estarían provocando mayores frecuencias sanguíneas de células TCD4+CD25+, y solo en aquellos pacientes en los que no ocurra una adecuada y oportuna regulación inmune, se observaría entonces un agravamiento progresivo del cuadro clínico con riesgo de muerte para el paciente. Sería necesario entonces el estudio de las células Treg en pacientes con y sin signos de alarma, y que desarrollan la enfermedad grave, para definir su asociación con los niveles de IL-10 y otros supresores de la respuesta proinflamatoria.

Los signos de alarma predominantes en la infección secundaria por dengue, así como la evolución de la enfermedad a cuadros graves, pudieran estar relacionados con una pérdida de la regulación ejercida a través de las células T.

Agradecimientos

Los autores del presente trabajo agradecen a los pacientes que participaron voluntariamente en la investigación y al personal de laboratorio y médico y paramédico del Hospital Clínico Quirúrgico “Salvador Allende” que contribuyó a la realización de la misma.

Referencias bibliográficas

1. Brady OJ, Hay SI. The Global Expansion of Dengue: How *Aedes aegypti* mosquitoes Enabled the first endemic arbovirus. *Annu Rev Entomol.* 2020;65:191-208. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-024918>
2. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.* 2002;2(1):33-42. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(01\)00171-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(01)00171-2)
3. WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Rother, Switzerland: Iris; 2009 [acceso: 22/1/2021]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>

4. Zhang H, Zhou Y, Peng H, Zhang X, Zhou FY, Liu ZH, *et al.* Predictive symptoms and signs of severe dengue disease for atients with dengue fever: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2014;(359308):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/359308>
5. Horstick O, Jaenisch T, Martinez E, Kroeger A, Chai See L, Farrar J, *et al.* Comparing the Usefulness of the 1997 and 2009 WHO Dengue Case Classification: A Systematic Literature Review. *Am Soc Trop Med Hyg.* 2021 [acceso: 22/1/2021];91(3):621-34. Disponible en: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/91/3/article-p621.xml>
6. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol.* 2013;158(7):1445-59. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1645-3>
7. Slon Campos JL, Mongkolsapaya J, Screaton GR. The immune response against flaviviruses. *Nat Immunol.* 2018;19(11):1189-98. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0210-3>
8. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, *et al.* Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1473-80. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI115457>
9. Vazquez S, Saenz E, Huelva G, Gonzalez A, Kouri G, Guzman M. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. *Rev Panam Sal Pub.* 1998 [acceso: 22/1/2021];3(3):174-8. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49891998000300005&lng=pt&nrm=iso
10. Vazquez S, Perez AB, Ruiz D, Rodriguez R, Pupo M, Calzada N, *et al.* Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol.* 2005;33(2):132-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.013>
11. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77-89.
12. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. WMA. 2017 [acceso: 22/1/2021].

Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>

13. Morrone SR, Lok SM. Structural perspectives of antibody-dependent enhancement of infection of dengue virus. *Curr Opin Virol.* 2019;36:1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.02.002>

14. John AL, Rathore APS. Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. *Nat Rev Immunol.* 2019;19:218-30. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0123-x>

15. Tian Y, Grifoni A, Sette A, Weiskopf D. Human T Cell response to dengue virus infection. *Front Immunol.* 2019;10:2125. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02125>

16. Narvaez F, Gutiérrez G, Pérez M, Elizondo D, Nuñez A, Balmaseda A, *et al.* Evaluation of the traditional and revised WHO classifications of dengue disease severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(11):e1397. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001397>

17. González D, Castro O, Rodríguez F, Portela D, Garcés M, Martínez A, *et al.* Descripción de la fiebre hemorrágica del dengue, serotipo 3, Ciudad de La Habana, 2001-2002. *Rev Cubana Med Trop.* 2008 [acceso: 22/1/2021];60(1):48-54. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000100007&lng=es

18. Lugo S, Morilla L, Bejarano O, Basualdo W, Pavlicich V. Dengue con signos de alarma. ¿Podemos predecir evolución a grave desde la emergencia? *Pediatr (Asunción).* 2015 [acceso: 22/1/2021];40(3):209-16. Disponible en: <https://www.revistaspp.org/index.php/pediatria/article/view/108>

19. Huy NT, Van Giang T, Thuy DH, Kikuchi M, Hien TT, Zamora J, *et al.* Factors associated with dengue shock syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(9):e2412. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002412>

20. Sangkaew S, Ming D, Boonyasiri A, Kalayanaroj S, Yacoub S, Dorigatti I, *et al.* Risk predictors of progression to severe disease during the febrile phase of dengue: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(7):1014-26. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30601-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30601-0)

21. Durán A, Ochoa E, Alcocer S, Gómez M, Millano M, Martínez O, *et al.* Frequency of gastrointestinal signs and symptoms of dengue. Analysis of a cohort of 1484 patients. *Invest Clin.* 2013;54(3):299-310.
22. De La Medina A, Trochec JM, Medina MF, Valdovinos MM, Cerón T, Zamudio C, *et al.* Abdominal and gastrointestinal symptoms of Dengue fever. Analysis of a cohort of 8559 patients. *Gastroenterol Hepatol.* 2011;34(4):243-247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2011.01.012>
23. Azeredo E, Monteiro RQ, Pinto LM. Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between virus and the imbalance between coagulation and fibrinolysis and inflammatory mediators. *Med Inflamm.* 2015;2015:313842. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/313842>
24. Brusko TM, Wasserfall CH, Hulme MA, Cabrera R, Schatz D, Atkinson MA. Influence of membrane CD25 stability on T lymphocyte activity: Implications for immunoregulation. *PLoS ONE.* 2009;4(11):e7980. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007980>
25. Tillu H, Tripathy AS, Reshmi PV, Cecilia D. Altered profile of regulatory T cells and associated cytokines in mild and moderate dengue. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(3):453-61. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2561-0>

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Contribución de los autores

Conceptualización: Ana Beatriz Pérez Díaz.

Curación de datos: Beatriz Sierra Vázquez, Raiza Martínez Casanueva, Rosa Ramírez Bartutis.

Adquisición de fondos: María Guadalupe Guzmán Tirado.

Investigación: Ana Beatriz Pérez Díaz, Raiza Martínez Casanueva, Gissel García Menéndez, Didye Ruiz Amores, Mery Leydi Torres Lahera.

Metodología: Ana Beatriz Pérez Díaz, Eglis Aguirre Pérez, Gissel García Menéndez.

Administración del proyecto: Ana Beatriz Pérez Díaz, Raiza Martínez Casanueva, Rosa Ramírez Bartutis, María Guadalupe Guzmán Tirado.

Supervisión: Beatriz Sierra Vázquez, María Guadalupe Guzmán Tirado.

Validación: Beatriz Sierra Vázquez.

Redacción del borrador original: Ana Beatriz Pérez Díaz, Gissel García Menéndez.

Redacción, revisión y edición: Ana Beatriz Pérez Díaz, Gissel García Menéndez, Beatriz Sierra Vázquez, María Guadalupe Guzmán Tirado.