

PRESENTACIÓN DE CASO

DetECCIÓN DE ANTÍGENOS DEL VIRUS DEL DENGUE EN TEJIDOS POST MÓRTEM

Jorge Rivera¹, Marcela Neira², Edgar Parra², Jairo Méndez³, Ladys Sarmiento¹, María Leonor Caldas¹

¹ Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

² Grupo de Patología, Dirección Red en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Virología, Dirección Red en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

El panorama epidemiológico del dengue ha empeorado durante la última década. Las dificultades para prevenir su transmisión, así como la ausencia de una vacuna o tratamiento específico, lo convierten en un riesgo que desafía las medidas de salud pública y desborda la capacidad de los centros de salud y los sistemas de investigación a muchos niveles. Actualmente, la mayoría de los estudios sobre la patogenia de la infección centran su atención en la respuesta inmunitaria de las células T casi exclusivamente en infecciones secundarias y están dirigidos a identificar los mecanismos implicados en el desarrollo de la permeabilidad vascular y de los eventos hemorrágicos que lo acompañan.

En este reporte se describe el caso de una menor de 45 días de edad con signos clínicos de dengue grave, cuyo diagnóstico se confirmó por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en muestras de tejido post mórtem y por herramientas de apoyo diagnóstico de inmunohistoquímica, las cuales detectaron antígenos virales en todos los órganos obtenidos en la necropsia. Este caso subraya la importancia del estudio de las infecciones primarias asociadas a dengue grave, particularmente en niños, en quienes es más probable el desarrollo de la forma grave de la enfermedad sin una infección previa, y, además, pone de relieve la importancia de un diagnóstico que no se limite a las muestras de tejido hepático en el estudio de la patogenia de la infección viral.

Palabras clave: dengue, antígenos, inmunohistoquímica.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2169>

Detection of dengue virus antigen in post-mortem tissues

The epidemiological situation of dengue has worsened over the last decade. The difficulties in preventing its transmission and the absence of a vaccine or specific treatment have made dengue a serious risk to public health, health centers and research systems at different levels. Currently, most studies on the pathogenesis of dengue infection focus on the T-cell immune response almost exclusively in secondary infections and are aimed at identifying the mechanisms involved in the development of vascular permeability and bleeding events that accompany the infection.

This report describes the case of a baby girl less than 45 days of age with clinical signs of severe dengue, whose diagnosis was confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction in post-mortem tissue samples and by the ancillary diagnostic use of immunohistochemistry, which detected viral antigens in all organs obtained at autopsy.

This case highlights the importance of studying primary infections associated with severe dengue, particularly in children, who are more likely to develop the severe form of the disease without previous infection, and it further stresses the importance of a diagnosis that should not be based solely on the examination of liver tissue samples when studying the pathogenesis of the viral infection.

Key words: Dengue, antigens, immunohistochemistry.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2169>

Contribución de los autores:

Jorge Rivera: selección y análisis del caso y escritura del manuscrito

Marcela Neira y Jorge Rivera: procesamiento de muestras para el estudio inmunohistoquímico

Edgar Parra: diagnóstico histopatológico mediante microscopía de luz convencional e inmunohistoquímica

Jairo Méndez: procesamiento de muestras mediante RT-PCR

Jairo Méndez, Ladys Sarmiento y María Leonor Caldas: revisión y edición del manuscrito

El dengue es la infección por arbovirus más importante en regiones tropicales y subtropicales del mundo, y su incidencia ha aumentado considerablemente en las últimas décadas (1). La Organización Mundial de la Salud calcula que cada año se presentan entre 50 y 100 millones de casos en el mundo y estima que alrededor de 2.500 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (2). Una de las poblaciones más afectadas por esta enfermedad en los países asiáticos y latinoamericanos es la infantil, con tasas significativas de morbilidad y mortalidad (3). En el 2010, Colombia afrontó la mayor epidemia de dengue registrada en las últimas décadas, con un aumento en los porcentajes de letalidad, pues esta fue de 2,28 % en 157.000 casos de infección reportados (4).

La enfermedad es producida por un virus que pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* y presenta cuatro serotipos antigénicamente distintos (DENV 1 a 4) (1). Todos los serotipos son capaces de producir enfermedad que, en la mayoría de los casos, es asintomática, o se puede desarrollar una enfermedad febril (fiebre del dengue) y, en menor proporción, una infección letal caracterizada por manifestaciones hemorrágicas, aumento de la permeabilidad vascular, compromiso de la función hepática, dificultad respiratoria y falla orgánica múltiple (dengue grave) (2,5-7).

Los tipos celulares que pueden ser infectados por el virus, así como las manifestaciones de la enfermedad, son diversos. Entre los tipos celulares se cuentan las células mononucleares de sangre periférica, las células del tejido esplénico (como los macrófagos), las células linfoides binucleadas y las células de la pulpa blanca como los inmunoblastos y los centroblastos en centros germinales (8-10).

Actualmente, el diagnóstico de la infección es presuntivo y puede confirmarse mediante aislamiento viral, serología por la detección de IgM en sueros de la fase aguda o subaguda de la enfermedad (11), hibridación *in situ* (8), reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (*Reverse Transcription Polymerase Chain*

Reaction, RT-PCR) (12) y mediante métodos de inmunohistoquímica. Sin embargo, en muchos de los casos fatales, el diagnóstico no se hace mediante serología por no disponerse de muestras de suero antes de la muerte, sin mencionar la dificultad del aislamiento viral. En estos casos, en los que el único material disponible es el tejido obtenido *post mortem* (13), el diagnóstico mediante técnicas de inmunohistoquímica constituye una útil herramienta de apoyo diagnóstico.

Reporte de caso

Se presenta el caso de una niña de 45 días de edad, procedente de Leticia, Amazonas, cuya madre la llevó a consulta por segunda vez y refirió un cuadro clínico de cuatro días de evolución con aumento del tamaño del abdomen y fiebre persistente con disminución de la misma en el último día.

En el examen clínico la paciente presentaba edemas, hematomas, distensión abdominal y hepatomegalia dolorosa con dificultad respiratoria. Se drenó con sonda nasogástrica el contenido hemático y los exámenes de hematología revelaron un recuento bajo de plaquetas (26.800 por mm³); otros parámetros se presentan en el cuadro 1. El cuadro clínico progresó rápidamente a acidosis respiratoria (hipoxemia) y, posteriormente, la niña presentó paro cardiorrespiratorio sin reacción a las maniobras de reanimación.

Se tomaron muestras de tejido hepático, esplénico, pulmonar, renal y muscular cardíaco durante la necropsia y se remitieron a los laboratorios de

Cuadro 1. Parámetros de los exámenes en sangre del paciente evaluado

Parámetro	Reporte	Valor de referencia*
Hematocrito (Ul/l)	29,8	33-55
Hemoglobina (g/dl)	10,2	10,7-17,1
Leucocitos (por mm ³)	11.900	5.000-19.500
Neutrófilos (%)	36	15-55
Linfocitos (%)	56	40-70
Eosinófilos (%)	8	0-8
Plaquetas (por mm ³)	26.800	150.000-450.000
Transaminasas		
Aminotransferasa de aspartato (Ul/l)	42	20-65
Aminotransferasa de alanina (Ul/l)	22	5-45
Creatina (mg/dl)	0,8	0,2-0,4 mg/dl
Nitrógeno ureico (mg/dl)	17	7-22 mg/dl

*Valores de referencia en niños recién nacidos y hasta los seis meses de edad, 2010. Barness E, Barness L. *Clinical Use of Pediatric Diagnostic Tests*. 2ª ed. Amsterdam: IOS Press; 2010, p. 1

Correspondencia:

María Leonor Caldas, Grupo de Morfología Celular, Dirección de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Avenida Calle 26 N° 51-20, Bogotá, D.C., Colombia
Teléfono: (571) 220 7700, extensión 1262; fax: (571) 220 0901
mcaldas@ins.gov.co

Recibido: 23/10/13; aceptado: 05/06/14

Patología y Virología del Instituto Nacional de Salud, para confirmación del diagnóstico asociado a infección grave por dengue.

Mediante el estudio histopatológico de rutina con coloraciones de hematoxilina y eosina de los tejidos obtenidos en la necropsia, se observó una lesión grave del hígado asociada con choque y necrosis hepatocelular en áreas mediozonales y pericentrales del lobulillo, así como hemorragia parenquimatosa y capsular e infiltrado inflamatorio mononuclear en áreas portales. El tejido pulmonar presentaba edema y hemorragia difusa reciente sin neumonía. El tejido esplénico mostraba congestión celular de la pulpa blanca asociada con hiperplasia linfoide reactiva, y los tejidos renal y muscular cardíaco parecían normales, sin procesos inflamatorios ni necrosis (figuras 1 y 2).

El examen molecular mediante RT-PCR en muestras de tejido hepático en solución salina, confirmó la infección con el serotipo 2 del virus del dengue (DENV2). En los ensayos de inmunohistoquímica, mediante las técnicas de peroxidasa y fosfatasa, se demostró que el antígeno viral se distribuía en todos los órganos obtenidos en la necropsia (figuras 3-5). En el cuadro 2 se presenta la distribución del antígeno en diferentes tipos celulares.

Discusión

Se presenta el caso de una niña de 45 días de edad que presentó signos clínicos de infección asociados con dengue grave por DENV2 según el diagnóstico molecular. El estudio histopatológico reveló un compromiso importante en hígado y pulmón, con menor grado en el tejido esplénico, en

tanto que los tejidos muscular cardíaco y renal eran normales. Los antígenos virales se detectaron en todos los tejidos obtenidos en la necropsia (cuadro 2), lo cual demuestra una amplia distribución del antígeno. Este caso se suma a los escasos reportes de antígenos virales localizados en áreas vasculares y en tejido muscular cardíaco, y es en reportar antígenos en áreas intersticiales de la médula renal en muestras de tejido obtenidas post mórtem.

El incremento de los niveles de transaminasas en sangre y el desarrollo de hepatomegalia en el curso de la enfermedad del dengue, son características clínicas que indican disfunción hepática (18). Las alteraciones morfológicas comúnmente observadas en el tejido hepático en los casos fatales de la infección, son necrosis hepatocelular, esteatosis microvesicular, hiperplasia de células de Kupffer, formación de cuerpos de Councilman en hepatocitos e infiltrado celular en las áreas portales (14,15).

En el presente caso, a pesar de la presencia de alteraciones morfológicas en el hígado como las descritas, los marcadores de la función hepática eran relativamente normales, lo cual sugiere que el progreso y la persistencia de la infección podrían haber estado asociados con la infección de otros tejidos y no solo del hepático; además, la detección de antígenos virales exclusivamente en células sinusoidales –probablemente macrófagos–, puede ser el reflejo de una función fagocitaria de este tipo celular y no de una infección propia del hígado (19).

Por otra parte, la localización del antígeno en áreas vasculares de los tejidos esplénico y renal, podría apoyar la idea de que la actuación directa del virus

Cuadro 2. Detección de antígenos del virus del dengue (figuras 3-5)

Tejido	Inmuno-histoquímica	Detección del antígeno	Referencias relacionadas ¹
Hepático	++	Células localizadas principalmente en espacios sinusoidales sin evidencia de antígenos en hepatocitos	Jessie K, <i>et al.</i> , 2004 (9) Couvelard A, <i>et al.</i> , 1999 (14) Huerre M, <i>et al.</i> , 2001 (15) Neri M, <i>et al.</i> , 2012 (16)
Esplénico	+	Células del endotelio vascular asociadas a arteriolas de la pulpa blanca	Jessie K, <i>et al.</i> , 2004 (9)
Pulmonar	+	Células localizadas en el infiltrado del tabique alveolar	Jessie K, <i>et al.</i> , 2004 (9) Neri M, <i>et al.</i> , 2012 (16)
Muscular cardíaco	+	Fibras musculares	Salgado D, <i>et al.</i> , 2010 (17)
Renal	+++	Principalmente en células del intersticio de áreas medulares con menor marcación en áreas corticales Células del endotelio de arteriolas del glomérulo	Neri M, <i>et al.</i> , 2012 (16)

¹ Estudios en los cuales los antígenos fueron detectados en muestras de pacientes fallecidos por la infección viral

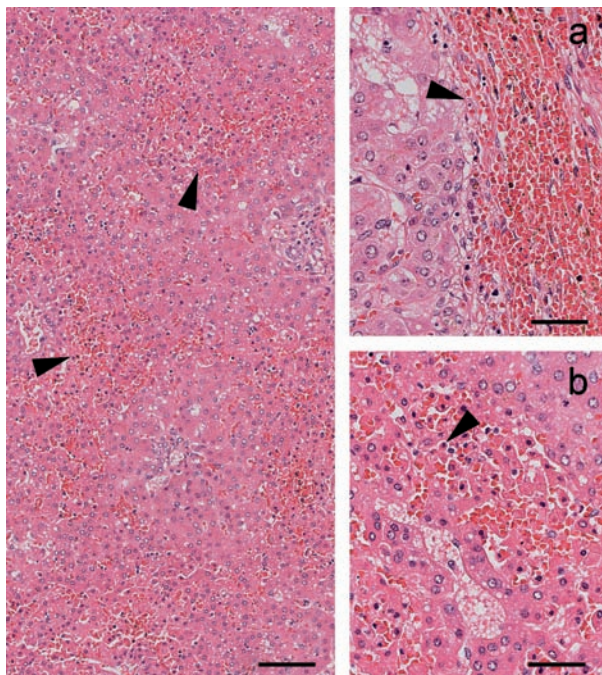


Figura 1. Alteraciones morfológicas observadas mediante el estudio histopatológico de rutina en tejido hepático. Necrosis hepatocelular mediozonal (punta de flecha). **a)** Hemorragia capsular (punta de flecha). **b)** Infiltrado inflamatorio mononuclear en áreas portales (punta de flecha). Hematoxilina y eosina. Barras: 100 µm; insertos a) y b): 50 µm

en el endotelio vascular causa el incremento de la permeabilidad, la cual es una característica clínica importante en los casos de dengue grave. Se sabe que el daño o la activación del endotelio vascular conllevan una secreción rápida de cantidades equimolares del factor von Willebrand y de un propéptido de este factor procedente de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales. Estos factores están implicados en la interacción entre la pared vascular y las plaquetas, de tal manera que son marcadores de la activación celular endotelial. Se ha observado que los pacientes con dengue grave presentan un incremento en los niveles del factor von Willebrand y su propéptido, y de otra proteína liberada por los cuerpos de Weibel-Palade, lo que sugiere una asociación entre los marcadores de la activación celular endotelial y el desarrollo de la trombocitopenia (20). Sin embargo, se produce daño en el endotelio si hay replicación viral en este tejido, lo cual no está completamente establecido y no se demostró en este reporte. Varios estudios *in vitro* han indicado que el virus puede replicarse en células endoteliales de cultivo celular (17,21,22), pero se desconoce si el virus presenta este comportamiento en condiciones *in vivo*. Solo en

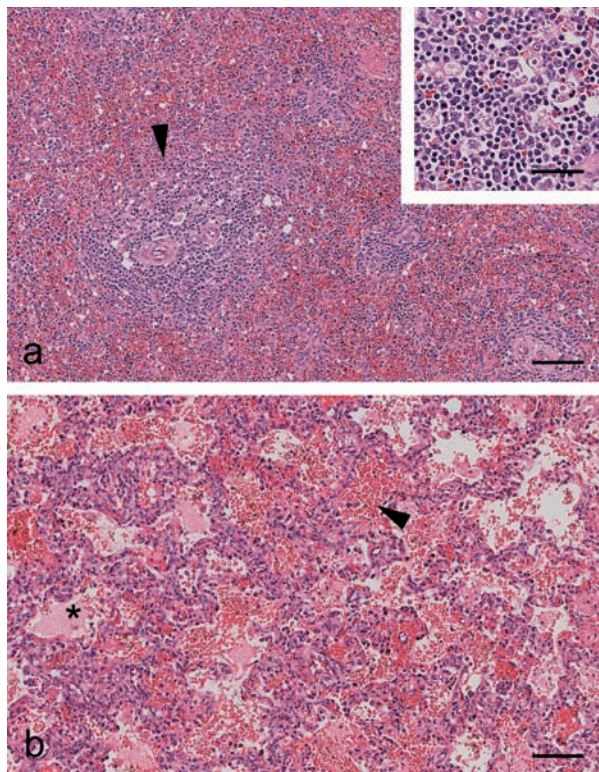


Figura 2. Alteraciones morfológicas observadas mediante el estudio histopatológico de rutina. **a)** Tejido esplénico, congestión celular de la pulpa blanca (punta de flecha), inserto: hiperplasia linfoide reactiva. **b)** Edema (*) y hemorragia alveolar (punta de flecha). Hematoxilina y eosina. Barras: 100 µm; inserto: 50 µm.

un estudio del 2004 en muestras de pacientes, se han reportado antígenos en áreas vasculares del tejido pulmonar (8).

Poco se ha informado sobre la detección de los antígenos del virus en las fibras musculares cardíacas que aquí se reporta (23), y, aunque no se cuenta con datos sobre los marcadores de la función cardíaca en este caso, su hallazgo en las fibras musculares podría sugerir que la depresión de la función cardíaca está asociada con la infección del tejido. La disfunción cardíaca en casos de dengue grave se ha reportado con anterioridad (24) y se ha demostrado que, en condiciones *in vitro*, las células musculares esqueléticas pueden ser afectadas por el virus del dengue (23), lo cual apoyaría la hipótesis de que la disfunción del músculo cardíaco en casos de dengue grave podría ser el resultado de la infección directa de las fibras musculares.

Este es el primer reporte de la detección de antígenos, principalmente en células intersticiales de la zona medular renal, en un caso de infección de dengue grave. Algunos estudios han informado

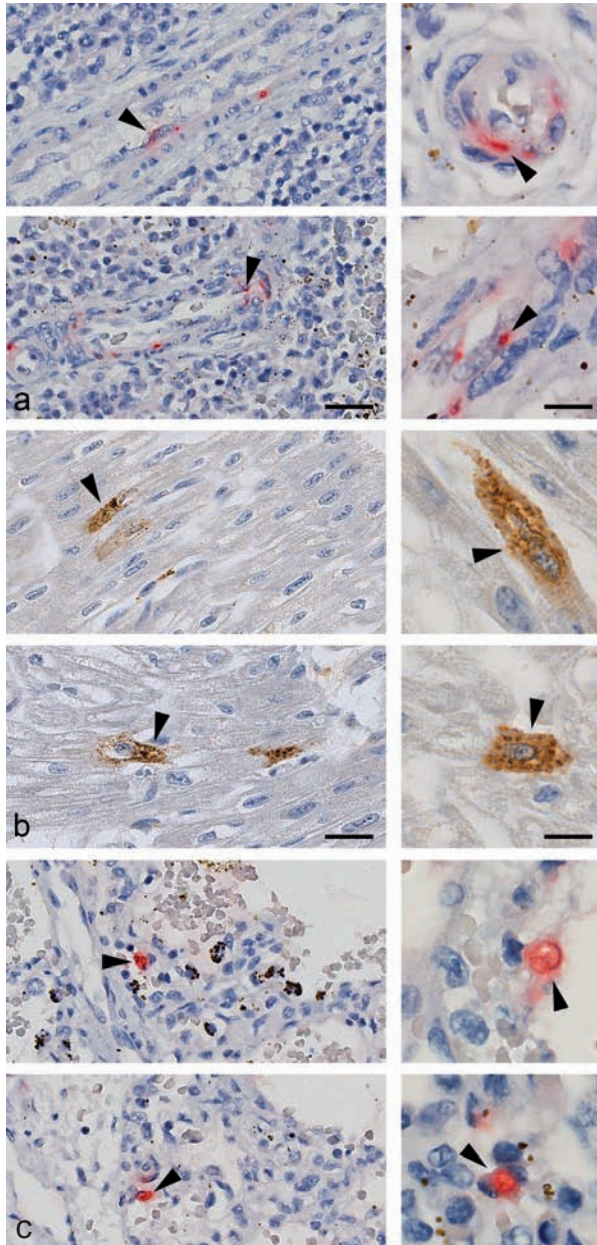


Figura 3. Distribución de antígenos del virus del dengue. **a)** Tejido esplénico, antígenos localizados en áreas vasculares (puntas de flecha). **b)** Tejido muscular cardíaco, antígenos localizados en fibras musculares (puntas de flecha). **c)** Tejido pulmonar, antígenos localizados en células del infiltrado del intersticio alveolar. Análisis de inmunohistoquímica para la detección de antígenos mediante la técnica de fosfatasa alcalina en el tejido esplénico y pulmonar, y mediante la técnica de peroxidasa en el tejido muscular cardíaco. Barras: 25 μ m; insertos: 10 μ m

fallas renales en infecciones por dengue grave, pero se sabe muy poco de esta condición (25). Se sabe que una de las características clínicas de los pacientes con dengue grave es la hipotensión como

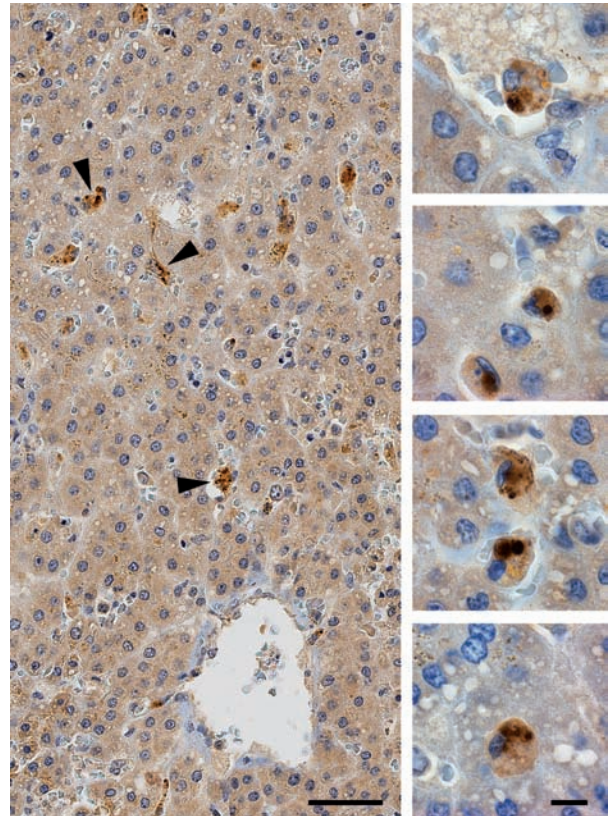


Figura 4. Distribución de antígenos del virus del dengue en tejido hepático. Inmunorreacción en células localizadas en espacios sinusoidales. Análisis de inmunohistoquímica mediante la técnica de peroxidasa. Barra: 50 μ m; insertos: 10 μ m

resultado de la trombocitopenia y de la pérdida de plasma (26,27), y que las células intersticiales de la médula renal están implicadas en la regulación de la presión sanguínea mediante la secreción de una hormona con actividad antihipertensiva (28); sin embargo, no se sabe si existe o no una relación entre la infección por el virus del dengue y la disfunción de la médula renal en la regulación de la presión sanguínea.

Se ha reportado que los antígenos virales pueden estar localizados en tejidos diferentes al hepático, tales como el pulmonar, el esplénico, el renal e, inclusive, el muscular cardíaco, como se presentó en este caso (16,29); esto demuestra que otros órganos pueden verse afectados por la infección del dengue y que deben considerarse en el diagnóstico que, hasta ahora, se hace principalmente en muestras de tejido hepático.

Actualmente, la mayoría de los estudios sobre la patogenia del dengue se centran principalmente en las infecciones secundarias y sus relaciones

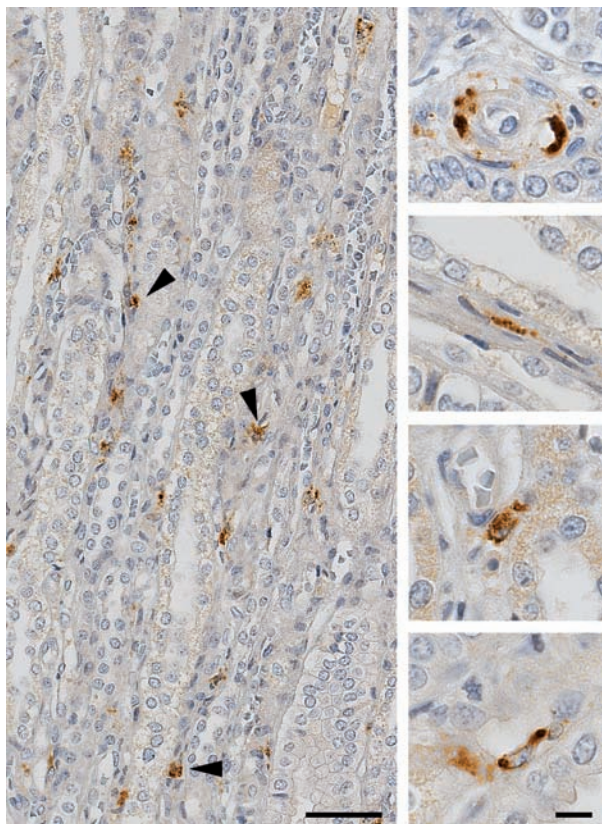


Figura 5. Distribución de antígenos del virus en tejido renal. Inmunorreacción en células localizadas principalmente en espacios intersticiales del área medular y en áreas vasculares. Análisis de inmunohistoquímica mediante la técnica de peroxidasa. Barra: 50 μ m; insertos: 10 μ m

con la respuesta inmunitaria de las células T, con los mecanismos implicados en el desarrollo de la permeabilidad vascular y con las manifestaciones hemorrágicas. Sin embargo, el presente caso recuerda la importancia del estudio de las infecciones primarias, particularmente en infantes, en quienes pueden desarrollarse eventos graves sin que haya infección previa.

Por último, los resultados en este reporte resaltan la importancia de usar herramientas de apoyo diagnóstico en el laboratorio, entre ellas, los métodos inmunohistoquímicos, que conjuntamente con el manejo y la selección adecuada de las muestras *post mortem*, servirían para obtener datos más confiables destinados al sistema de vigilancia en salud pública del dengue; además, señalan la importancia del diagnóstico presuntivo oportuno y eficaz para un mejor tratamiento del paciente en las instituciones prestadoras de servicios de salud, con el fin de evitar complicaciones irreversibles por la falta de atención de los signos clínicos en las primeras consultas.

Conflicto de intereses

Los autores de este estudio declaramos que no existe ningún conflicto de intereses.

Financiación

Los autores agradecen a las Direcciones de Investigación en Salud Pública y de Red en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, así como a Colciencias, Programa 5015-537-30843, contrato 360-2011, por la financiación de este trabajo.

Referencias

1. **World Health Organization.** Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 3rd edition. Geneva: WHO Press; 2009.
2. **World Health Organization.** Dengue and severe dengue - 2013. Fecha de consulta: 30 de mayo de 2013. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
3. **Whitehorn J, Simmons C.** The pathogenesis of dengue. *Vaccine.* 2011;29:7221-8. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059067>
4. **Bello S.** Comportamiento epidemiológico del dengue en Colombia año 2010. Informe de evento. Fecha de consulta: 1 de octubre de 2013. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Dengue%202010.pdf>.
5. **do Nascimento D, de Castro A, Froes Í, Bigaton G, de Oliveira É, Dal Fabbro M, et al.** Clinical and laboratory findings in patients with dengue associated with hepatopathy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44:674-77. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000061>
6. **Seneviratne S, Malavige G, de Silva H.** Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100:608-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.10.007>
7. **Ling L, Wilder-Smith A, Leo Y.** Fulminant hepatitis in dengue haemorrhagic fever. *J Clin Virol.* 2007;38:265-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2006.12.011>
8. **King A, Nisalak A, Kalayanrooj S, Myint K, Pattanapanyasat K, Nimmannitya S, et al.** B cells are the principal circulating mononuclear cells infected by dengue virus. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1999;30:718-28.
9. **Jessie K, Fong M, Devi S, Lam S, Wong K.** Localization of dengue virus in naturally infected human tissues by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *J Infect Dis.* 2004;189:1411-8. <http://dx.doi.org/10.1086/383043>
10. **Killen H, O'Sullivan M.** Detection of dengue virus by *in situ* hybridization. *J Virol Methods.* 1993;41:135-46. [http://dx.doi.org/10.1016/0166-0934\(93\)90121-7](http://dx.doi.org/10.1016/0166-0934(93)90121-7)
11. **Ospina M.** Dengue: diagnóstico por el Laboratorio. *Infectio.* 2004;8:225-30.
12. **McAvin J, Escamilla E, Blow J, Turell M, Quintana M, Bowles D.** Rapid identification of dengue virus by reverse transcription-polymerase chain reaction using field-deployable instrumentation. *Mil Med.* 2005;170:1053-9.

13. **Sarmiento L, Rodríguez G, Boshell J.** Diagnóstico inmunohistoquímico del dengue en cortes en parafina. *Biomédica*. 1995;15:10-5.
14. **Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet M, Vachon F, Hénin D, et al.** Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: Demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum Pathol*. 1999;30:1106-10.
15. **Huerre MR1, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al.** Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch*. 2001;438:107-15. <http://dx.doi.org/10.1007/s004280000329>
16. **Neri M, Othman S, Cantatore S, De Carlo D, Pomara C, Riezzo I, et al.** Sudden infant death in an 8-month-old baby with dengue virus infection: Searching for virus in *postmortem* tissues by immunohistochemistry and Western blotting. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31:878-80. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e31825c4a08>
17. **Dalrymple N, Mackow E.** Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Adv Virol*. 2012;840654. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/840654>
18. **Halstead SB.** Dengue. *Lancet*. 2007;370:1644-52. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61687-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61687-0)
19. **Limonta D, Falcón V, Torres G, Capó V, Menéndez I, Rosario D, et al.** Dengue virus identification by transmission electron microscopy and molecular methods in fatal dengue hemorrhagic fever. *Infection*. 2012;40:689-94. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-012-0260-7>
20. **Djamiatun K, van der Ven A, de Groot P, Faradz S, Hapsari D, Dolmans W, et al.** Severe dengue is associated with consumption of von Willebrand factor and its cleaving enzyme ADAMTS-13. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1628. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001628>
21. **Dewi B, Takasaki T, Kurane I.** *In vitro* assessment of human endothelial cell permeability: Effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J Virol Methods*. 2004;121:171-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.06.013>
22. **Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M.** Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol*. 1998;161:6338-46.
23. **Salgado D, Eltit J, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega M, et al.** Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29:238-42. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3181bc3c5b>
24. **Wali J, Biswas A, Chandra S, Malhotra A, Aggarwal P, Handa R, et al.** Cardiac involvement in dengue haemorrhagic fever. *Int J Cardiol*. 1998;64:31-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5273\(98\)00008-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-5273(98)00008-4)
25. **Aneja V, Kochar G, Bisht N.** Unusual manifestations of dengue fever. *Apollo Medicine*. 2010;7:69-76.
26. **Thomas L, Moravie V, Besnier F, Valentino R, Kaidomar S, Coquet L, et al.** Clinical presentation of dengue among patients admitted to the adult emergency department of a tertiary care hospital in Martinique: Implications for triage, management, and reporting. *Ann Emerg Med*. 2012;59:42-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.annemergmed.2011.08.010>
27. **Solórzano F, Maldonado S, Toscano D, Velazco D, García M, Mamani E, et al.** Clinical characteristics of patients admitted to hospital "César Garayar García", Iquitos, during the dengue epidemic, January-February 2011. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2011;28:78-82. <http://dx.doi.org/10.1590/S1726-46342011000100012>
28. **Muirhead E.** Renal vasodepressor mechanisms: The medullipin system. *J Hypertens Suppl*. 1993;11:S53-8.
29. **de Macedo F, Nicol A, Cooper L, Yearsley M, Pires A, Nuovo G.** Histologic, viral, and molecular correlates of dengue fever infection of the liver using highly sensitive immunohistochemistry. *Diagn Mol Pathol*. 2006;15:223-8. <http://dx.doi.org/10.1097/01.pdm.0000213462.60645.cd>