



## Revisión

# Revisión sistemática de los estudios observacionales sobre el papel del estrés oxidativo-nitrosativo en la patogénesis del dengue

A systematic review of observational studies on oxidative/nitrosative stress involvement in dengue pathogenesis

Raimundo Castro<sup>1,3</sup>, Hernando Samuel Pinzón<sup>2</sup>, Nelson Alvis-Guzman<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Universidad de San Buenaventura, Cartagena, Colombia.

<sup>2</sup> De los niños de la Fundación del Hospital Napoleón Franco Pareja, Cartagena, Colombia

<sup>3</sup> Universidad de Cartagena, Cartagena, Colombia.

Castro R, Pinzón HS, Alvis-Guzman N. A systematic review of observational studies on oxidative/nitrosative stress involvement in dengue pathogenesis. *Colomb Med.* 2015; 46(3): 135-43.

© 2015. Universidad del Valle. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acrediten.

### Historia:

Recibido: 15 enero 2015

Revisado: 09 junio 2015

Aceptado: 16 septiembre 2015

### Palabras clave:

Dengue; dengue grave; virus dengue; estrés oxidativo; marcadores biológicos; revisión sistemática.

### Keywords:

Dengue; severe dengue; dengue virus; oxidative stress; nitrosative stress; biological markers; systematic review

### Resumen

**Objetivo:** Sistematizar las evidencias observacionales sobre la relación entre el estrés oxidativo-nitrosativo y la patogénesis del dengue.

**Métodos:** Revisión sistemática de estudios observacionales en las bases de datos (PubMed, EMBASE, The COCHRANE library, ScienceDirect, Scopus, SciELO, LILACS via Virtual Health Library, Google Scholar) utilizando las siguientes palabras clave: dengue, dengue virus, severe dengue, oxidative stress, nitrosative stress, antioxidants, oxidants, free radicals, oxidized lipid products, lipid peroxides, nitric oxide y nitric oxide synthase. La selección inicial fue realizada a partir del título y resumen excluyéndose: cartas para editor, revisiones, estudios in vivo/in vitro y duplicados. A cada artículo seleccionado, se le revisó el diseño del estudio, objetivo, tamaño de la muestra, resultados principales y niveles plasmáticos de los marcadores de estrés oxidativo-nitrosativo.

**Resultados:** De 4,331 publicaciones encontradas, 16 estudios cumplieron con los criterios de inclusión. El 50% (8/16) de los estudios revisados fueron realizados en países de Sur América, Centro América y del Caribe. El diseño de casos y controles fue el más frecuente. El anterior sistema de clasificación de casos (OMS-1997) fue utilizado en todos los estudios incluidos en esta revisión.

**Conclusiones:** El estrés oxidativo-nitrosativo se encuentra presente en el curso de la infección por virus dengue, demostrado por los cambios en las concentraciones plasmáticas de óxido nítrico, antioxidantes y marcadores de lipoperoxidación y de oxidación de proteínas. Por último, parece existir una asociación entre la elevación de los niveles plasmáticos de los carbonilos proteicos y malondialdehído con la severidad del dengue.

### Abstract

**Objective:** Our objective was to systematically review the published observational research related to the role of oxidative-nitrosative stress in pathogenesis of dengue.

**Methods:** We searched electronic databases (PubMed, EMBASE, The COCHRANE library, ScienceDirect, Scopus, SciELO, LILACS via Virtual Health Library, Google Scholar) using the term: dengue, dengue virus, severe dengue, oxidative stress, nitrosative stress, antioxidants, oxidants, free radicals, oxidized lipid products, lipid peroxides, nitric oxide, and nitric oxide synthase. Articles were selected for review by title and abstract excluding letter, review, in vivo and in vitro studies, and duplicates studies. Selected articles were reviewed for study design, original purposes, sample size, main outcomes, methods, and oxidative-nitrosative stress markers values.

**Results:** In total, 4,331 non-duplicates articles were identified from electronic databases searches, of which 16 were eligible for full text searching. Data from the observational studies originate from Asian countries (50%; 8/16), South American countries (31.2%; 5/16), and Central America and the Caribbean countries (18.8%; 3/16). Case-control study was the type of design most common in researches reviewed. The 1997 World Health Organization (WHO) dengue case classification criteria were used in all studies included in this review.

**Conclusions:** Based on published data found in peer-reviewed literature, oxidative and nitrosative stress are demonstrated by changes in plasma levels of nitric oxide, antioxidants, lipid peroxidation and protein oxidation markers in patients with dengue infection. Additionally, elevated serum protein carbonyls and malondialdehyde levels appear to be associated with dengue disease severity.

### Autor de correspondencia:

De los niños de la Fundación del Hospital Napoleón Franco Pareja, Cartagena, Colombia.  
Phone: +57 314 5004087. Correo electrónico : raimundo\_castro\_orozco@hotmail.com

## Introduction

El dengue es una infección sistémica de etiología vírica, con gran impacto socioeconómico en diversos países tropicales y subtropicales del mundo. Estimaciones recientes proyectan 390 millones de infecciones por dengue por año (intervalo de credibilidad al 95% 284-528 millones), de los cuales 96 millones casos (intervalo de credibilidad al 95% 67-136 millones) cursan de manera sintomática con algún grado de severidad<sup>1</sup>.

El virus del dengue (DENV) es el agente etiológico de esta enfermedad tropical, miembro de la familia *Flaviviridae*, del cual se reconocen cuatro serotipos (DENV-1 al -4). Su genoma corresponde a un ribovirus de cadena de polaridad positiva, el cual codifica tres proteínas estructurales (de cápside, prM y de envoltura) y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5)<sup>2,3</sup>

De acuerdo con los reportes de la Organización Panamericana de la Salud-OPS, en 2013, se reportaron 2,386,836 de casos de dengue en el continente americano, de los cuales 37,898 (1.6%) correspondieron a dengue grave, con una letalidad reportada de 0.06%. Para el caso de Colombia, se reportaron 127,219 casos de dengue (55% de los casos reportados para la subregión andina), de los cuales 3,377 (81.1% de los casos reportados en la subregión andina) correspondieron a dengue grave<sup>4</sup>.

La severidad de esta enfermedad tropical puede variar de acuerdo con la edad, la etnia, factores genéticos, el estado inmune y comorbilidades presentes en el paciente. Igualmente, se reconoce la influencia de la co-circulación y de reinfecciones por diferentes serotipos DENV en la aparición de cuadros graves de dengue<sup>5-9</sup>. Con respecto a esto, se ha propuesto la participación del estrés oxidativo inducido por la infección DENV en la patogenia del dengue grave, explicada desde su capacidad para promover la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, y participando en conjunto en la inmunopatogénesis del dengue<sup>10</sup>.

Por definición, el estrés oxidativo se considera un desbalance entre las sustancias pro-oxidantes y las antioxidantes, en favor de las primeras<sup>11,12</sup>. Además, el estrés nitrosativo se define como una nitrosilación indiscriminada de biomoléculas<sup>13</sup>. En ausencia de una respuesta compensatoria apropiada por parte del sistema de defensa antioxidante, se puede dar la activación de varias vías de señalización intracelular, que puede conllevar a la muerte celular o la aparición de condiciones patofisiológicas<sup>13-16</sup>.

En coherencia con lo anterior, existen reportes relacionados con el incremento en: (i) las concentraciones plasmáticas de radical óxido nítrico-NO, de especies reactivas del oxígeno-ROS y del nitrógeno-RNS, (ii) en la relación GSSG/GSH, (iii) en la expresión génica de iNOS y en la fosforilación de STAT-1, durante la infección DENV *in vitro*<sup>17-26</sup>.

En un estudio reciente, Olgner *et al.*<sup>27</sup>, reportaron que la infección de células dendríticas derivadas de monocitos/Mo-DC por DENV-2 tiene la capacidad de estimular la respuesta de estrés oxidativo mediado por el factor de transcripción Nrf-2, la cascada de señalización activando la óxido nítrico sintasa inducible-iNOS y la producción de ROS. Igualmente, reportaron un descenso

significativo en los niveles de RNAm de la superóxido dismutasa mitocondrial/SOD-2, durante el tratamiento con un depurador de ROS. Además, establecieron la asociación entre la infección DENV-2 con la acumulación de ROS generados por NADPH oxidasas.

Estas líneas de evidencia sugieren que el estrés oxidativo-nitrosativo puede estar relacionado con la producción de proteínas asociadas con la patogénesis, con la susceptibilidad incrementada de infección DENV y con el desarrollo de hemorragias en el modelo ratón, con la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y con la replicación DENV, en varios cultivos celulares.

De acuerdo con el anterior escenario, se realizó la revisión sistemática de estudios observacionales cuyo objetivo estuviese relacionado con la evaluación del papel del estrés oxidativo-nitrosativo en la patogénesis del dengue. El entendimiento de la participación del estrés oxidativo-nitrosativo en el desenlace clínico de los pacientes con dengue podría tener potenciales implicaciones en el pronóstico y tratamiento de esta enfermedad.

## Materiales y Métodos

### Estrategia de búsqueda

El protocolo metodológico utilizado en este estudio, es coherente con los ítems propuestos en la declaración PRISMA<sup>28</sup>, fue registrado en la base de datos internacional PROSPERO <http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO> (CRD42014014878). La búsqueda de los estudios observacionales se realizó en diversas base de datos electrónicas (PubMed, EMBASE, The COCHRANE library, ScienceDirect, Scopus, Scielo, LILACS via Virtual Health Library, Google Scholar), sin hacer restricción de idioma, período de publicación (hasta junio de 2014), edad del paciente (niños o adultos) o diseño de estudio.

### Selección de estudios

Para la estrategia de búsqueda se utilizaron las siguientes palabras clave: dengue y dengue virus combinados con: oxidative stress, nitrosative stress, antioxidants, oxidants, free radicals, oxidized lipid products, lipid peroxides, superoxide dismutase, thioredoxin reductase, nitric oxide o nitric oxide synthase. También, se revisaron las listas de referencias en todos los artículos seleccionados.

La selección inicial fue realizada a partir del título y resumen excluyéndose: cartas para editor, revisiones, estudios *in vivo/in vitro*, en células de mosquito o de proteómica. En los casos de estudios duplicados, se incluyó la publicación más reciente.

### Estrategia de extracción de datos

A cada artículo seleccionado, se le revisó el diseño del estudio, objetivo, tamaño de la muestra, resultados principales y niveles plasmáticos de los marcadores de estrés oxidativo-nitrosativo evaluados.

## Resultados

### Identificación de estudios

En total, se identificaron 4,331 artículos, de los cuales 16 fueron seleccionados para lectura a texto completo (Fig. 1). En la Tabla 1 se presenta la citación del estudio, las definiciones y características de cada uno de los estudios seleccionados.

**Revisión de los estudios seleccionados**

**Delimitación espacial.** En cuanto al país de origen, los estudios seleccionados se distribuyen de la siguiente forma: India (n= 4), Tailandia (n= 2), Singapur (n= 2), Cuba (n= 2), Guatemala (n= 1), Brasil (n= 2), Venezuela (n= 2) y Colombia(n= 1)

**Diseño del estudio.** El diseño de estudio más frecuente en los artículos revisados fue el de casos y controles (81.3%; 13/16).

**Edad.** Las poblaciones objeto de estudio de los artículos seleccionados pueden ser clasificadas en los siguientes grupos etarios: niños (menores de 10 años, n= 1), adolescentes (10-19 años, n= 1), niños y adolescentes (n= 1), adultos (mayores de 19 años, n= 7), adolescentes y adultos (n= 3), niños, adolescentes y adultos (n= 2) y grupo etario no reportado (n= 1).

**Tiempo de seguimiento.** Aproximadamente, el 63% de los estudios seleccionados se reportó un período de seguimiento de 7 días. No se reportó período de seguimiento en el 25% de los estudios revisados.

**Sistema de clasificación de casos de dengue.** En todos los estudios revisados se utilizó el sistema de clasificación de OMS-1997.

En la Tabla 2, se presentan los niveles plasmáticos de los diferentes biomarcadores de estrés oxidativo-nitrosativo identificados en los estudios seleccionados, tales como: productos de lipoperoxidación (malondialdehído-MDA e hidroperóxidos-THs), carbonilos proteicos (PCOs), enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa-SOD, glutatión peroxidasa-GPx, paraoxonasa-PON), radical óxido nítrico y glutatión reducido (GSH).

Entre éstos, los biomarcadores más utilizados fueron los productos de lipoperoxidación (35.7%; 10/28), las enzimas antioxidantes (17.9%; 5/28) y el radical óxido nítrico 10.7%; 3/28).

**Discusión**

No se tiene conocimiento de revisiones previas que estudien la participación del estrés oxidativo-nitrosativo en la patogénesis del dengue. En la presente revisión sistemática se identificaron 16 artículos relacionados a esta participación.

Tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha reportado la capacidad inmunomoduladora del radical óxido nítrico y su asociación con las infecciones víricas<sup>29,30</sup>. Aun así, existen reportes de resultados incongruentes obtenidos en pacientes infectados con DENV. Por ejemplo, se han observado niveles séricos del radical óxido nítrico más elevados en pacientes con fiebre dengue (FD) que en controles sanos<sup>25,31</sup> o en pacientes con fiebre hemorrágica por dengue (FHD)<sup>25</sup>. En contraste, Trairatvorakul *et al.*<sup>32</sup>, reportaron que los niveles séricos del radical óxido nítrico fueron significativamente superiores en niños sanos que en pacientes con FD o con FHD. Es importante señalar que estos estudios presentan una baja relación caso/control ( $\leq 1:0.5$ ).

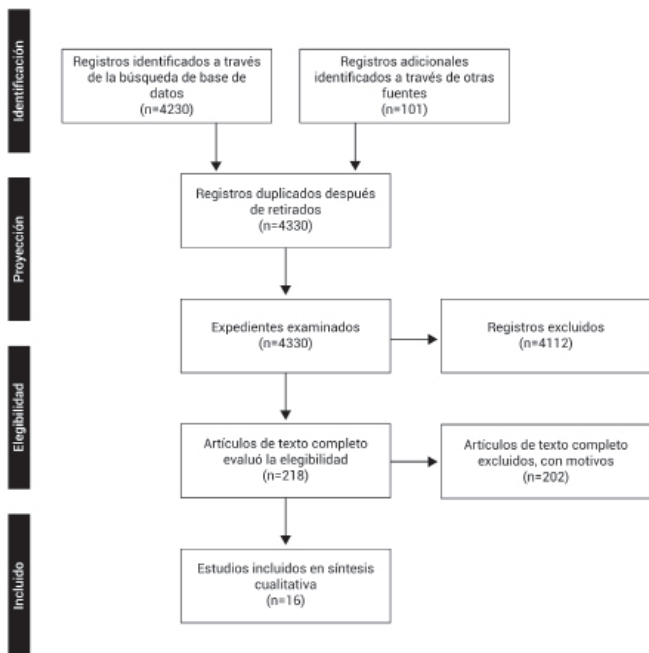
Los resultados de los dos primeros estudios son coherentes con la alta actividad NOS total y el alto transporte de L-arginina vía sistema  $\gamma^+L$  encontrados en plaquetas obtenidas de pacientes con FD y FHD, en comparación con controles sanos<sup>33,34</sup>.

En un estudio realizado por investigadores tailandeses se reportó que los niveles plasmáticos del radical óxido nítrico en 37 niños con FD primaria, FD secundaria o con FHD primaria, no fueron significativamente diferentes en ninguna de las tres fases clínicas del dengue- febril, de defervescencia o de convalecencia, mientras que estas concentraciones plasmáticas fueron significativamente más bajas en la fase febril en comparación con la fase de defervescencia en niños con FHD secundaria. Aunque pudieron establecer una correlación inversa entre los niveles séricos del radical óxido nítrico y la viremia DENV en pacientes con FHD secundaria<sup>22</sup>, no encontraron ninguna asociación con el serotipo DENV<sup>31</sup>.

Estas observaciones son consistentes con los hallazgos reportados por Yen *et al.*<sup>17</sup>, en cuanto a la coincidencia temporal entre la activación de iNOS, la producción de radicales libres y el desarrollo de hemorragias en ratones infectados por DENV.

La producción sistémica del radical óxido nítrico es frecuentemente evaluada a partir de la cuantificación de los niveles sanguíneos de nitrito y nitrato, utilizando ensayos espectrofotométricos basados en el reactivo de Griess<sup>35</sup>. Los resultados discrepantes presentados en la Tabla 2, podrían ser explicados por las diferencias en los métodos utilizados para la reducción de nitrato y para la desproteinización o por las diferencias en las características intrínsecas de las poblaciones estudiadas.

En cuanto a la utilización de los productos de lipoperoxidación como biomarcadores de estrés oxidativo, en varios estudios se han reportado altos niveles séricos de MDA y de 4-hidroxi-alquenos/4-HAE en pacientes con dengue en comparación con adultos sanos<sup>10,36-38</sup>. Adicionalmente, existen reportes de mayores niveles séricos de MDA en pacientes con FHD y con síndrome de choque por dengue-SCD que en pacientes con FD. Estos mismos autores reportan una correlación positiva entre los niveles séricos de MDA y de TNF- $\alpha$ , en todos los pacientes infectados con DENV<sup>10</sup>.



**Figura 1.** Diagrama de flujo de los estudios incluidos en la revisión sistemática.

**Tabla 1.** Evidencias observacionales de la participación del estrés oxidativo y nitrosativo en la patogénesis del dengue

Estudio Primer autor, País, (Referencia)	Diseño del estudio	Objetivo	Tamaño de la muestra	Resultados
Ray, India, <sup>50</sup>	Casos-contróles	Evaluar el estado de enzimas antioxidantes, enzimas de origen hepático y muscular y otros indicadores bioquímicos en niños con dengue	66 niños con dengue (45 días a 12 años) 25 niños sanos Período de seguimiento: ninguno	SOD: ↑ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,005$ ) GPx: ↓ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,005$ )
Valero, Venezuela, <sup>34</sup>	Casos-contróles	Determinar las concentraciones séricas de NO en pacientes con FD y FHD	105 pacientes con dengue 53 individuos sanos (pareados por edad) Período de seguimiento: ninguno	Nitric oxide: ↑ FD vs. FHD ( $p < 0,01$ ) ↑ FD vs. Contróles ( $p < 0,01$ )
Gil, Cuba, <sup>39</sup>	Casos-contróles	Estudiar el estado de algunos marcadores de estrés oxidativo en adultos con dengue	22 adultos con dengue (21 a 58 años) 22 individuos sanos (pareados por edad y sexo) Período de seguimiento: 7 días	TAS (día 7): ↑ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,05$ ) PP – SOD – MDA/4-HAD (días 3-5-7): ↑ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,05$ ) THs – GPx (días 3-5-7): ↓ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,05$ )
Klassen, Guatemala, <sup>40</sup>	Casos-contróles	Reportar datos de varios micronutrientes con antioxidantes en pacientes con dengue durante las tres fases clínicas	9 adultos con dengue (18 a 68 años) 12 individuos sanos Período de seguimiento: ninguno DI: admisión en el hospital DII: 5 días después de DI DIII: 7 días después de DI	Retinol: ↓ Pacientes (DI+DII) vs. Contróles ( $p < 0,05$ ) Retinol (pacientes) ↓ DI vs. DIII ( $p < 0,05$ ) β-carotenos: ↓ DII vs. DIII ( $p = 0,03$ ) GSH: ↓ DII vs. DI ( $p = 0,02$ ) GSH (at DIII): ↓ Pacientes vs. Contróles ( $p \leq 0,05$ ) TBARS (DI+DII): ↑ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,05$ ) TBARS (at DIII): ↑ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,05$ ) TAS (DI vs. DII): ↓ Pacientes vs. Contróles ( $p = 0,01$ )
Trairatvorakul, Thailand, <sup>35</sup>	Casos-contróles	Establecer la correlación entre los niveles de NO en pacientes con FD, FHD y SCD	110 niños con dengue (<15 años) 38 niños sanos (contróles pareados por edad) Período de seguimiento: ninguno	Nitric oxide: ↓ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,05$ ) ↑ FD vs. FHD I/II ( $p < 0,05$ ) ↓ FHD I/II vs. SCD ( $p < 0,05$ )
Rojas, Colombia, <sup>51</sup>	Estudios transversales	Evaluar la asociación entre los niveles de GPx y las manifestaciones y complicaciones del dengue	161 pacientes con dengue (6 a 85 años)	GPx: ↑ Pacientes con hemorragias vs. Pacientes sin hemorragias ( $p = 0,03$ )
Chareonsirisuthigul, Thailand, <sup>25</sup>	Estudios transversales	Investigar el efecto de ADA sobre la producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias	60 niños con dengue (5 a 10 años)	NO (FHD secundaria): ↓ Fiebre vs. convalecencia ( $p < 0,05$ )
Soundravally, India, <sup>48</sup>	Casos-contróles	Evaluar si los cambios en las proteínas plasmáticas inducidos por estrés oxidativo pueden ser predictores tempranos de dengue grave	80 pacientes con dengue (26 a 53 años) 63 individuos sanos (pareados por edad y sexo) Período de seguimiento: ninguno	PCO: ↑ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,001$ ) ↓ FD vs. FHD ( $p < 0,05$ ) ↓ FD vs. SCD ( $p < 0,05$ ) ↓ FHD vs. SCD ( $p < 0,05$ ) PBSh: ↓ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,001$ ) ↑ FD vs. FHD ( $p < 0,05$ ) ↑ FD vs. SCD ( $p < 0,05$ )
Soundravally, India, <sup>41</sup>	Casos-contróles	Investigar la asociación de la lipoperoxidación y la carbonilación de proteínas con la trombocitopenia en diferentes espectros clínicos del dengue	80 pacientes con dengue (26 a 53 años) 63 individuos sanos (pareados por sexo y edad) Período de seguimiento: 7 días	MDA (3-5-7 días): ↑ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,05$ ) ↓ FD vs. SCD ( $p < 0,05$ ) MDA (5-7 días): ↓ FD vs. FHD ( $p < 0,05$ ) PCOs (7 día): ↑ Pacientes vs. Contróles ( $p < 0,001$ ) TAS (3-5-7 días): ↓ SCD vs. Contróles ( $p < 0,05$ )

**Continuación Tabla 1.** Evidencias observacionales de la participación del estrés oxidativo y nitrosativo en la patogénesis del dengue

Estudio Primer autor, País, (Referencia)	Diseño del estudio	Objetivo	Tamaño de la muestra	Resultados
Mendes-Ribeiro, Brazil, <sup>36</sup>	Casos-contrroles	Investigar los efectos de FD sobre vía L-Arg-NO en plaquetas	16 pacientes con DF (35 ± 4 años) 18 controles sanos (pareados por edad) Período de seguimiento: ninguno	Tasa total de transporte de L-Arg via sistema y <sup>o</sup> L: ↑ FD vs. Controles ( <i>p</i> <0.05) Actividad total NOS: ↑ FD vs. Controles ( <i>p</i> <0.05)
Seet, Singapore, <sup>45</sup>	Casos-controles	Investigar el estrés oxidativo durante la infección DENV	28 pacientes con dengue (23 a 68 años) 28 controles sanos (pareados por edad) Período de seguimiento: 25 days	HETEs plasmático: ↑ Febril vs. Controles ( <i>p</i> <0.05) ↑ Febril vs. Convalecencia ( <i>p</i> <0.05) COPs: ↓ Febril vs. Controlss ( <i>p</i> <0.05) F2-IsoPs urinario: ↑ Febril vs. Controles ( <i>p</i> <0.05) ↑ Febril vs. Convalecencia ( <i>p</i> <0.05)
Lee, Singapore, <sup>46</sup>	Casos-controles	Esclarecer la relación entre productos de oxidación de lípidos y enfermedades en humanos	35 pacientes con dengue (25-86 años) 47 controles sanos (pareados por edad) Período de seguimiento: ninguno	F2-IsoPs libre plasmático: ↑ FD inicio vs. Controles ( <i>p</i> <0.01) ↑FD inicio vs. FD recuperación ( <i>p</i> <0.01) F2-IsoPs urinario: ↑FD inicio vs. Controles ( <i>p</i> <0.01) ↑FD inicio vs. FD recuperación ( <i>p</i> <0.01) HETEs total plasmático: ↑FD inicio vs. Controles ( <i>p</i> <0.01) ↑FD inicio vs. FD recuperación ( <i>p</i> <0.01) COPs: ↓DF FD inicio vs. Controles ( <i>p</i> <0.05) ↓DF FD inicio vs. FD recuperación ( <i>p</i> <0.05)
Levy, Venezuela, <sup>28</sup>	Estudios transversales	Comparar los niveles séricos de IL-6, TNF a, IL-1β, NO, CRP, C3 y apoptosis en pacientes infectados con DENV y en cultivos de monocitos/macrófagos	36 pacientes con FD (3 a 53 años) 34 pacientes con FHD (3 a 53 años)	Nitric oxide: ↑ FD vs. Controles ( <i>p</i> <0.001) ↑FD vs. FHD ( <i>p</i> <0.001) ↑Infección primaria vs. Controles ( <i>p</i> <0.001) ↑Infección secundaria vs. Controles ( <i>p</i> <0.001) ↓Infección primaria vs. Infección secundaria ( <i>p</i> <0.001)
Matsuura, Brazil, <sup>37</sup>	Casos-controles	Investigar el transporte de L-Arg y la expresión de iNOS en plaquetas de pacientes con FHD	23 pacientes con FHD (33 ± 14 años) 25 individuos sanos (pareados por edad) Período de seguimiento: ninguno	Transporte de L-Arg vía sistema y <sup>o</sup> L: ↑FHD vs. Controles ( <i>p</i> <0.05) Actividad total NOS: ↓ FHD vs. Controles ( <i>p</i> <0.05)
Gil, Cuba, <sup>44</sup>	Casos-controles	Estudiar el estado de índices redox	22 pacientes con dengue (18 a 84 años) 194 individuos sanos (pareados por edad) Período de seguimiento: 7 días	MDA – HPO – SOD – PP: ↑ Pacientes vs. Controles ( <i>p</i> <0.05) GSH: ↓ Pacientes vs. Controles ( <i>p</i> <0.05)
Soundravally, India, <sup>13</sup>	Casos-controles	Evaluar los niveles plasmáticos de MDA, TNF α e IFN g durante la defervescencia del dengue	81 pacientes con dengue (16-67 años) 30 individuos sanos (pareados por edad y sexo) Período de seguimiento: ninguno	MDA: ↓ FD vs. FHD ( <i>p</i> <0.001) ↓FD vs. SCD ( <i>p</i> <0.001) ↓FHD vs. SCD ( <i>p</i> = 0.017)

FD: fiebre dengue; FHD: fiebre hemorrágica del dengue; SOD: superóxido dismutasa; GSH: glutatión; GPX: glutatión peroxidasa; ALB: albumina; CAT: catalasa; MDA: malondialdehído; PCO: carbonilo proteico; HETEs: ácido hidroxieicosatetraenoico; COPs: productos oxidados del colesterol; F2-ISOPs: F2-isoprostanos; TAS: estado antioxidantes total; HPO: hidroperóxidos; PP: potencial de peroxidación; THs: hidroperóxidos totales.

Lo anterior es coherente con los resultados reportados en un reciente estudio, en relación a que los ratones infectados por DENV-2 muestran alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo, tales como un incremento en los niveles de MDA<sup>18</sup>. En conjunto, estos resultados proveen evidencias directas del posible uso de los productos terminales de la lipoperoxidación como biomarcadores pronósticos en pacientes con dengue.

Con la utilización del método de Satoh, se han reportado concentraciones similares de MDA<sup>10,38</sup>. Tanto en pacientes como en controles sanos, Klassen *et al.*<sup>37</sup>, reportaron bajos niveles de MDA utilizando el método corregido de Jentzsch. En cambio, Gil *et al.*<sup>36</sup>, reportaron altos niveles séricos de MDA en pacientes con dengue. Esta diferencia puede ser explicada por la detección de MDA en combinación con 4-HAE o por la sensibilidad y reproducibilidad del método utilizado<sup>39</sup>.

A pesar de que los niveles de THs pueden ser considerados como una medida del daño oxidativo total<sup>40</sup>, no existe un patrón

consistente de las concentraciones séricas de THs en los pacientes con dengue. Gil *et al.*<sup>36</sup>, reportaron una disminución significativa de estas concentraciones al comparar pacientes con dengue con adultos sanos. Pero, este mismo grupo de investigadores recientemente han reportado niveles séricos de THs elevados en pacientes con dengue en comparación con controles adultos<sup>41</sup>. En estos dos estudios se reportaron concentraciones similares de THs en los pacientes enfermos, más no en los controles sanos.

Los productos de oxidación del colesterol (COPs), isotropanos (IsoPs) y productos del ácido hidroxieicosatetraenoico (HETEs), también han sido utilizados como biomarcadores de estrés oxidativo. Durante la fase febril del dengue, se han detectado altos niveles de F<sub>2</sub>-IsoP en orina y altos niveles plasmáticos de HETEs, en comparación con lo encontrado durante la convalecencia y en los adultos sanos<sup>42</sup>. No se reportaron diferencias significativas en cuanto: (i) niveles totales de F<sub>2</sub>-IsoPs en todas las tres fases clínicas del dengue en comparación con los niveles encontrados en los controles sanos<sup>42,43</sup>, (ii) concentraciones urinarias de F<sub>2</sub>-

**Tabla 2.** Comparación de métodos utilizados y valores reportados en los estudios revisados.

Marcadores	Métodos	Valores reportados	Referencias
	<b>Detección espectrofotométrica:</b>		
	Absorbancia: 540 nm (reactivo de Griess)	FD (DENV-1): 57,4 ± 3,02 mM FD (DENV-4): 55,6 ± 2,25 mM FHD (DENV-2): 13,87 ± 2,05 mM FHD (DENV 4): 14,33 ± 1,25 mM Controles: aprox. 25 mM	34
NO	Absorbancia: 540 nm (Kit comercial, método de Griess)	FD: aprox. 40 mM FHD: aprox. 22 mM Controles: aprox. <10 mM	28
	Absorbancia: 532 nm (método de Satoh)	Dengue: 4,9 ± 0,9 mM Controles: 1,9 ± 0,4 mM	13
	Absorbancia: 586 nm MDA + 4-HDA (Kit comercial)	Dengue: aprox. 10 a 18 mM Controles: aprox. <10 mM	39
MDA	Diferencia en absorbancias a 532 and 572 nm (método de Jentzsch)	Dengue: 0,624 ± 0,144 mM Controles: 0,450 ± 0,116 mM	40
	Absorbance: 532 nm (método de Satoh)	Dengue: aprox. 2 a 8 mM Controles: aprox. 2 mM	41
	Absorbancia: 560 nm Oxidación de Fe(II) a Fe (III) por THs (Kit comercial)	Dengue: aprox. 50 a 150 mM Controles: aprox. 200 a 280 mM	39
THS	Absorbancia: 560 nm Oxidación de Fe(II) a Fe (III) por THs	Dengue: 119,6 ± 34,61 mM Controles: 70,3 ± 13,9 mM	44
	Absorbancia: 366 nm (método de Levine)	Dengue: aprox. 3,0 a 8,0 nmol/mg proteína Controles: aprox. 2,0 a 2,5 nmol/mg proteína	41
PCOs	Absorbancia: 366 nm (método de Levine)	FD: 4,98 ± 0,47 nmol/mg proteína FHD: 5,95 ± 0,61 nmol/mg proteína SCD: 6,66 ± 0,70 nmol/mg proteína Controles: 1,97 ± 0,56 nmol/mg proteína	48
	Absorbancia: 505 nm (Kit comercial)	DENV: aprox. 1,8 a 3,0 U/ml Controles: aprox. 1,2 a 1,7 U/ml	39
	Absorbancia: 480 nm (método de epinefrina)	DENV: 2,6 ± 0,71 U/mg Hb Controles: 1,41 ± 0,72 U/mg Hb	44
SOD	Absorbancia: 480 nm (método de epinefrina)	FD: 26,85 ± 8,13 U/ml FHD: 23,17 ± 9,98 U/ml SCD: 24,86 ± 9,22 U/ml Controles: 2,31 ± 0,97 U/ml	50

NO: radical óxido nítrico; MDA: Malondialdehído; 4-HAD: 4-hidroxiálquenal; TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico  
THs: hidroperóxidos totales; PCOs: carbonilos proteicos; SOD: superóxido dismutasa; FD: fiebre dengue; FHD: fiebre hemorrágica del dengue  
SCD: síndrome de choque por dengue; UV: luz ultravioleta.

IsoPs y niveles plasmáticos de HETEs al comparar las fases de defervescencia y de convalecencia<sup>42</sup> y (iii) las concentraciones totales de F<sub>2</sub>-IsoPs entre el inicio de la FD y el estado de recuperación de la FD. Sin embargo, se detectaron elevados niveles plasmáticos totales de HETEs y bajos niveles de COPs al comparar el inicio de la FD con el estado de recuperación o con los controles sanos<sup>43</sup>.

El contenido de carbonilos proteicos (PCOs) es utilizado como un importante biomarcador de daño oxidativo en proteínas en diversas enfermedades humanas relacionadas con el estrés oxidativo<sup>44</sup>. Se han reportado altas concentraciones séricas de PCOs en pacientes con dengue en comparación con controles adultos. Es más, estos altos niveles séricos han sido asociados con la severidad del dengue<sup>38,45</sup>. Interesantemente, en ambos estudios se reportaron concentraciones similares de PCOs, utilizando el método de Levine.

Por definición, el estrés oxidativo también involucra el sistema de defensa antioxidante, el cual incluye: enzimas antioxidantes (SOD, GPx, glutatión reductasa-GR, catalasa-CAT, el sistema de tioredoxina-TRX, etc.), depuradores de ROS (GSH, albumina, ácido ascórbico y ácido úrico) y quelantes de metales de transición (transferrina, ferritina, metalotioneína y ceruloplasmina)<sup>46</sup>.

Para todas las edades estudiadas, se han reportado altos niveles séricos de SOD y bajos niveles de GPx en pacientes con dengue, a diferencia de los controles<sup>36,41,47</sup>. Aunque al comparar estos dos grupos de individuos, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a las concentraciones plasmáticas de los nutrientes antioxidantes, es importante señalar que solo se analizaron 9 pacientes con dengue y 12 controles sanos<sup>37</sup>.

Existe un reporte de asociación entre los niveles séricos de GPx con la aparición de eventos hemorrágicos espontáneos y con los niveles de triglicéridos en pacientes con dengue. Esto permite pensar que la intensidad del estrés oxidativo puede influir en la presentación clínica del dengue<sup>48</sup>. Adicional y coherente con esto, se ha reportado un incremento en los niveles de triglicéridos principalmente en pacientes con dengue grave<sup>49</sup>. En consecuencia, es posible que el perfil de lípidos séricos en pacientes infectados pueda jugar un papel importante en la severidad del dengue.

Durante el curso clínico del dengue se producen radicales libres y se presentan alteraciones en los niveles de antioxidantes<sup>37</sup>. GSH es uno de los principales protectores celulares contra el daño oxidativo<sup>46</sup>. Existen diferencias entre los reportes que comparan las concentraciones de GSH entre pacientes con dengue y controles sanos. Gil *et al.*<sup>36</sup>, y Klassen *et al.*<sup>37</sup>, reportaron que los niveles séricos de este depurador no enzimático no fueron significativamente diferentes entre los dos grupos, mientras que Gil *et al.*<sup>41</sup>, reportaron que las concentraciones séricas de GSH fueron significativamente inferiores en los pacientes con dengue que en los controles. Es importante señalar que: (i) estos tres estudios fueron realizados en poblaciones de América central y del Caribe y (ii) el número de pacientes estudiados fue pequeño ( $n \leq 22$ ).

Más allá de las limitaciones propias de las revisiones sistemáticas, las evidencias presentadas en este estudio muestran que la presencia de estrés oxidativo-nitrosativo en pacientes con dengue puede

ser demostrada por cambios en los niveles séricos o plasmáticos del radical óxido nítrico, de antioxidantes y de marcadores de oxidación proteica y de lipoperoxidación.

Adicionalmente, el aumento en los niveles séricos de PCOs y MDA parece estar asociado con la severidad del dengue, expresada en términos del anterior sistema de clasificación de casos de dengue (OMS-1997). De acuerdo con esto, se hace necesario evaluar la posible asociación entre el estrés oxidativo-nitrosativo y la severidad del dengue en el contexto del nuevo esquema de clasificación (OMS-2009).

## Conclusiones

En relación con la información encontrada en los 16 artículos revisados, tanto el estrés oxidativo como el nitrosativo pueden ser demostrados en pacientes que cursan el dengue, basándose en los cambios de los niveles plasmáticos o séricos de diversos biomarcadores, tales como el radical óxido nítrico, enzimas y depuradores no enzimáticos antioxidantes, productos finales de lipoperoxidación y de la oxidación de proteínas. Es más, parece que altos niveles séricos de PCOs y MDA pudieran ser utilizados como marcadores pronósticos de severidad del dengue.

Aunque son muchos los estudios relacionados con la patogenia y la severidad del dengue, el entendimiento de estos dos procesos es incompleto. Si se puede profundizar en la comprensión de la relación entre el estrés oxidativo-nitrosativo y la patogénesis del dengue se podrían desarrollar estrategias pronosticas válidas para esta enfermedad tropical.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al doctor Salim Mattar (Universidad de Córdoba-Colombia) y al doctor Fernando de la Hoz (Instituto Nacional de Salud-Colombia) por sus comentarios y recomendaciones.

## Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés

## Referencias

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446): 504–7.
2. Sadon N, Delers A, Jarman RG, Klungthong C, Nisalak A, Gibbons RV, *et al.* A new quantitative RT-PCR method for sensitive detection of dengue virus in serum samples. *J Virol Methods*. 2008; 153(1): 1–6.
3. Mangold KA, Reynolds SL. A review of dengue fever: a resurging tropical disease. *Pediatr Emerg Care*. 2013; 29(5): 665–9.
4. PHAO. Number of reported cases of Dengue and figures for 2013 (to week noted by each country) *Epidemiological Week/EW* 52. Washington, DC: PAHO; 2014. [28 Jul 2015]. Available from: <http://reliefweb.int/report/honduras/number-reported-cases-dengue-and-severe-dengue-sd-americas-country-figures-2014-week>.

5. Laughlin CA, Morens DM, Cassetti MC, Costero-Saint Denis A, San Martin JL, Whitehead SS, *et al.* Dengue research opportunities in the Americas. *J Infect Dis.* 2012; 206(7): 1121–7.
6. Guzman A, Isturiz RE. Update on the global spread of dengue. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36(1): S40–2.
7. World Health Organization. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. New Edition. Geneva: WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee; 2009. pp. 147.
8. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgrad Med J.* 2004; 80(948): 588–601.
9. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis.* 2004; 8(2): 69–80.
10. Soundravally R, Hoti SL, Patil SA, Cleetus CC, Zachariah B, Kadhiraivan T, *et al.* Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence. *Int J Infect Dis.* 2014; 18: 68–72.
11. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007; 35(5): 1147–50.
12. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009; 46(5-6): 241–81.
13. Heinrich TA, da Silva RS, Miranda KM, Switzer CH, Wink DA, Fukuto JM. Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology. *Br J Pharmacol.* 2013; 169(7): 1417–29.
14. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002; 23(5): 599–622.
15. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr.* 2005; 135(10): 2299–304.
16. Orr WC, Sohal RS. Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression of life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 301(1): 34–40.
17. Yen YT CH, Lin YD, Shieh CC, Wu-Hsieh BA. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. *J Virol.* 2008; 82(24): 12312–24.
18. Wang J CY, Gao N, Wang Y, Tian Y, Wu J, Zhang J, Zhu J, Fan D, An J. Inhibitory effect of glutathione on oxidative liver injury induced by dengue virus serotype 2 infections in mice. *PloS One.* 2013; 8(1): e55407.
19. Marianneau P SA, Royer C, Drouet MT, Jaeck D, Kirn A, Deubel V. Infection of primary cultures of human Kupffer cells by Dengue virus: no viral progeny synthesis, but cytokine production is evident. *J Virol.* 1999; 73(6): 5201–6.
20. Jan JT CB, Ma SH, Liu CI, Tsai HP, Wu HC, Jiang SY, Yang KD, Shaio MF. Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kappaB are sequentially involved. *J Virol.* 2000; 74(18): 8680–91.
21. Neves-Souza PC AE, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, Nogueira RM, Kubelka CF. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis.* 2005; 5: 64.
22. Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 2007; 88(2): 365–75.
23. Tian Y JW, Gao N, Zhang J, Chen W, Fan D, Zhou D, An J. Inhibitory effects of glutathione on dengue virus production. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 397(3): 420–4.
24. Lin YL LC, Chuang JI, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, Huang YH, Liu HS. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology.* 2000; 276(1): 114–26.
25. Levy A, Valero N, Espina LM, Anez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010; 104(1): 16–23.
26. Al-Alimi AA AS, Al-Hassan FM, Idris FM, Teow SY, Mohd Yusoff N. Dengue virus type 2 (DENV2)-induced oxidative responses in monocytes from glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient and G6PD normal subjects. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(3): e2711.
27. Olagnier D PS, Steel C, van Montfoort N, Chiang C, Beljanski V, Sliker M, He Z, Nichols CN, Lin R, Balachandran S, Hiscott J. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. *PLoS Pathog.* 2014; 10(12): 1004566.
28. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA Statement. *Open Med.* 2009; 3(3): e123–30.
29. Wink DA, Hines HB, Cheng RY, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, *et al.* Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol.* 2011; 89(6): 873–91.
30. Chaturvedi UC, Nagar R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009; 56(1): 9–24.
31. Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 2007; 88(2): 365–75.



32. Trairatvorakul P, Chongsrisawat V, Ngamvasinont D, Asawarachun D, Nantasook J, Poovorawan Y. Serum nitric oxide in children with dengue infection. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2005;23 (2-3): 115–9.
33. Mendes-Ribeiro AC MM, Siqueira MA, Moraes TL, Ellory JC, Mann GE, Brunini TM. Dengue fever activates the L-arginine-nitric oxide pathway: an explanation for reduced aggregation of human platelets. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008; 35(10): 1143–6.
34. Matsuura C, Moraes TL, Barbosa JB, Moss MB, Siqueira MA, Mann GE, *et al.* Nitric oxide activity in platelets of dengue haemorrhagic fever patients: the apparent paradoxical role of ADMA and l-NMMA. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(3): 174–9.
35. Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess Reaction Assay. *Sensors.* 2003; 3: 276–84.
36. Gil L, Martinez G, Tapanes R, Castro O, Gonzalez D, Bernardo L, *et al.* Oxidative stress in adult dengue patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71(5): 652–7.
37. Klassen P, Biesalski HK, Mazariegos M, Solomons NW, Furst P. Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidants. *Nutrition.* 2004; 20(6): 542–7.
38. Soundravally R, Sankar P, Bobby Z, Hoti SL. Oxidative stress in severe dengue viral infection: association of thrombocytopenia with lipid peroxidation. *Platelets.* 2008; 19(6): 447–54.
39. Srour MAB, Y Y.Y; Juma, M. Evaluation of different methods used to measure malonyldialdehyde in human erythrocytes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2000; 23(1): 23–30.
40. Kakita H, Hussein MH, Daoud GA, Kato T, Murai H, Sugiura T, *et al.* Total hydroperoxide and biological antioxidant potentials in a neonatal sepsis model. *Pediatr Res.* 2006; 60(6): 675–9.
41. Gil dVL, Leon OS, Pérez J, Gonzalez I, Milian LC, Guevara M. Characterization of oxidative stress in different clinical conditions, using redox indexes of diagnostic value. *Biotechnol Aplic.* 2012; 29: 175–83.
42. Seet RC, Lee CY, Lim EC, Quek AM, Yeo LL, Huang SH, *et al.* Oxidative damage in dengue fever. *Free Rad Biol Med.* 2009; 47(4): 375–80.
43. Lee CY, Seet RC, Huang SH, Long LH, Halliwell B. Different patterns of oxidized lipid products in plasma and urine of dengue fever, stroke, and Parkinson's disease patients: cautions in the use of biomarkers of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(3): 407–20.
44. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003; 329(1-2): 23–38.
45. Soundravally R, Sankar P, Hoti SL, Selvaraj N, Bobby Z, Sridhar MG. Oxidative stress induced changes in plasma protein can be a predictor of imminent severe dengue infection. *Acta Trop.* 2008; 106(3): 156–61.
46. Noori S. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Vitamins Trace Elements.* 2012; 1(8): 413.
47. Ray G, Kumar V, Kapoor AK, Dutta AK, Batra S. Status of antioxidants and other biochemical abnormalities in children with dengue fever. *J Trop Pediatr.* 1999; 45(1): 4–7.
48. Rojas E, Díaz-Quijano FA, Coronel-Ruiz C, Martínez-Vega RA, Rueda E, Villar-Centeno LA. Correlación entre los niveles de glutatión peroxidasa y presentación clínica del dengue. *Rev Med Chil.* 2007; 135(6): 743–50.
49. Duran A, Carrero R, Parra B, Gonzalez A, Delgado L, Mosquera J, *et al.* Association of lipid profile alterations with severe forms of dengue in humans. *Arch Virol.* 2015;160(7): 1687–92.