



BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO  
COMO INDICADORES PRONÓSTICOS DE  
SEVERIDAD EN PACIENTES CON DENGUE

RAIMUNDO CASTRO OROZCO QF; MSc

TESIS DOCTORAL  
DOCTORADO EN MEDICINA TROPICAL – SUE CARIBE  
UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

Cartagena de Indias, 2018

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA**  
**DOCTORADO EN MEDICINA TROPICAL-SUE CARIBE**



**BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO COMO INDICADORES  
PRONÓSTICOS DE SEVERIDAD EN PACIENTES CON DENGUE**

**TESIS DOCTORAL**

**Raimundo Castro Orozco QF; MSc**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Nelson Rafael Alvis Guzmán MD; MSc; PhD**

Nota de aceptación

---

---

---

---

Doctor Nelson Rafael Alvis Guzmán, PhD  
Director

Jurados/Evaluadores

---

Doctora Carola Otth Lagunas, PhD

---

Doctor Pedro José Blanco Tuiran, PhD

---

Doctor Jaime Eduardo Castellanos Parra, PhD

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a mi director de tesis, Doctor Nelson Rafael Alvis Guzmán, a quien le agradezco su confianza, todas sus enseñanzas y por ser mi referente en mi formación en investigación científica de calidad. Tiene todo mi respeto estimado doctor Nelson.

También, quisiera agradecer a la Universidad de San Buenaventura Cartagena por el apoyo institucional y financiero que me permitió alcanzar esta oportunidad de enriquecimiento intelectual.

Agradezco a Colciencias, por la beca de doctorado y la posibilidad de financiamiento del presente estudio.

Gracias a la licenciada María Paquita García Mendoza, a la doctora Nancy Sussy Merino Sarmiento, al doctor Adolfo Ismael Marcelo Ñique, al doctor Oscar Roberto Escalante Maldonado, a Luis Gabriel DeLucio Burga y al resto de personal del Laboratorio de Metaxénicas Virales del Instituto Nacional de Salud del Perú, por todo su apoyo y acompañamiento durante mi estancia científica.

A la doctora Doris Gómez Camargo, Directora del Doctorado en Medicina Tropical – SUE Caribe, mi gratitud y cariño por su paciencia, gestión y apoyo.

Finalmente, un especial agradecimiento a DIOS por permitirme encontrar, a tantas personas valiosas, siempre en el momento indicado.

**DEDICATORIA**

Esta es la parte más sencilla de escribir...

A Daniela Sofía

A Laura Sofía

## **CONTENIDO**

## Contenido

Abreviaturas

Índices de Tablas

Índices de Figuras

Resumen

Summary

1.	Introducción al dengue.....	2
1.1	Agente etiológico .....	2
1.2	Infección DENV .....	2
1.3	Características epidemiológicas del dengue.....	3
1.4	Perfil epidemiológico del dengue en las Américas .....	4
1.5	Perfil epidemiológico del dengue en Colombia .....	4
1.6	Perfil epidemiológico del dengue en Perú.....	5
1.7	Manifestaciones clínicas y definición de casos de dengue.....	5
1.8	Patogénesis del dengue grave.....	6
1.9	Biomarcadores de estrés oxidativo .....	7
1.9.1	Carbonilos proteicos .....	8
1.9.2	Superóxido dismutasa .....	9
1.9.3	Hidroperóxidos lipídicos.....	10
1.9.4	Estudios sobre el papel del estrés oxidativo en la patogénesis del dengue .....	10
1.10	Detección colorimétrica de biomarcadores de estrés oxidativo .....	12
1.10.1	Determinación de carbonilos proteicos por el método de referencia: reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina en medio ácido.....	12
1.10.2	Determinación de carbonilos proteicos por el método alcalino; reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina en medio alcalino .....	13
1.10.3	Determinación de la actividad de superóxido dismutasa.....	13
1.10.4	Determinación de hidroperóxidos lipídicos por reacción redox con iones ferrosos.....	14
2.	Planteamiento del problema de investigación y justificación del estudio .....	16
2.1	Formulación del problema .....	20
3.	Hipótesis y objetivos de investigación.....	22
3.1	Hipótesis de investigación .....	22
3.2	Objetivos de investigación .....	22

3.2.1	Objetivo general .....	22
3.2.2	Objetivos específicos.....	22
4.	Materiales y métodos.....	25
4.1	Diseño del estudio .....	25
4.1.1	Definición de casos y controles .....	25
4.1.2	Tamaño de muestra.....	26
4.1.3	Población objeto de estudio.....	27
4.1.4	Recolección de datos .....	28
4.1.5	Detección cualitativa de NS1-DENV (grupo de derivación).....	28
4.1.6	Detección semicuantitativa de IgM anti-DENV e IgG anti-DENV (grupo de derivación).....	28
4.1.7	Detección semicuantitativa de IgM anti-DENV e IgG anti-DENV (grupo de validación externa).....	30
4.1.8	Detección semicuantitativa de IgM anti-virus de la fiebre amarilla-FAV (grupo de validación externa).....	31
4.1.9	Extracción y purificación de ARN viral (grupo de validación externa).....	31
4.1.10	Detección cualitativa y diferenciación de ARN-DENV, ARN-ZIKV, ARN-CHIKV y ARN-FAV (grupo de validación externa) .....	32
4.1.11	Serotipificación de ARN-DENV (grupo de validación externa) .....	33
4.1.12	Determinación colorimétrica de los niveles séricos de carbonilos proteicos.....	34
4.1.13	Determinación colorimétrica de los niveles séricos de superóxido dismutasa mitocondrial, citosólica y total .....	35
4.1.14	Determinación colorimétrica de los niveles séricos de hidroperóxidos lipídicos ...	36
4.1.15	Plan de análisis estadístico de los datos.....	37
4.1.16	Consideraciones éticas.....	40
5.	Resultados.....	42
5.1	Características de la población de estudio.....	42
5.1.1	Grupo de derivación. ....	42
5.1.2	Grupo de validación externa .....	43
5.2	Comportamiento de los niveles séricos de los biomarcadores.....	47
5.2.1	Niveles de carbonilos proteicos en muestras de suero de pacientes pediátricos (grupo de derivación) .....	47
5.2.2	Actividad enzimática de superóxido dismutasa mitocondrial, citosólica y total (grupo de derivación) .....	48

5.2.3	Niveles de hidroperóxidos lipídicos en muestras de suero de pacientes pediátricos (grupo de derivación) .....	49
5.2.4	Niveles de carbonilos proteicos en muestras de suero de pacientes (grupo de validación externa).....	51
5.2.5	Actividad enzimática de superóxido dismutasa mitocondrial en muestras de suero de pacientes (grupo de validación externa).....	55
5.2.6	Niveles de hidroperóxidos lipídicos en muestras de suero de pacientes (grupo de validación externa).....	57
5.3	Punto de corte óptimo y área bajo la curva de cada biomarcador .....	57
5.4	Pronóstico de severidad del dengue .....	60
5.4.1	Modelos de regresión logística binaria.....	60
5.4.2	Modelos de regresión probit binario .....	60
5.5	Calibración y discriminación del mejor modelo pronóstico estimado .....	62
5.6	Transportabilidad del mejor modelo pronóstico.....	67
6.	Discusión .....	76
7.	Conclusiones .....	93
8.	Bibliografía.....	96

## **ABREVIATURAS**

AUC; área bajo la curva ROC

AVAD: años de vida ajustados por discapacidad

Cu/ZnSOD: superóxido dismutasa citosólica, SOD-1

CHIKV: virus chikungunya

DENV: virus dengue

DCSA: dengue con signos de alarma

DNPH: dinitrofenildrazina

DSSA: dengue sin signos de alarma

EGI: estrategia de gestión integrada

FAV: virus de fiebre amarilla

GPT: transaminasa glutámico piruvica

GPx: glutatión peroxidasa

GOT: transaminasa glutámico oxalacética

4-HAE: 4-hidroxi-alquenos

4-HNE: 4-hidroxinonenal

IC95%<sub>dif</sub>: intervalo de confianza del 95% de la diferencia

LOOHs: hidroperóxidos lipídicos

MDA: malondialdehído

MMP: metaloproteínasa

MnSOD: superóxido dismutasa mitocondrial, SOD-2

NBT: azul de tetrazolio nitrado

OMS: organización mundial de la salud

ON: radical óxido nítrico

PAD: presión arterial diferencial

PCOs: carbonilos proteicos

RT-PCR: reacción en cadena polimerasa con transcripción inversa

RIC: rango intercuartílico

ROC: característica operativa del receptor, receiver operating characteristic

ROS: especies reactivas de oxígeno

SOD: superóxido dismutasa

TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

ZIKV: virus zika

## **ÍNDICE DE TABLAS**

## Índice de Tablas

Tabla 1. Características clínicas y de laboratorio de pacientes pediátricos con dengue grave y dengue con signos de alarma, Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016.....	45
Tabla 2. Características clínicas y de laboratorio de pacientes con dengue grave y dengue con signos de alarma, grupo de validación externa, Perú, 2018 .....	46
Tabla 3. Características clínicas y de laboratorio de pacientes pediátricos con dengue grave y dengue con signos de alarma, grupo de validación externa, Perú, 2018 .....	47
Tabla 4. Parámetros de validez y seguridad diagnóstica de los puntos de corte óptimo estimados para los niveles séricos de carbonilos proteicos en una población pediátrica. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016.....	63
Tabla 5. Parámetros de validez y seguridad diagnóstica de los puntos de corte óptimo estimados para las actividades enzimáticas séricas estimadas para la superóxido dismutasa mitocondrial, superóxido dismutasa total y superóxido dismutasa citosólica en una población pediátrica. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016.....	63
Tabla 6. Modelos de regresión logística binaria para pronosticar severidad del dengue en una población pediátrica, utilizando las concentraciones séricas de carbonilos proteicos. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016.....	64
Tabla 7. Modelos de regresión logística binaria para pronosticar severidad del dengue en una población pediátrica, utilizando los puntos de corte óptimos de las concentraciones séricas de carbonilos proteicos. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016.....	65
Tabla 8. Comparación de los parámetros de validez y seguridad diagnóstica de los modelos pronósticos de dengue grave en población pediátrica, estimados por análisis de regresión logística binaria y por análisis de regresión probit binario. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016 .....	66
Tabla 9. Comparación de índices de exactitud de los modelos pronósticos de dengue grave en población pediátrica, estimados por análisis de regresión logística binaria y por análisis de regresión probit binario. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016.....	66
Tabla 10. Modelos de regresión logística binaria para pronosticar severidad del dengue en una población, utilizando el punto de corte óptimo de las concentraciones séricas de carbonilos proteicos. Grupo de derivación, Perú, 2018. Estrategia de validación retrospectiva.....	73
Tabla 11. Comparación de la capacidad discriminativa de los modelos de regresión logística binaria para pronosticar severidad del dengue en una población, utilizando el punto de corte óptimo de las concentraciones séricas ajustadas de carbonilos proteicos. Estrategias de validación prospectiva y retrospectiva.....	74

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

## Índice de Figuras

Figura 1. Comparación entre las concentraciones de carbonilos proteicos en las muestras de suero de pacientes pediátricos con dengue grave y con dengue con signos de alarma (DCSA). Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016.....	50
Figura 2. Comparación entre las concentraciones de carbonilos proteicos (PCOs) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave y con dengue con signos de alarma (DCSA). Grupo de validación externa, Perú, 2018.....	53
Figura 3. Comparación entre las concentraciones de carbonilos proteicos (PCOs) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave, dengue con signos de alarma (DCSA), dengue sin signos de alarma (DSSA), infectados con virus zika (ZIKV) y con reacción cruzada (R. Cruzada: DENV + otro arbovirus). Grupo de validación externa, Perú, 2018 .....	54
Figura 4. Comparación entre las concentraciones de superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave, dengue con signos de alarma (DCSA), dengue sin signos de alarma (DSSA), infectados con virus zika (ZIKV) y con reacción cruzada (R. Cruzada: DENV + otro arbovirus). Grupo de validación externa, Perú, 2018 .....	56
Figura 5. Comparación entre las concentraciones de superóxido dismutasa total (SOD total) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave, dengue con signos de alarma (DCSA), dengue sin signos de alarma (DSSA), infectados con virus zika (ZIKV) y con reacción cruzada (R. Cruzada: DENV + otro arbovirus). Grupo de validación externa, Perú, 2018 .....	56
Figura 6. Comparación entre las concentraciones de superóxido dismutasa citosólica (Cu/ZnSOD) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave, dengue con signos de alarma (DCSA), dengue sin signos de alarma (DSSA), infectados con virus zika (ZIKV) y con reacción cruzada (R. Cruzada: DENV + otro arbovirus). Grupo de validación externa, Perú, 2018 .....	57
Figura 7. Curva ROC de las concentraciones de carbonilos proteicos (PCOs) en las muestras de suero de pacientes pediátricos con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016.....	59
Figura 8. Curva ROC de las concentraciones ajustadas de carbonilos proteicos (PCOs-A) en las muestras de suero de pacientes pediátricos con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016 .....	59
Figura 9. Curva ROC del modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,29 nmol de PCOs/mg de proteínas, aplicado a las muestras de suero de pacientes pediátricos con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016 .....	67

Figura 10. Curva ROC del modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,29 nmol de PCOs/mg de proteínas, aplicado a las muestras de suero de pacientes con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de validación externa, Perú, 2018..... 70

Figura 11. Curva ROC de las concentraciones ajustadas de carbonilos proteicos (PCOs-A) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de derivación, Perú, 2018. Estrategia de validación retrospectiva..... 70

Figura 12. Curva ROC del modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,77 nmol de PCOs/mg de proteínas, aplicado a las muestras de suero de pacientes pediátricos con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de validación externa, Barranquilla, 2014-2016. Estrategia de validación retrospectiva ..... 72

**RESUMEN**

## **Biomarcadores de estrés oxidativo como indicadores pronósticos de severidad en pacientes con dengue**

**Introducción.** Existen evidencias de la participación del estrés oxidativo en la patogénesis del dengue grave. Sin embargo, los referentes observacionales presentan ciertas limitaciones metodológicas, las cuales pueden afectar su validez interna y externa.

**Materiales y métodos.** Estudio de casos y controles, con pacientes con dengue grave y dengue con signos de alarma, para examinar el comportamiento de los niveles séricos de carbonilos proteicos, hidroperóxidos lipídicos, superóxido dismutasa mitocondrial, citosólica y total, en pro de su evaluación como potenciales indicadores pronósticos de severidad en pacientes con diagnóstico de dengue, utilizando análisis de regresión logística binaria y probit binario, enmarcado en una estrategia de doble validación cruzada. Para tal fin, se seleccionó un grupo de derivación con muestras de suero de pacientes pediátricos procedentes de Barranquilla-Colombia y un grupo de validación externa con muestras de suero, de niños y adultos, remitidas al Instituto Nacional de Salud del Perú.

**Resultados.** Los carbonilos proteicos fueron los únicos marcadores de estrés oxidativo que mostraron asociación con la severidad del dengue, tanto en niños como en adultos. En el grupo de derivación, el punto de corte óptimo fue estimado en 5,29 nmol/mg de proteína, y en el grupo de validación externa, fue de 5,77 nmol/mg de proteína.

**Conclusión.** Los modelos pronósticos basados en estos dos umbrales diagnósticos presentaron una alta capacidad discriminatoria de severidad del dengue, reproducibilidad externa, transportabilidad geográfica y características de validez y seguridad diagnóstica, propias de las pruebas de cribado.

**Palabras clave:** Dengue, Dengue Grave; Carbonilación Proteica; Superóxido Dismutasa; Peróxidos Lipídicos (*Fuente: DeCS*)

**SUMMARY**

## **Oxidative stress biomarkers as prognostic indicators of severity in patients with dengue**

**Introduction.** There is evidence for the role of oxidative stress in severe dengue pathogenesis. However, previous observational studies presents certain methodological limitations, which may affect its internal and external validity.

**Materials and methods.** This study was a case-control analysis of patients with severe dengue and dengue with warning signs, to evaluate the serum protein carbonyls-PCOs and lipid hydroperoxides-LOOHs levels and activities of superoxide dismutases-SODs (MnSOD, Cu/ZnSOD and total SOD), as potential prognosis indicators of severity in dengue patients, using binary logistic and binary probit regression analysis and strategy of double cross-validation. Therefore, the study population was subdivided into a derivation group (pediatric patients, Barranquilla-Colombia) and an external validation group (children and adults patients, National Institute of Health of Peru).

**Results.** The protein carbonyls was the only oxidative stress markers that showed a strongest association with the severity of dengue, both in children and adults. In the derivation group, the optimal cut-off point was estimated at 5.29 nmol/mg of protein, and in the external validation group, it was 5.77 nmol/mg of protein.

**Conclusion.** The prognostic models based on these two diagnostic thresholds showed a high discriminatory capacity of dengue severity, external reproducibility, geographic transportability, and typical characteristics of diagnostic validity and safety of screening tests.

**Keywords:** Dengue; Severe Dengue; Oxidative Stress; Protein Carbonylation; Superoxide Dismutase, Manganese; Superoxide Dismutase, Cu-Zn; Lipid Hydroperoxide; Prognosis (Source: MeSH)

# **CAPÍTULO 1**

## 1. Introducción al dengue

El dengue es una enfermedad infecciosa tropical producida por el virus dengue-DENV y transmitida por artrópodos del género *Aedes*. Aunque *A. aegypti* se considera el vector primario, se conoce que otras especies como *A. albopictus* y *A. polynesiensis* pueden participar en la cadena de infección en ciertas zonas geográficas del mundo<sup>1-4</sup>.

### 1.1 Agente etiológico

El DENV es un ribovirus, perteneciente a la Familia *Flaviviridae* (género *Flavivirus*), con genoma monocatenario, lineal, no segmentado y de polaridad positiva, el cual se encuentra protegido por una cápside icosaédrica de, aproximadamente, 30 nm de diámetro, constituida por la proteína C. Esta nucleocápside se encuentra rodeada por una envoltura lipídica con glicoproteínas peploméricas E y proteína M. Adicional a estas tres proteínas estructurales, el genoma DENV tiene la información para la traducción de siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5)<sup>5, 6</sup>. Se reconocen cuatro serotipos de este flavivirus (DENV-1 al -4) con, aproximadamente, el 70% de secuencias de aminoácidos idénticas<sup>7, 8</sup>.

### 1.2 Infección DENV

La glicoproteína E participa en la infección de la célula blanco actuando como proteína de adherencia vírica-PAV, mediando el reconocimiento de receptores primarios, tales como el heparán sulfato y la lectina DC-SIGN. Existe evidencia de penetración tanto por fusión de membranas en monocitos humanos, en células de mosquito y células BHK, como por viropexis en células HeLa, en células de mosquito C6/36 y en células BSC-1<sup>9</sup>.

*In vitro*, se ha demostrado la infección DENV productiva en células dendríticas, monocitos/macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, fibroblastos, células endoteliales y hepatocitos. *In vivo*, monocitos/macrófagos se consideran células blanco primario<sup>10, 11</sup>.

En niños mayores y en adultos inmunocompetentes, la primoinfección por DENV se caracteriza por la aparición de un síndrome febril agudo, con sintomatología inespecífica y, ocasionalmente, con manifestaciones hemorrágicas. La resolución de este proceso

infeccioso está asociada a una robusta respuesta inmune innata y adaptativa. Algunos casos pueden desarrollar cuadros clínicos más graves, especialmente, en niños pequeños y en adultos mayores. Las características más relevantes en este tipo de casos corresponden a la presencia de pérdida plasmática y a la hemoconcentración. Aunque la elevación de transaminasas y la trombocitopenia se pueden manifestar independiente de la severidad del dengue, la magnitud de cambio de estas dos manifestaciones es mayor en los casos de dengue grave <sup>12</sup>.

Para el caso de las infecciones secundarias, los individuos presentan una tormenta de citoquinas, caracterizada por altas concentraciones, en suero, de citoquinas proinflamatorias, la cual puede conllevar a la activación endotelial y pérdida vascular con hemorragia y choque. Esta condición inmune se acompaña de la activación de la cascada de coagulación, de proteínas de fase aguda, receptores solubles y otros mediadores proinflamatorios <sup>12, 13</sup>.

### *1.3 Características epidemiológicas del dengue*

En el mundo, se estima que más de dos billones de personas habitan en regiones endémicas de dengue. Esta estimación es consistente tanto con los reportes de hasta 100 millones de casos de dengue cada año como con el incremento de la incidencia global de esta arbovirosis, observado en las últimas décadas. El anterior perfil epidemiológico se puede explicar por la influencia de múltiples macrodeterminantes y microdeterminantes relacionados con la transmisión y diseminación del dengue, presentes en las poblaciones expuestas <sup>14, 15</sup>.

Los determinantes epidemiológicos pueden ser categorizados en: (I) factores ambientales: latitud, altitud, temperatura, humedad relativa y pluviosidad; (II) factores sociales y económicos: urbanización no planificada, baja frecuencia y calidad de los servicios sanitarios y suministro deficiente de agua potable; (III) factores culturales: modos y estilos de vida de la población expuesta, baja percepción individual y colectiva del riesgo de exposición vectorial, y desconocimiento de los deberes en el control y prevención; (IV) factores políticos: escaso desarrollo institucional y débil capacidad de respuesta técnica

operativa necesarias para el control y prevención, entre otros; (V) factores del hospedador; (VI) factores asociados al virus y (VII) factores asociados al vector <sup>14, 15</sup>.

#### 1.4 Perfil epidemiológico del dengue en las Américas

Debido a la suspensión de los programas de erradicación vectorial en los años 60, la mayoría de los países de Latinoamérica y el Caribe fueron re-infestados con *A. aegypti*, emergiendo la enfermedad. En 1977, se reportó la primera epidemia en Cuba, causada por DENV-1. En cambio, la epidemia cubana del 1981, se asoció al genotipo del sureste de Asia-DENV-2, reportándose más de 10 000 casos de dengue hemorrágico, y en más del 95% de estos se asociaron a reinfección. Igualmente, la otra gran epidemia cubana del 1997, también fue causada por reinfecciones por DENV-2. Actualmente, la hiperendemia ha sido reportada en la mayoría de los países, lo cual incrementa la probabilidad de aparición de casos de dengue grave en América <sup>16, 17</sup>.

#### 1.5 Perfil epidemiológico del dengue en Colombia

Desde 1980, se considera a Colombia un país endémico para dengue. Entre 2001 y 2005, se reportaron más de 240 000 casos y, aproximadamente, el 70% del total de muertes notificadas en América. En 2010, se presentó una epidemia con más de 157 000 casos y letalidad de 2,26% <sup>18, 19</sup>. En un período de doce años (1999-2010), la tasa de incidencia se incrementó en, aproximadamente, el 277%. Este fenómeno de expansión también se pudo evidenciar en el aumento en el número de municipios endémicos <sup>18</sup>.

Pero, desde la epidemia del 2013-2014, la tasa de incidencia nacional de dengue se ha reducido desde 478,3 casos por 100 000 habitantes hasta 366,2 casos por 100 000 habitantes <sup>20-24</sup>.

Al comparar los periodos epidémicos e interepidémicos en Colombia, otras características epidemiológicas que se evidencian son: mayor notificación de casos de dengue en individuos mayores de 14 años, acompañado con una reducción en la detección de casos de dengue grave. En este punto, es importante señalar que esta reducción en notificación de casos severos no es una característica de patrón homogéneo en el territorio nacional,

por ejemplo, para el primer año del período interepidémico, Barranquilla fue la única entidad territorial de la Costa Caribe que hizo parte del grupo de 12 entidades que notificaron el 80% de los casos de dengue grave en Colombia <sup>22</sup>, en cambio, para el año siguiente, todas las entidades territoriales de la Costa Caribe reportaron tan solo el 13% de los casos de dengue grave, con un comportamiento del dengue en situación de éxito y seguridad durante todas las 52 semanas epidemiológicas del 2016 <sup>23</sup>.

### *1.6 Perfil epidemiológico del dengue en Perú*

En el Perú, el perfil de la incidencia del dengue es predominantemente estacional en las diferentes regiones del país, presentándose el mayor número de casos durante el período de lluvias, correspondiente a diciembre a abril, en la zona de selva o durante el período de enero a mayo en las zonas del bosque seco y de la costa norte peruana <sup>25</sup>.

En un país con evidencia de la co-circulación de los cuatro serotipos DENV, se considera que el ingreso del linaje Asiático/Americano del DENV-2 fue el factor desencadenante de la última epidemia registrada de dengue, afectando en mayor proporción a la población menor de 14 años y al sexo femenino. En este período epidémico, se reportó una tasa de incidencia nacional de 62,95 casos por 100 000 habitantes, pero el 25% de las regiones peruanas que notificaron casos reportaron tasas de incidencia superiores, con valores entre 218,4 a 2356,77 casos por 100 000 habitantes <sup>26</sup>.

Durante el período interepidémico, 2013-2016, en los casos notificados de dengue se registró un ligero predominio del sexo masculino y una mayor proporción de enfermos en los grupos etarios superiores a 14 años <sup>27-30</sup>.

### *1.7 Manifestaciones clínicas y definición de casos de dengue*

El dengue posee un periodo de incubación de 3 a 7 días, posteriormente, se presentan tres fases clínicas <sup>31</sup>.

*Fase febril (día 1-3).* Los pacientes infectados desarrollan, de manera súbita, fiebre alta y, a menudo, acompañada por eritema cutáneo, mialgias, artralgias, cefalea, anorexia, náuseas y vómitos <sup>31</sup>.

*Fase crítica o de defervescencia (día 4-6).* Se puede presentar un incremento en la permeabilidad capilar concomitante con una elevación del hematocrito. Por lo general, el período de pérdida plasmática con importancia clínica dura entre 24-48 horas, precedido por leucopenia progresiva y seguido por un descenso rápido en el conteo de plaquetas. En este momento, se presenta la mejoría en los pacientes sin permeabilidad capilar o se desarrollan cuadros más severos en los pacientes con permeabilidad capilar incrementada, por tanto, esta es la única fase clínica que permite la diferenciación de los casos de dengue según su severidad <sup>31</sup>.

*Fase de convalecencia (día 7-10).* Si el paciente sobrevive a la fase crítica, en las siguientes 48 a 72 horas, se presentará una reabsorción gradual de los fluidos en los compartimentos extravasculares <sup>31</sup>.

### 1.8 Patogénesis del dengue grave

La severidad del dengue varía con la edad, etnia, genética, estado inmune y ciertas comorbilidades del individuo, asimismo, influyen las reinfecciones heterólogas <sup>32-36</sup>.

La co-circulación de varios serotipos DENV en una misma región geográfica, facilita la presencia de co-infecciones, las cuales han sido reportadas en frecuencias entre el 5% al 50%. Esta característica epidemiológica parece ser otro aspecto relacionado a la patogénesis de los casos graves, ya que existen evidencias que muestran que los individuos coinfectados desarrollan manifestaciones más severas, en comparación con los pacientes mono infectados <sup>7</sup>.

Otro posible factor asociado a la severidad de esta arbovirosis es el estrés oxidativo inducido por la infección DENV. En general, el estrés oxidativo puede ser consecuencia de una producción excesiva de pro-oxidantes o por pérdida de defensas antioxidantes <sup>37</sup>.

Las reacciones de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) con biomoléculas producen diferentes tipos de compuestos secundarios<sup>38, 39</sup>.

Entre estos se encuentran los hidroperóxidos lipídicos-LOOHs, productos que se consideran superiores a otros marcadores para evaluar la lipoperoxidación, incluso dentro del contexto de la infección DENV<sup>40, 41</sup>.

Otro marcador importante para evaluar los daños oxidativos son los carbonilos proteicos-PCOs, considerados modificaciones oxidativas proteicas. Los PCOs se consideran marcadores químicamente más estables, con presencia sérica más temprana y circulación sistémica por mayor tiempo, en comparación con los subproductos de la lipoperoxidación y con otros marcadores de estrés oxidativo<sup>40, 42</sup>.

Acerca de los mecanismos de defensa frente a ROS, existen diferentes enzimas endógenas con capacidad de degradación de estas especies, entre las que se encuentra la superóxido dismutasa-SOD<sup>43, 44</sup>. Esta enzima cataliza la reducción del radical anión superóxido a peróxido de hidrógeno; uno de sus cofactores es el manganeso-Mn. La MnSOD se localiza en la matriz mitocondrial<sup>43, 45</sup>, donde se considera como la primera línea de defensa debido a la importancia que tiene la fosforilación oxidativa en la generación de ROS. Es más, en ratones MnSOD knock-out se ha demostrado su importancia para mantener las funciones normales de las mitocondrias en los tejidos expuestos a condiciones altamente oxidantes, como cerebro, corazón e hígado<sup>46</sup>.

La isoenzima citosólica, SOD-1, puede ser localizada en el núcleo, en el espacio intermembrana mitocondrial, en lisosomas y en peroxisomas<sup>47</sup>. Aunque en ratones knock-out se ha demostrado que esta enzima no es esencial para la vida, su expresión tiene la capacidad de prevenir la disfunción endotelial<sup>48, 49</sup>.

### 1.9 Biomarcadores de estrés oxidativo

Un biomarcador se define como una característica que puede ser objetivamente medida y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, de procesos patológicos, de respuesta farmacológica o bioquímica a una intervención terapéutica/nutricional<sup>50, 51</sup>. La

Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos los define como indicador de eventos de señalización en sistemas biológicos o muestras <sup>52</sup>. En otras palabras, un marcador biológico se considera como una alteración molecular, bioquímica o celular que puede medirse en algún medio biológico. En consecuencia, con estos indicadores se podría realizar tanto la predicción de la respuesta a un tratamiento como el pronóstico de un cuadro clínico, en particular <sup>50</sup>.

Más allá de los resultados divergentes, la búsqueda de biomarcadores de estrés oxidativo y la comprensión de su comportamiento biológico, bioquímico y molecular siguen siendo objetivos de investigación, con una creciente atención en el campo biomédico.

### 1.9.1 *Carbonilos proteicos*

La oxidación de proteínas es un proceso normal en cualquier ser viviente, generando en ellos tanto efectos dañinos como benéficos. En estos sistemas fisiológicos, la oxidación de proteínas puede ocurrir por: (I) autooxidación espontánea de cisteinil-tioles; (II) interacción de proteínas con ROS y (III) reacciones, deliberadas y controladas, catalizadas por oxidasas.

Existen reportes de la asociación entre el incremento de la oxidación de proteínas con el envejecimiento, el estrés oxidativo y con ciertas enfermedades crónicas no transmisibles, tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, artritis reumatoide, aterosclerosis, diabetes, entre otras <sup>53</sup>.

En el contexto del estrés oxidativo, cualquier factor que ocasione este desequilibrio puede causar oxidación proteica, por ejemplo, el aumento en la producción de ROS o en la susceptibilidad de las proteínas para ser oxidadas, la disminución en la capacidad de respuesta óptima de las defensas antioxidantes o en la capacidad de reciclar las proteínas oxidadas <sup>54</sup>. El ataque por ROS, catalizado por metales, sobre las cadenas laterales de aminoácidos como arginina, lisina, treonina y prolina, da como resultado la formación de grupos carbonilos reactivos. Otras fuentes de este tipo de compuestos reactivos son la glicoxidación, la lipoxidación y el clivaje de proteínas por la vía de la  $\alpha$ -amidación <sup>53-55</sup>.

Entre estos compuestos se encuentran diversos grupos químicos funcionales que incluyen aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas y lactámicos <sup>56, 57</sup>. Dada su naturaleza electrofílica, los grupos carbonilos resultan ser especies altamente reactivas contra diferentes componentes celulares, de naturaleza nucleofílica, incluidas las proteínas <sup>57</sup>. Los carbonilos reactivos insaturados tienden a ser mucho más reactivos en comparación con las especies saturadas, en consecuencia, los aldehídos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados, los dialdehídos y los cetoaldehídos son los principales responsables de los daños a biomoléculas asociados a especies carbonilos reactivas <sup>58</sup>.

Los sitios blancos de estas especies reactivas resultan ser los aminoácidos con mayor abundancia en los sitios activos de las proteínas celulares, tales como son los residuos de arginina, cisteína y lisina <sup>59</sup>.

En general, se considera que los efectos biológicos inducidos por los carbonilos reactivos resultan ser similares a los inducidos por ROS, sin embargo, debido a su mayor estabilidad química, los carbonilos reactivos, sin carga, podrían reaccionar con biomoléculas localizadas lejos del sitio de producción del carbonilo reactivo <sup>57</sup>.

### 1.9.2 Superóxido dismutasa

Esta es la enzima responsable de catalizar la dismutación del radical anión superóxido a especies menos reactivas, tales como peróxido de hidrógeno y agua, pero siempre en presencia de un donador exógeno de electrones. En células de mamíferos, se reconocen tres isoformas para esta metaloenzima: (I) SOD que contienen Cu y Zn, Cu/ZnSOD; (II) SOD específicas para Fe o Mn, FeSOD, MnSOD o Fe/MnSOD y (III) SOD específicas para Ni, NiSOD <sup>60, 61</sup>, siendo la Cu/ZnSOD, SOD-1, la isoforma más abundante.

La presencia del átomo de cobre es esencial para la actividad catalítica de esta proteína dimérica, mientras que su estabilidad está regida por la presencia del átomo de Zn. Esta forma isoenzimática ha sido localizada tanto en el citosol como en el núcleo de la célula eucariótica <sup>60</sup>.

Adicional a esta, pero localizada en la mitocondria, se encuentra la isoforma MnSOD, SOD-2. Esta proteína tetramérica se encarga de dismutar los radicales anión superóxido producidos durante el transporte de electrones en este organelo <sup>61</sup>.

Cualquier alteración en la expresión o función de esta isoforma, única indispensable para la vida de los organismos aerobios, puede desencadenar múltiples consecuencias en las funciones mitocondriales por los efectos deletéreos del daño oxidativo, conllevando al desarrollo de diferentes condiciones patológicas, tales como el cáncer, diabetes tipo II e hipertensión <sup>62</sup>.

### *1.9.3 Hidroperóxidos lipídicos*

Las membranas celulares son sitios celulares blanco del ataque de ROS, sufriendo la desprotonación del metileno bis-alílico presente en sus ácidos grasos poli-insaturados, dando inicio a la lipoperoxidación. Otros lípidos de membrana que pueden ser blanco de estas especies reactivas son los glicolípidos y el colesterol. Como productos primarios de esta reacción en cadena se originan los hidroperóxidos lipídicos, LOOHs. Éstos pueden participar en múltiples reacciones, por ejemplo, reducción por glutatión peroxidasas o descomposición mediada por metales, disminuyendo o aumentando su capacidad tóxica, respectivamente <sup>63</sup>. La toxicidad de los LOOHs radica en su capacidad de producir radicales libres del tipo alcoxilo y de aldehídos, los cuales tienen la capacidad de inducir daño oxidativo irreversible en biomoléculas, siendo los aminofosfolípidos uno de los blancos principales para las modificaciones covalentes por LOOHs <sup>50</sup>.

### *1.9.4 Estudios sobre el papel del estrés oxidativo en la patogénesis del dengue*

Los estudios observacionales relacionados con el estrés oxidativo en el contexto del dengue fueron identificados mediante una búsqueda electrónica, basada en palabras clave, en diversas bases de datos (PubMed, EMBASE, ScienceDirect, Scopus, Biblioteca Virtual de la Salud, Dialnet, redalyc, SciELO, DOAJ), tal cual como se describe en una revisión sistemática recientemente publicada <sup>64</sup>. La aplicación de esta estrategia de búsqueda hasta noviembre de 2015 permitió identificar 19 artículos <sup>40, 41, 65-81</sup>.

En la mayoría de éstos se utilizaron adultos como única población objeto de estudio, excepto en tres referentes: Ray *et al.*<sup>81</sup>, Trairatvorakul, *et al.*<sup>78</sup> y Chareosirisuthigul, *et al.*<sup>77</sup>, los cuales trabajaron con niños  $\leq 15$  años.

En la investigación de Rojas y cols.<sup>76</sup>, junto con la población de adultos, se seleccionó un grupo de niños para evaluar los niveles plasmáticos de glutatión peroxidasa, GPx. Algo similar se presenta en el trabajo de Levy, *et al.*<sup>70</sup>, donde se reportan concentraciones plasmáticas del radical óxido nítrico, tanto en niños como en adultos con dengue.

En la mayoría de los artículos identificados<sup>41, 65, 67, 69, 71, 74, 79</sup>, se evaluaron marcadores de lipoperoxidación, siendo el más frecuente, el malondialdehído-MDA. Esto se reconoce como una debilidad debido a la posibilidad de subestimar la lipoperoxidación ya que existen lípidos que no producen MDA, también es posible sobrestimarla debido a la producción de MDA por la tromboxano sintasa de las plaquetas<sup>82</sup>. En estos siete estudios, las concentraciones séricas de MDA fueron significativamente mayores que las encontradas en controles sanos. La validez de estos hallazgos se ve limitada porque MDA es un marcador inespecífico e impreciso para evaluar estrés oxidativo *in vivo*<sup>83</sup>.

Adicional al MDA, Gil, *et al.*<sup>41, 69</sup> compararon los niveles plasmáticos de LOOHs entre los pacientes con dengue y controles sanos. A pesar de que estos dos referentes publican datos discordantes, LOOHs se consideran un biomarcador que supera las limitaciones descritas para MDA ya que éstos son los principales productos de la lipoperoxidación<sup>84</sup>.

A parte de lo anterior, se han reportado mayores niveles plasmáticos de PCOs en pacientes con fiebre hemorrágica por dengue o síndrome de choque por dengue en comparación con pacientes que cursan con fiebre dengue. En consecuencia, existen indicios de una posible asociación entre las concentraciones de este biomarcador de estrés oxidativo con la severidad del dengue en población adulta<sup>40, 74</sup>.

Por otra parte, Gil, *et al.*<sup>41, 69</sup>, Ray, *et al.*<sup>81</sup> y Rasool, *et al.*<sup>65</sup> evaluaron la actividad enzimática de SOD para evaluar la respuesta antioxidante en el dengue. En los cuatro estudios se reportó un incremento significativo en los niveles plasmáticos de SOD en pacientes infectados en comparación con controles sanos pareados. En ninguno de éstos

se diferenció la actividad de las isoformas de la enzima, aspecto relevante si se tiene en cuenta que MnSOD se considera la primera línea de defensa ante la generación mitocondrial de ROS <sup>43</sup>.

Chandrasena, *et al.* <sup>66</sup> reportan a la actividad de la paraoxonasa como el biomarcador de estrés oxidativo más sensible durante la infección DENV, por encima de otros marcadores del sistema de defensa antioxidante; en este estudio no se discriminan los casos según la severidad del dengue.

Adicionalmente, se identificaron dos artículos con resultados discordantes para la relación entre los niveles plasmáticos del radical óxido nítrico y la severidad del dengue, en adultos <sup>80</sup> y en niños <sup>78</sup>. Aun así, se ha reportado una mayor tasa de transporte de L-arginina en paciente con fiebre dengue o fiebre hemorrágica por dengue en comparación con adultos controles sanos <sup>68, 75</sup>.

### *1.10 Detección colorimétrica de biomarcadores de estrés oxidativo*

#### *1.10.1 Determinación de carbonilos proteicos por el método de referencia: reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina en medio ácido*

Regularmente, para la detección de los grupos carbonilos de los aldehídos o cetonas se utilizan varios métodos, entre los cuales encuentran los espectrofotométricos basados en la derivatización o reacción covalente del grupo carbonil con 2,4-DNPH, formando una base de Schiff inestable, lo cual resulta en la formación de un aducto estable de 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP, derivado hidrazona), como resultado de la reacción adición/eliminación favorecida por el pH bajo (pH = 3-5). A este pH, el oxígeno carbonilo se encuentra protonado haciendo más electrofílico al átomo de carbono carbonilo y, en consecuencia, se hace más propenso al ataque de la hidracina nucleofílica. El derivado hidrazona-DNP puede ser cuantificado espectrofotométricamente debido a que exhibe un espectro de absorción característico con una absorbancia máxima de 360-385 nm. Para la cuantificación de PCOs por este método se utiliza el coeficiente de extinción para 2,4-DNPH a 370 nm ( $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) <sup>85, 86</sup>.

Entre las principales limitaciones de este método de referencia se encuentran: (I) la complejidad del procedimiento por los múltiples pasos requeridos para la cuantificación del analito de interés, por ejemplo, precipitación de proteínas, procesos de lavados con una mezcla de solventes orgánicos polares y resuspensión de proteínas y (II) la posible interferencia de la 2,4-DNPH libre o sin derivatizar, dado que este reactivo puede absorber a 370 nm <sup>87</sup>.

#### *1.10.2 Determinación de carbonilos proteicos por el método alcalino; reacción con 2,4-dinitrofenilhidrazina en medio alcalino*

Con la finalidad de superar las limitaciones antes descritas, se ha propuesto un método alternativo para la determinación de PCOs en muestras biológicas. Este método alcalino, que no requiere los pasos de precipitación, lavado y resuspensión de proteínas propios del método tradicional, ha sido validado con muestras de proteínas con diferentes grados de oxidación. Para la cuantificación de PCOs por este método alcalino se utiliza el coeficiente de extinción para 2,4-DNPH a 450 nm ( $22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) <sup>87</sup>.

#### *1.10.3 Determinación de la actividad de superóxido dismutasa*

Para la determinación de la actividad de la SOD, se utiliza un indicador redox, sal azul de tetrazolio nitrado-NBT, para la detección de los radicales libres superóxidos generados por el sistema xantina oxidasa/hipoxantina. Una de las propiedades más importantes de este detector de radicales consiste en ser solubles e incoloras en su estado oxidado, pero insoluble y coloreadas en su estado reducido. La NBT es reducida a azul de formazán. El rango de absorbancia del azul de formazán corresponde a 440-460 nm. En este método descrito por Spitz and Oberley <sup>88</sup>, una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para exhibir una disminución del 50% del radical anión superóxido.

La adición de cianuro de potasio a este ensayo inhibe tanto Cu/ZnSOD citosólica como la Cu/ZnSOD extracelular, permitiendo la detección de la actividad de la MnSOD y con la diferencia entre el valor de absorbancia de la actividad de SOD total y el valor de absorbancia de la actividad de MnSOD se puede estimar la actividad de la Cu/ZnSOD <sup>89</sup>.

*1.10.4 Determinación de hidroperóxidos lipídicos por reacción redox con iones ferrosos*

La cuantificación de LOOHs radica en reacciones redox con iones ferrosos en solución ácida. Debido a su inestabilidad química, estos analitos reaccionan con los iones ferrosos para producir iones férricos, los cuales pueden ser detectados mediante tiocianato de amonio, como el cromógeno, por la formación del ion complejo monotiocianato férrico, de color rojo violeta. Este complejo muestra una fuerte absorción a 500-510 nm <sup>90</sup>.

Se recomienda realizar el ensayo en cloroformo para evitar la interferencia de los iones férricos y de peróxido de hidrógeno que pudieran estar presentes en la muestra, para así evitar la sobrestimación de los LOOHs <sup>91</sup>.

## **CAPÍTULO 2**

## 2. Planteamiento del problema de investigación y justificación del estudio

La Organización Mundial de la Salud-OMS considera al dengue una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas <sup>92</sup>, presente en más de 100 países, con reportes de 50 a 100 millones de casos nuevos y 20 000 muertes cada año <sup>93-95</sup>.

Estas cifras presentan una tendencia al aumento debido a la expansión geográfica del binomio virus-vector <sup>96</sup>; situación presente en América donde se ha observado un incremento sostenido en la incidencia de casos <sup>97</sup>, con casi todos sus países presentando patrones hiperendémicos <sup>98</sup> y con la notificación de casos en áreas donde antes no existía transmisión autóctona del virus <sup>2, 93, 94</sup>.

En el ámbito mundial, se desconoce la carga total de esta arbovirosis <sup>98</sup>, pero es la enfermedad tropical desatendida con mayor porcentaje de cambio en los años de vida ajustados por discapacidad-AVAD, durante el período 1990 a 2016 <sup>99</sup>, y con promedios nacionales entre 22,1 a 658 AVAD por millón de habitantes por año, en diferentes países <sup>100-106</sup>, con las mayores cifras de este indicador sintético de salud en las regiones de Asia, de Oceanía y de América Latina y el Caribe <sup>107</sup>.

Cierto es que existen discrepancias en los criterios de definición de casos en los países de América <sup>108</sup>, sin embargo, de las seis subregiones de América, en los últimos tres años, la subregión andina ha reportado hasta el 25,0% de los casos de dengue y entre el 15,8% al 46,5% de los casos de dengue grave reportados en el continente, siendo Colombia y Perú, los dos países andinos que reportaron las mayores tasas de incidencia de casos graves y de letalidad asociada, durante este trienio <sup>109-111</sup>.

Si bien el patrón epidemiológico del dengue, como el anteriormente descrito, puede estar relacionado con la existencia de debilidades y dificultades que afectan la efectividad de la implementación de la estrategia de gestión integrada-EGI-Dengue en estos dos países andinos <sup>112</sup>, también hay que señalar la posible influencia del vigente sistema de clasificación de casos de dengue, dado que en su diseño se pensó en mejorar el reconocimiento clínico y la vigilancia de los cuadros clínicos de mayor severidad <sup>113</sup>.

Al respecto cabe mencionar que, desde el 2009, la OMS promulgó las nuevas definiciones de casos, reportándose casos como dengue sin signos de alarma, con signos de alarma y dengue grave<sup>31</sup>. Estos signos de alarma han sido propuestos como criterios pronósticos de dengue grave<sup>31, 114, 115</sup>.

Aunque el actual sistema de clasificación de casos (OMS-2009) supera, en parte, las limitaciones conceptuales y prácticas identificadas en el anterior esquema<sup>116-121</sup>, éste pudiera permitir interpretaciones arbitrarias en la severidad del sangrado por parte del personal médico como consecuencia del uso de criterios de definición menos rigurosos, por la ausencia de parámetros cuantitativos y por su independencia de las pruebas de laboratorio en la identificación de casos graves<sup>122-125</sup>.

El impacto de estas debilidades podría verse limitado en el caso de poder identificar biomarcadores que permitan la detección temprana de aquellos pacientes con mayor riesgo de severidad, con independencia de características sociodemográficas o virológicas. Es oportuno ahora destacar que con la disponibilidad de este tipo de indicadores pronósticos se podría brindar un cuidado médico más específico y oportuno, que resulta fundamental para mejorar el pronóstico clínico de los pacientes. Es más, en este posible escenario, también es coherente pensar en una reducción de la letalidad y del impacto económico, asociados a esta enfermedad tropical.

En este punto, es interesante examinar el problema de investigación desde las relaciones conceptuales entre dengue, disfunción endotelial y estrés oxidativo. El rasgo más característico de los casos de dengue grave y el mejor indicador de severidad es la pérdida plasmática. Esta alteración de la permeabilidad vascular, que se hace presente en la fase de defervescencia del dengue, resulta más por disfunción endotelial que por destrucción estructural de las células endoteliales<sup>126-129</sup>. Actualmente, se ha reportado la posible asociación entre la disfunción endotelial y la severidad del dengue en niños y adultos<sup>130</sup>.

Existen muchas referencias que explican la relación entre disfunción endotelial y estrés oxidativo<sup>131-141</sup>. Por lo general, se entiende como disfunción endotelial a un desequilibrio en la biodisponibilidad de diversas sustancias activas, de origen endotelial, que predispone a diversos procesos como vasoconstricción, inflamación e incremento de la permeabilidad

vascular. Su manifestación más temprana es la disminución de la dilatación dependiente del radical óxido nítrico-ON<sup>•</sup>, causada por una pérdida de su bioactividad <sup>142, 143</sup>.

Una de las causas asociadas a esta reducción es la degradación acelerada por las ROS, en consecuencia, la deficiencia de ON<sup>•</sup> se considera una causa importante de estrés oxidativo <sup>134, 138, 140</sup>, el cual se define como un desbalance en el equilibrio entre el estatus pro-oxidante/antioxidante en los sistemas celulares, terminando en daño celular por lipoperoxidación o por oxidación de otras biomoléculas <sup>39</sup>.

El estrés oxidativo participa como determinante de la homeostasis vascular <sup>37, 45, 144, 145</sup>, y en la patogénesis de diversas enfermedades infecciosas, tales como: hepatitis C crónica <sup>146</sup>, encefalitis japonesa <sup>147</sup>, leptospirosis <sup>148</sup>, enfermedad respiratoria asociada a virus sincitial respiratorio <sup>149</sup>, malaria <sup>150</sup>, cardiomiopatía chagásica <sup>151</sup>, esquistosomiasis <sup>152</sup>, sepsis <sup>153</sup>, encefalitis aguda asociada a virus herpes simplex -1, panencefalitis esclerosante subaguda <sup>154</sup> y dengue <sup>41</sup>.

Para este último ejemplo, Soundravally, *et al.*, proponen que el estrés oxidativo inducido por la infección DENV tendría la capacidad de activar la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, incluido TNF- $\alpha$ , participando, en conjunto, en la patogénesis del dengue grave <sup>67</sup>. Esto es coherente con los reportes que indican que las cepas DENV virulentas se caracterizan por una alta tasa de replicación y una fuerte influencia en la expresión génica de múltiples citoquinas pro-inflamatorias en el hospedador <sup>155-158</sup>.

Si bien es cierto que, en humanos, se ha demostrado que los niveles de ciertos marcadores de estrés oxidativo parecen estar asociados con la infección DENV, es relevante señalar que estos estudios fueron en su mayoría realizados solamente en población adulta, con limitaciones derivadas del diseño metodológico elegido, del tamaño de muestra, de la falta de control de posibles fuentes de sesgos (concentraciones séricas del biomarcador sin ajustar) y del manejo estadístico de los datos. Adicional a esto, todos estos estudios epidemiológicos utilizaron el sistema OMS-1997 para la clasificación de los casos de dengue en su población de estudio <sup>40, 41, 65-81</sup>. Hasta el momento, no se tiene conocimiento de la evaluación pronóstica de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con dengue dentro del contexto de definición de casos OMS-2009.

A pesar de considerarse a los LOOHs y a los PCOs, como los marcadores más estables o específicos para evaluar la lipoperoxidación<sup>84</sup> y la modificación oxidativa proteica<sup>159</sup>, respectivamente, son pocos los estudios que reportan el comportamiento de estos productos de la oxidación de lípidos<sup>41, 69</sup> y de la oxidación de proteínas<sup>40, 74</sup> en pacientes con dengue. Ninguno de los dos estudios que determinó las concentraciones de LOOHs, diferenció estos niveles séricos según la severidad del dengue. Solo en uno de los estudios con PCOs se realizó dicha diferenciación<sup>40</sup>.

Adicional a lo anterior, es interesante mencionar que cada biomarcador (LOOHs o PCOs) fue evaluado por un mismo equipo de investigadores y en la misma cantidad de individuos analizados, lo cual sugiere la posibilidad de que sean estudios duplicados.

En cuanto a la superóxido dismutasa, existen cuatro estudios que reportan sus niveles en casos de dengue<sup>41, 69, 81</sup>. Solo uno de estos estudios reporta concentraciones de esta enzima antioxidante en cuanto a las tres presentaciones clínicas del dengue indicadas por el sistema de clasificación OMS-1997<sup>81</sup>. Aunque se reconoce la importancia del TNF- $\alpha$  en la patogénesis del dengue<sup>160-162</sup> y su capacidad para inducir, de manera selectiva, tanto *in vivo* como *in vitro*, la expresión del ARNm de la MnSOD<sup>163</sup>, ninguno de estos cuatro referentes estudia los niveles séricos de esta metaloenzima en pacientes con dengue.

En macrófagos murinos, se ha demostrado que la sobreexpresión de la isoenzima citosólica de la SOD (Cu/ZnSOD, SOD-1) aumenta la liberación de TNF- $\alpha$  y metaloproteinasas tipo MMP-2 y MMP-9<sup>164</sup>. Destaca que la MMP-2 ha sido fuertemente asociada con la pérdida plasmática en adultos infectados con DENV<sup>165</sup>

De todas las circunstancias descritas, se deriva el interés de estudiar el comportamiento de las concentraciones séricas de PCOs, LOOHs, MnSOD, Cu/ZnSOD y SOD total, durante la fase crítica del dengue, en pro de su evaluación como potenciales indicadores pronósticos de severidad en pacientes con diagnóstico de dengue.

En esencia, el propósito de la presente investigación es coherente con las actuales prioridades de investigación descritas en la literatura<sup>166</sup> y en los objetivos de desarrollo sostenible<sup>167</sup>.

2.1 *Formulación del problema*

¿Cuál es la capacidad pronóstica de severidad de los niveles séricos de carbonilos proteicos, hidroperóxidos lipídicos y superóxido dismutasa mitocondrial, citosólica y total, en pacientes con dengue?

## **CAPÍTULO 3**

### 3. Hipótesis y objetivos de investigación

#### 3.1 *Hipótesis de investigación*

Durante la fase de defervescencia, los puntos de corte óptimos de los niveles séricos de carbonilos proteicos, hidroperóxidos lipídicos o superóxido dismutasa mitocondrial, citosólica y total, permiten pronosticar la evolución a dengue grave, tanto en niños como en adultos

#### 3.2 *Objetivos de investigación*

##### 3.2.1 *Objetivo general*

Evaluar la capacidad de los niveles séricos de carbonilos proteicos, hidroperóxidos lipídicos, superóxido dismutasa mitocondrial, citosólica y total, como potenciales indicadores pronósticos de severidad en pacientes cursando la fase de defervescencia del dengue

##### 3.2.2 *Objetivos específicos*

Caracterizar la población objeto de estudio de acuerdo con variables sociodemográficas, clínicas, de laboratorio y virológicas de interés

Analizar el comportamiento de los niveles séricos de carbonilos proteicos, hidroperóxidos lipídicos y superóxido dismutasa mitocondrial, citosólica y total, en la población objeto de estudio

Estimar el punto de corte óptimo y el área bajo la curva de cada biomarcador evaluado y de sus posibles combinaciones, en pacientes con dengue grave y dengue con signos de alarma

Examinar el potencial pronóstico para la severidad del dengue de los biomarcadores evaluados, mediante los análisis de regresión logística binaria y probit binario

Determinar la calibración y discriminación del mejor modelo pronóstico estimado, mediante la prueba Hosmer-Lemeshow y el área bajo la curva ROC, respectivamente

Determinar la transportabilidad del mejor modelo pronóstico en un nuevo grupo de pacientes con dengue grave y con signos de alarma (grupo de validación externa), mediante la prueba de Hosmer-Lemeshow y el área bajo la curva ROC, respectivamente

## **CAPÍTULO 4**

## 4. Materiales y métodos

### 4.1 *Diseño del estudio*

Se realizó un estudio con diseño de casos y controles, el cual se considera uno de los mejores diseños para realizar estudios pronósticos <sup>168</sup>.

#### 4.1.1 *Definición de casos y controles*

Se consideraron como casos a los pacientes que presentaron: (I) cuadro febril entre el cuarto y sexto día de evolución, acompañado con dos o más de los siguientes síntomas: cefalea, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, dolor generalizado, exantema, anorexia, náuseas, vómitos, petequias, sangrado de mucosas y leucopenia; (II) resultado positivo para NS1-DENV o IgM anti-dengue y (III) requerimiento de atención especializada en unidad de cuidados intensivos-UCI, debido a la presencia de las manifestaciones graves de la enfermedad, siguiendo el esquema de clasificación OMS-2009 <sup>31</sup>. Varios estudios han utilizado el requerimiento de atención especializada en UCI para definir la severidad clínica del dengue <sup>169-171</sup>.

Las manifestaciones graves consideradas fueron:

- Extravasación grave de plasma que conduce a síndrome de choque por dengue o acúmulo de líquidos con dificultad respiratoria (distrés respiratorio). Como signos de choque por dengue se consideraron: hipotensión arterial, presión arterial diferencial < 20 mm Hg, presión arterial media < 70 mm Hg, extremidades frías y cianosis, pulso rápido, fino y llenado capilar lento.
- Hemorragias intensas: paciente con enfermedad febril aguda que presenta hemorragias intensas con compromiso hemodinámico.
- Daño orgánico grave: paciente con enfermedad febril aguda y signos clínicos o de laboratorio de daño grave de órganos como miocarditis, encefalitis, hepatitis (transaminasas mayores de 1 000), colecistitis alitiásica, insuficiencia renal aguda y afección de otros órganos <sup>31</sup>.

Para la selección de los controles, se consideraron a los pacientes: (I) con cuadro febril entre el cuarto y sexto día de evolución, acompañado con dos o más de los siguientes síntomas: cefalea, dolor retro-ocular, mialgias, artralgias, dolor generalizado, exantema, anorexia, náuseas, vómitos, petequias, sangrado de mucosas y leucopenia; (II) con resultado positivo para NS1-DENV o IgM anti-dengue; (III) con presencia de uno o más de los signos de alarma descritos en el actual sistema de clasificación de casos<sup>31</sup> y (IV) que no requirieron atención especializada en UCI, por no desarrollar ninguna de las manifestaciones graves antes descritas.

Se excluyeron aquellos pacientes con registro de comorbilidades como: enfermedades cardiovasculares graves, trastornos hematopoyéticos, metabólicos, pulmonares, hepáticos o renales, enfermedades autoinmunes, desnutrición, embarazos, neoplasias y enfermedades infecciosas concomitantes.

#### 4.1.2 Tamaño de muestra

Para modelos de regresión logística, Vittinghoff, *et al.*<sup>172</sup>, reportaron que el rango entre 5 a 9 eventos por cada variable predictora-EVP es comparable con el rango entre 10 a 16 EVP, cuando se analizan predictores binarios en diversos escenarios. En coherencia con lo anterior, para la identificación del mejor modelo pronóstico, se probaron las siguientes combinaciones de variables predictoras:

- Carbonilos proteicos (indicador de oxidación proteica), hidroperóxidos lipídicos (indicador de oxidación de lípidos) y superóxido dismutasa mitocondrial (indicador del sistema de defensa antioxidante)
- Carbonilos proteicos (indicador de oxidación proteica), hidroperóxidos lipídicos (indicador de oxidación de lípidos) y superóxido dismutasa citosólica (indicador del sistema de defensa antioxidante)
- Carbonilos proteicos (indicador de oxidación proteica), hidroperóxidos lipídicos (indicador de oxidación de lípidos) y superóxido dismutasa total (indicador del sistema de defensa antioxidante)

Por lo tanto, se seleccionaron como casos a 20 pacientes con dengue grave y, para cumplir con una relación 1:2, se seleccionaron como controles a 40 pacientes con dengue con signos de alarma.

#### 4.1.3 Población objeto de estudio

##### 4.1.3.1 Grupo de derivación: pacientes pediátricos

La evaluación de la capacidad pronóstica de los biomarcadores de estrés oxidativos fue realizada en muestras de suero obtenidas de pacientes, menores de 15 años, atendidos en la red distrital de hospitales de Barranquilla-Colombia, durante el período comprendido entre enero de 2014 hasta enero de 2016.

##### 4.1.3.2 Grupo de validación externa: pacientes pediátricos y adultos

De igual manera, la evaluación de la capacidad pronóstica de los biomarcadores de interés fue realizada en muestras de suero, obtenidas de pacientes de todas las edades, remitidas al Laboratorio de Metaxénicas Virales del Instituto Nacional de Salud del Perú, durante el período comprendido entre enero y febrero de 2018.

Con la finalidad de complementar la evaluación del comportamiento de los marcadores biológicos, se incluyeron:

- Veinte (20) muestras de suero obtenidas de pacientes con dengue sin signos de alarma
- Veinte (20) muestras de suero obtenidas de pacientes con diagnóstico serológico o molecular de infección por virus zika
- Diez (10) muestras de suero obtenidas de pacientes con evidencias serológicas o moleculares de la presencia de dengue y otro arbovirus (virus zika o virus de fiebre amarilla). En el Laboratorio de Metaxénicas Virales del INS-Perú, estas muestras fueron categorizadas como reacciones cruzadas para dengue.

Todas las muestras fueron conservadas, de manera sistemática, entre -20 °C a -80 °C, evitando la auto-oxidación de los biomarcadores <sup>173</sup>.

#### 4.1.4 *Recolección de datos*

Se revisaron las historias clínicas de los 60 pacientes pediátricos, identificados como grupo de derivación, para así registrar su información sociodemográfica (edad, sexo y procedencia) datos clínicos (días de evolución, tiempo de estancia hospitalaria, tiempo de estancia en UCI, signos y síntomas asociados) y de laboratorio de interés (nivel de hemoglobina, valores de hematocrito, conteo de plaquetas, presencia de neutropenia, presencia de leucopenia, presencia de linfopenia, presencia de monocitosis, presencia de linfocitosis, presencia de basofilia, presencia de neutrofilia, presencia de niveles alterados de transaminasas y presencia de niveles alterados de BUN y creatinina).

Para el caso de los 110 pacientes del Perú, se revisaron las fichas de notificación epidemiológica para el registro de las variables de interés, tales como: edad, sexo, procedencia, días de evolución, sintomatología asociada, detección cualitativa de NS1-DENV en suero, presencia de trombocitopenia e incremento de hematocrito.

#### 4.1.5 *Detección cualitativa de NS1-DENV (grupo de derivación)*

Para la detección cualitativa de NS1-DENV en los sueros de los pacientes pediátricos del grupo de derivación, se realizó una prueba inmunocromatográfica de un paso (SD Bioline Dengue NS1 Ag, Kyong, South Korea®), bajo las condiciones especificadas por la casa comercial.

Brevemente, en una tira de nitrocelulosa sensibilizada con anticuerpo monoclonal anti-NS1 DENV en la región de la banda de prueba, el conjugado formado por la muestra de suero del paciente y los anticuerpos monoclonal anti-NS1 DENV con oro coloidal, migra a lo largo de la membrana cromatográfica hacia la región de prueba y, en el caso de estar presente el antígeno NS1-DENV en la muestra del paciente, se forma una banda coloreada visible que representa el complejo anticuerpo monoclonal-NS1-anticuerpo monoclonal/oro coloidal, indicando un resultado positivo.

#### 4.1.6 *Detección semicuantitativa de IgM anti-DENV e IgG anti-DENV (grupo de derivación)*

La detección de IgM anti-DENV e IgG anti-DENV, en los sueros de los pacientes pediátricos del grupo de derivación, fue realizada mediante dos enzoinmunoensayos (ELISA, Vircell,

España, Referencias M1018 y G1018, respectivamente), bajo las condiciones especificadas por la casa comercial.

La detección semicuantitativa de IgM anti-DENV está basada en la captura de IgM anti-DENV por anticuerpos anti-IgM unidos a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas son eliminadas en el proceso de lavado. Luego, el antígeno conjugado con peroxidasa reacciona con las IgM anti-DENV capturadas; el conjugado no unido también es eliminado por el proceso de lavado. El antígeno unido reacciona con el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina-TMB, para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

Para la interpretación de resultados, un índice de anticuerpos >11,0 se consideró positivo, con interpretación de presencia de anticuerpos IgM anti-DENV en la muestra de suero analizada; mientras que índices de anticuerpos inferiores a 9,0 fueron considerados negativos, con interpretación de ausencia de anticuerpos IgM anti-DENV en la muestra de suero analizada. Un índice de anticuerpos entre 9,0 y 11,0 se interpretó como muestra de resultado dudoso.

Para la detección de IgG anti-DENV se utiliza la reacción del suero del paciente con el antígeno unido a la superficie de poliestireno de los micropocillos. De igual forma, las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. Posteriormente, la inmunoglobulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo capturado; lo que no se une es eliminado por los lavados. En cambio, el conjugado unido reacciona con el sustrato TMB, para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

Para la interpretación de resultados, un índice de anticuerpos >11,0 se consideró positivo, con interpretación de presencia de anticuerpos IgG anti-DENV en la muestra de suero analizada; mientras que índices de anticuerpos inferiores a 9,0 fueron considerados negativos, con interpretación de ausencia de anticuerpos IgG anti-DENV en la muestra de suero analizada. Un índice de anticuerpos entre 9,0 y 11,0 se interpretó como muestra de resultado dudoso. Como evidencia serológica sugestiva de infección secundaria de dengue, se utilizó la relación  $IgM/IgG < 1,8$  <sup>174-176</sup>.

Para todas las determinaciones semicuantitativas de anticuerpos anti-DENV se utilizó un espectrofotómetro bicromático (Stat Fax® 303/PLUS, Awareness Technology, Inc. Florida, Estados Unidos), con filtro de lectura de 450 nm y de referencia de 620 nm.

#### *4.1.7 Detección semicuantitativa de IgM anti-DENV e IgG anti-DENV (grupo de validación externa)*

La detección de IgM anti-DENV e IgG anti-DENV, en los sueros de los pacientes del grupo de validación externa, fue realizada mediante dos enzimoimmunoensayos de captura (TARIKI-Dengue IgM, TARIKI-Dengue IgG, INS-Perú), bajo las condiciones especificadas por el Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud del Perú.

Con la utilización de placas de ELISA sensibilizadas con anticuerpos anti IgM humano o con anticuerpos anti-IgG humano, se capturaron los analitos de interés (IgM anti-DENV o IgG anti-DENV, respectivamente) en el suero del paciente, durante una incubación a 37 °C por una hora. Luego, se adicionaron volúmenes iguales de una solución de antígeno (DENV-1 cepa Hawái; DENV-2 cepa Nueva Guinea, DENV-3 cepa H87 y DENV-4 cepa H-241) y de una solución de conjugado con peroxidasa de rábano picante-HRP. A continuación, se incubaron los micropocillos a 37 °C por una hora. Posterior a cinco lavados, se agregó el cromógeno, constituido por el sustrato TMB/peróxido de hidrógeno, y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se adicionó la solución de parada, constituida por ácido sulfúrico 2 N.

Las muestras de suero con densidades ópticas inferiores al valor de corte se consideraron no reactivas/negativas a presencia de anticuerpos IgM anti-DENV o IgG anti-DENV, según fuera el caso. Las muestras de suero con densidades ópticas superiores al valor de corte se consideraron reactivas/positivas a presencia de anticuerpos IgM anti-DENV o IgG anti-DENV, según fuera el caso. Todas las muestras de suero son densidades ópticas cercanas al valor de corte ( $\pm 0,020$ ) fueron consideradas indeterminadas.

Para todas las determinaciones semicuantitativas de anticuerpos anti-DENV se utilizó un lector de microplacas para absorbancias (PHOmO, Autobio Co., LTD), con filtro de lectura de 450 nm y de referencia de 620 nm.

#### 4.1.8 *Detección semicuantitativa de IgM anti-virus de la fiebre amarilla-FAV (grupo de validación externa)*

La detección de IgM anti-FAV, en los sueros de los pacientes del grupo de validación externa, fue realizada mediante el enzimoimmunoensayo de captura (TARIKI-Fiebre Amarilla IgM, INS-Perú), bajo las condiciones especificadas por el Centro Nacional de Productos Biológicos del Instituto Nacional de Salud del Perú.

Estos anticuerpos fueron capturados por los anticuerpos anti-IgM humana que sensibilizan la superficie interna de poliestireno de los micropocillos. El antígeno concentrado (cepa INS 287-78) del FAV<sup>177</sup> y el conjugado de HRP concentrado se diluyeron hasta diluciones de trabajo (1/10 para el antígeno y 1/100 para el conjugado). Luego, se adicionó una mezcla de volúmenes iguales de antígeno diluido y conjugado diluido para la formación de complejos antígeno-conjugado. El suero residual fue eliminado por el proceso de lavado y se adicionaron los complejos formados. Después de incubar a 37 °C por una hora, se realizó un nuevo proceso de lavado. A continuación, se adicionó un sistema de sustrato incoloro, constituido por TMB/peróxido de hidrógeno y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se adicionó la solución de parada, constituida por ácido sulfúrico 2 N.

Para la interpretación de resultados, un índice de reactividad >1,1 se consideró positivo, con interpretación de presencia de anticuerpos IgM anti-FAV en la muestra de suero analizada; mientras que índices de anticuerpos inferiores a 0,9 fueron considerados negativos, con interpretación de ausencia de anticuerpos IgM anti-FAV en la muestra de suero analizada. Un índice de anticuerpos entre 0,9 y 1,1 se interpretó como muestra de resultado indeterminado.

Para todas las determinaciones semicuantitativas de anticuerpos anti-FAV se utilizó un lector de microplacas de para absorbancias (PHOMo, Autobio Co., LTD), con filtro de lectura de 450 nm y de referencia de 620 nm.

#### 4.1.9 *Extracción y purificación de ARN viral (grupo de validación externa)*

Para la extracción y purificación automática y simultánea de ARN viral, a partir de las muestras de suero de los pacientes del grupo de validación externa, se utilizó la tecnología

de partículas magnéticas del QIAasymphony® Virus/Bacteria Mini Kit (Quiagen, Crawley, UK) en combinación con el instrumento QIAasymphony® SP, siguiendo las instrucciones del fabricante, antes del análisis de reacción en cadena polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real, dado que la tecnología de partículas magnéticas permite purificar ácidos nucleicos de alta calidad que carecen de proteínas, nucleasas y otras impurezas.

El procedimiento de purificación automática de ARN viral comprende cuatro pasos: reacción del tampón de lisis, unión del ARN viral a las partículas magnéticas, lavado y elución.

En cada proceso de extracción y purificación, se utilizaron cuatro controles positivos (DENV-1 cepa West Pac74; DENV-2 cepa S16803; DENV-3 cepa CH53489; DENV-4 cepa TUP 360; dilución de trabajo 1/100) y un control negativo (agua ultrapura de grado RCP).

#### *4.1.10 Detección cualitativa y diferenciación de ARN-DENV, ARN-ZIKV, ARN-CHIKV y ARN-FAV (grupo de validación externa)*

La identificación simultánea de virus del dengue, virus zika y virus chikungunya, en muestras de suero de pacientes del grupo de validación externa, se realizó con un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa en tiempo real (Trioplex, CDC, Atlanta, USA) <sup>178</sup>.

En esta prueba molecular, se utilizaron sondas de hidrolisis tipo Taqman® de cebadores y doble etiquetado para la detección cualitativa *in vitro* del ARN de DENV, ZIKV y CHIKV en muestras biológicas humanas. En el caso de la sonda específica para DENV utilizada en la prueba RT-PCR Trioplex en tiempo real, el fluoróforo para su extremo 5' corresponde al colorante fluoresceína/FAM™ (Abs max 494 nm; EM max 518 nm) y el colorante para su extremo 3' es BHQ-1® (480-580 nm). Para la sonda específica para CHIKV, el fotocromo reportero corresponde al colorante fluorescente hexaclaro-fluoresceína/HEX™ (Abs max 535 nm; EM max 556 nm), el cual se inhibe por BHQ-1® (480-580 nm) en su terminal 3'; para la sonda específica para ZIKV, la señal del colorante fluorescente CAL Fluor Red 610 (Abs max 590 nm; EM max 610 nm) en el terminal 5' se inhibe por BHQ-2® (550-650 nm) en su terminal 3' <sup>178</sup>.

Para la detección molecular del ARN-DENV se utilizaron VDEN-F, VDEN-R1, VDENV-R2 y VDENV-P (SO3684), con blanco en la región 5'-UTR del ARN-DENV. Para el ARN-CHIKV, se utilizaron VCHIK-F, VCHIK-R y VCHIK-P (SO3685), con blanco en nSP1. Y en el caso del ARN-ZIKV, se utilizaron VZIK-F, VZIK-R y VZIK-P, con blanco en el gen de la envoltura de ZIKV (Material Suplementario, Anexo 1). Como condiciones de amplificación se utilizaron tres etapas: (I) 30 minutos a 50 °C, 1 rep; (II) 2 minutos a 95 °C, 1 rep; (IIIa) 15 segundos a 95 °C, 45 ciclos y (IIIb) 1 minuto a 60 °C <sup>178</sup>.

Los controles positivos para los sets de cebadores y sonda específicos para cada uno de los tres arbovirus y el control de espécimen humano-HSC, correspondiente a material de células humanas cultivado no infeccioso, utilizado como control de extracción y como control positivo para el set de cebador y sonda de RNasa P-RP, fueron proporcionados por el fabricante (CDC; catálogo #KT0167) <sup>178</sup>. Toda muestra de suero con valor de Ct inferior a 35 fue considerada positiva para la presencia del respectivo arbovirus evaluado (Material Suplementario, Anexo 2).

Para la detección molecular de FAV, se tomaron 5,0 µL de ARN viral extraído y purificado, para someterlo a RT-PCT en tiempo real en las siguientes condiciones: 12,5 µL de RT-PCR master mix (1x), 0,5 µL de oligonucleótidos (10 µM) (Material Suplementario, Anexo 1), 5,0 µL de sulfato de magnesio (5 mM), 0,5 µL de enzima transcriptasa/platinum Taq mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Como condiciones de amplificación se utilizaron: 30 minutos a 50 °C, 1 rep; 2 minutos a 94 °C, 1 rep; 15 segundos a 94 °C, 40 rep; 30 segundos a 55 °C, 40 rep; 2 minutos a 72 °C, 40 rep; 10 minutos a 72 °C, 1 rep. Toda muestra de suero con valor de Ct inferior a 35 fue considerada positiva para la presencia de este arbovirus.

#### 4.1.11 Serotipificación de ARN-DENV (grupo de validación externa)

Para la identificación del serotipo DENV en las muestras de suero del grupo de validación externa que resultaron positivas para ARN-DENV, se utilizó 10,0 µL del ARN viral, extraído y purificado, empleado el protocolo descrito por Lanciotti, *et al.* <sup>179</sup>, con los oligonucleótidos descritos en el Anexo 1 (Material Suplementario). Luego de la transcripción reversa de 10 minutos a 50 °C, siguieron 45 ciclos de amplificación. Toda muestra de suero con valor de

Ct inferior a 35 fue considerada positiva para la presencia del respectivo serotipo DENV evaluado (Material Suplementario, Anexo 3). Todas las reacciones de PCR en tiempo real fueron procesadas con un Rotor-Gene Q real time PCR cycler (Qiagen, Hilden. Alemania).

#### 4.1.12 Determinación colorimétrica de los niveles séricos de carbonilos proteicos

Para la determinación cuantitativa *in vitro* de carbonilos proteicos (PCOs) en muestras de suero, se utilizaron los materiales y reactivos del Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit (catalogo no. 10005020; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), cumpliendo con las especificaciones del fabricante (método convencional).

Brevemente, se realizó una mezcla de 200  $\mu$ L de la muestra de suero (dilución de trabajo 1:10) con 800  $\mu$ L de 2,4-DNPH en un tubo eppendorf-muestra y una mezcla de 200  $\mu$ L de la muestra de suero (dilución de trabajo 1:10) con 800  $\mu$ L de HCl 2,5 M en un tubo eppendorf-control. Estos tubos fueron incubados por una hora a temperatura ambiente en la oscuridad, con agitación cada 15 minutos durante la incubación. Luego, se adicionó 1 mL de ácido tricloroacético-TCA al 20% y se incubó por cinco minutos, en frío. Seguido, se centrifugó a 10 000 x g por 10 minutos a 4 °C. A continuación, se descargó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de TCA al 10%. Se colocó en hielo por cinco minutos y, nuevamente, se centrifugó a 10 000 x g por 10 minutos a 4 °C. Se descargó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de una mezcla de etanol/acetato de etilo (1:1); nuevamente, se centrifugó a 10 000 x g por 10 minutos a 4 °C. Este paso se repitió dos veces más. Se resuspendió el pellet en 500  $\mu$ L de hidrocloreuro de guanidina. Seguido de una centrifugación a 10 000 x g por 10 minutos a 4 °C, se transfirieron 220  $\mu$ L del sobrenadante del tubo de eppendorf-muestra y del tubo de eppendorf-control a su respectivo pocillo en una microplaca.

También, se realizó la cuantificación de PCOs utilizando el método alcalino, el cual consiste en una neutralización con NaOH 6 M posterior al paso de derivatización con 2,4-DNPH para cambiar la absorbancia de la hidrazona conjugada con proteína a 450 nm<sup>87</sup>. A diferencia del método convencional, en este método alcalino no se requiere realizar los pasos de precipitación, lavado y resuspensión de proteínas, antes descritos.

En resumen, se realizó una mezcla, a volúmenes iguales, entre 2,4-DNPH y la muestra de suero (dilución de trabajo 1:10). Como blanco, se realizó la mezcla, a volúmenes iguales, entre 2,4-DNPH y buffer fosfato salino (pH=7,2). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, en la oscuridad, se adicionaron 200  $\mu$ L de NaOH 6 M. Luego, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente <sup>87</sup>.

Para la comparación entre el método convencional y el método alcalino, se realizaron las lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro bicromático (Stat Fax® 303/PLUS, Awareness Technology, Inc. Florida, Estados Unidos), con filtro de lectura de 450 nm y de referencia de 620 nm. En cambio, para la determinación de los niveles séricos de PCOs en las muestras de suero de los pacientes, se realizaron las lecturas en un lector de microplacas para absorbancias (PHOmO, Autobio Co., LTD), con filtro de lectura de 450 nm y de referencia de 620 nm.

Los niveles séricos de PCOs fueron ajustados con la concentración de proteínas presente en cada muestra (nmoles de PCOs/mg de proteínas). La concentración de proteínas en las muestras de suero analizadas, fue estimada utilizando una curva de calibración (0,2-2,0 mg/mL) de albumina sérica bovina disuelta en hidrocloreuro de guanidina, en las condiciones sugeridas por el fabricante.

#### *4.1.13 Determinación colorimétrica de los niveles séricos de superóxido dismutasa mitocondrial, citosólica y total*

Para la determinación cuantitativa *in vitro* de la superóxido dismutasa (SOD) en suero, se utilizaron los materiales y reactivos del Superoxide Dismutase Assay Kit (catalogo no. 706002; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). La adición de cianuro de potasio-KCN (3 mM) al ensayo permitió la inhibición tanto de la Cu/ZnSOD como de la SOD extracelular, para de esta forma poder detectar, solamente, la actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD).

En la preparación de los pocillos para los estándares de SOD, se adicionaron 200  $\mu$ L del detector de radical diluido y 10  $\mu$ L de uno de los siete estándares del SOD disponibles en el kit (0-0,25 U/mL). Para la preparación de los pocillos para las muestras, se adicionaron 190  $\mu$ L del detector de radical diluido, 10  $\mu$ L de KCN 3 mM y 10  $\mu$ L del suero del paciente

(dilución de trabajo 1:5). Para la determinación de la actividad enzimática de SOD total, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  del detector de radical diluido y 10  $\mu\text{L}$  del suero del paciente (dilución de trabajo 1:5). La reacción se inició con la adición de 20  $\mu\text{L}$  de xantina oxidasa diluida. Al blanco, se le adicionó 20  $\mu\text{L}$  del buffer de muestra disponible en el kit. Luego de agitar por unos segundos, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron las lecturas en un lector de microplacas para absorbancias (PHOmo, Autobio Co., LTD), con filtro de lectura de 450 nm y de referencia de 620 nm. En ausencia del inhibidor KCN 3mM, se pudo determinar la actividad enzimática total de SOD y con la diferencia entre los valores de actividad enzimática de SOD total y de MnSOD, se pudo estimar la actividad enzimática de la isoforma citosólica Cu/ZnSOD.

El coeficiente de variación interensayo para este método fue de 4,6%, obtenido con los calibradores disponibles en el kit, pues no existe material de control para esta determinación.

#### 4.1.14 Determinación colorimétrica de los niveles séricos de hidroperóxidos lipídicos

Para la determinación cuantitativa *in vitro* del contenido de hidroperóxidos lipídicos en suero, se utilizaron los materiales y reactivos del Lipid Hydroperoxyde (LPO) Assay Kit (catalogo no.705003; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI).

Inicialmente, la muestra de suero del paciente (dilución de trabajo 1:20) fue sometida a un proceso de extracción con etanol y cloroformo, seguido de un paso de centrifugación a 1 500 x g por cinco minutos a 0 °C. Luego, se adicionaron 300  $\mu\text{L}$  del extracto de la muestra, 300  $\mu\text{L}$  del cromógeno (volúmenes iguales de FTS reactivo 1 y FTS reactivo 2) y 300  $\mu\text{L}$  de la mezcla etanol-cloroformo. Se realizó una curva de calibración con los ocho estándares de LOOHs (solución etanólica del ácido 13-hidroperoxioctadecadienoico, 13-HpODE, 0,0-5,0  $\mu\text{M}$ ) disponibles en el kit. Se realizaron las lecturas en un lector de microplacas para absorbancias (PHOmo, Autobio Co., LTD), con filtro de lectura de 492 nm y de referencia de 620 nm. El coeficiente de variación interensayo para este método fue de 5,3%, obtenido con los calibradores disponibles en el kit, pues no existe material de control para esta determinación.

#### 4.1.15 Plan de análisis estadístico de los datos

Toda la información obtenida a partir de las variables sociodemográficas, clínicas, virológicas y de laboratorio de interés, fue almacenada en una base de datos electrónica (Microsoft Excel 2010, Microsoft Corp). En la presentación de las variables numéricas estudiadas, se utilizaron herramientas de estadística descriptiva, tales como las medidas de tendencia central y de dispersión coherentes con la verificación de normalidad de la distribución de datos, realizada con una de las pruebas de bondad de ajuste con mayor poder estadístico, la prueba de Shapiro-Wilks <sup>180, 181</sup>.

En relación con el diseño elegido, las asociaciones estadísticas entre las variables de caracterización con la severidad del dengue fueron identificadas con la prueba exacta de Fisher, acompañada del respectivo tamaño del efecto (OR-odds ratio <sup>182</sup>, con su respectivo intervalo de confianza del 95%) para la evaluación del sentido y del nivel de la correlación encontrada. Para lograr este propósito estadístico de asociación, se utilizó una prueba de hipótesis con la finalidad de rechazar o no la hipótesis nula, expresada así  $H_0$ : la presencia de la variable de caracterización no se asocia con la severidad del dengue.

La comparación de la medida de tendencia central del biomarcador evaluado entre los casos y los controles fue realizada con la prueba de t de Student de muestras independientes o con la prueba U de Mann-Whitney, de acuerdo con el cumplimiento del supuesto de normalidad. También, se estimó el respectivo tamaño del efecto (d de Cohen o coeficiente r de Rosenthal, respectivamente) <sup>182</sup>. Para lograr este propósito estadístico de comparación, se utilizó una prueba de hipótesis con la finalidad de rechazar o no la hipótesis nula, expresada así  $H_0$ : las medidas de tendencia central del biomarcador de estrés oxidativo evaluado en los pacientes con dengue grave y en los pacientes con dengue con signos de alarma, son iguales ( $\mu_d=0$ ).

Dependiendo del cumplimiento del supuesto de normalidad, para las comparaciones múltiples de la medida de tendencia central de un biomarcador evaluado entre más de dos grupos de pacientes, se realizó una prueba F de ANOVA de un factor o una prueba H de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba de comparación por parejas, como la prueba de Dunnett (prueba post-hoc). Este propósito estadístico de comparación fue alcanzado, realizando una prueba de hipótesis con la finalidad de rechazar o no la hipótesis nula,

expresada así  $H_0$ : las medidas de tendencia central del biomarcador de estrés oxidativo evaluado en los pacientes con dengue grave, en los pacientes con dengue con signos de alarma, en los pacientes con dengue sin signos de alarma, en los pacientes con infección por virus zika y en los pacientes con evidencia de reacciones cruzadas entre arbovirus, son iguales ( $\mu_d=0$ ).

En el grupo de derivación, la elección del punto de corte óptimo o punto óptimo diagnóstico de cada predictor candidato, se basó en el valor máximo del Índice de Youden (J), obtenido a partir del análisis de la curva ROC (del inglés, *Receiver Operating Characteristic*). Para cada uno de estos umbrales diagnósticos, se estimaron los parámetros de validez y seguridad diagnóstica, con su respectivo intervalo de confianza del 95%.

Para establecer la relación entre el criterio o variable de respuesta dicotómica (dengue grave) con las variables predictoras o factores (punto óptimo diagnóstico de los biomarcadores analizados, predictor dicotomizado), dentro de un diseño de casos y controles, se utilizaron modelos estadísticos de regresión logística binaria (método automático de pasos hacia adelante-condicional) y de regresión probit binario. De igual manera, se aplicaron estos modelos de regresión, utilizando los valores continuos (predictor continuo) de los biomarcadores analizados.

La validación interna del mejor modelo pronóstico fue realizada en un subgrupo de pacientes, pertenecientes del grupo de derivación, seleccionados al azar, por el método de bootstrap, como técnica de remuestreo, para así realizar la evaluación de la calibración del modelo mediante la prueba estadística de bondad de ajuste global de Hosmer-Lemeshow o con la puntuación de eficiencia estadística de ROA. Como medidas de discriminación se utilizaron: el AUC o estadístico  $c$ <sup>183</sup>, estimada por vía no paramétrica, y el coeficiente de determinación (pseudo- $R^2$ ) de Nagelkerke .

La interpretación de los valores de exactitud global (AUC) se realizó de acuerdo con los criterios de Swets<sup>184</sup>. Para la comparación de dos valores de exactitud global se utilizó la prueba estadística de Hanley y McNeil<sup>185</sup>, como prueba de homogeneidad de áreas (prueba de Ji-cuadrado).

En este propósito estadístico de predicción, se utilizaron las siguientes pruebas de hipótesis:

- Prueba de hipótesis relacionada con la bondad de ajuste del modelo ( $H_0$ : el uso del punto de corte óptimo del biomarcador de estrés oxidativo evaluado no mejora, de manera significativa, la predicción de la probabilidad de ocurrencia del dengue grave en los pacientes del grupo de derivación).
- Prueba de hipótesis relacionada con la capacidad discriminativa del modelo pronóstico basado en el punto óptimo diagnóstico (predictor continuo,  $H_0$ : el modelo pronóstico basado en la concentración sérica del biomarcador de estrés oxidativo evaluado no puede distinguir a los pacientes con dengue grave de los pacientes con dengue con signos de alarma; predictor dicotomizado,  $H_0$ : la probabilidad de ocurrencia del dengue grave en la población no se puede pronosticar por la aplicación del modelo pronóstico basado en el punto óptimo diagnóstico del biomarcador de estrés oxidativo evaluado).
- Prueba de hipótesis relacionada con la capacidad pronóstica del modelo ( $H_0$ : la eliminación del biomarcador de estrés oxidativo evaluado de la ecuación de regresión no produce cambios significativos en el logaritmo de verosimilitud del modelo).
- Prueba de hipótesis relacionada con la comparación de la capacidad discriminativa del modelo pronóstico basado en el punto óptimo diagnóstico en los grupos etarios evaluados ( $H_0$ : la capacidad discriminativa del modelo pronóstico basado en el punto óptimo diagnóstico, es igual en niños y en adultos).
- Pruebas de hipótesis relacionadas con la comparación de dos curvas ROC ( $H_0$ : las áreas bajo las curvas ROC de los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados, son iguales;  $H_0$ : las áreas bajo las curvas ROC de los modelos pronósticos elegidos, son iguales).

Todos p-valores estimados en las pruebas de hipótesis realizadas, fueron interpretados utilizando los criterios de Sterne and Smith <sup>186</sup>. Pero, para establecer diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos independientes, se interpretaron los

intervalos de confianza del 95% de la diferencia ( $IC_{95\%_{dif}}$ ) entre proporciones independientes, entre medias o entre medianas, según la naturaleza de la variable o con el cumplimiento del supuesto de normalidad.

Para la evaluación de la transportabilidad geográfica (validez externa) del mejor modelo pronóstico, se utilizó un nuevo grupo de casos y controles constituidos por pacientes con diagnóstico de dengue grave y con signos de alarma, respectivamente, notificados al Instituto Nacional de Salud del Perú (grupo de validación externa). En esta evaluación se utilizaron las mismas pruebas estadísticas señaladas para la evaluación de la calibración y discriminación de modelos pronósticos. Finalmente, se utilizó la estrategia de la doble validación cruzada, la cual consistió en utilizar cada grupo para estimar un modelo pronóstico para aplicar en el otro <sup>187</sup>.

Todos los procedimientos estadísticos correspondientes al plan de análisis de datos fueron realizados en cuatro softwares estadísticos: IBM® SPSS® Statistics versión 23.0 (IBM Corp, Armonk, New York), GraphPad PRISM® versión 6.01 (GraphPad software, San Diego, CA), EpiDat 3.1® (Dirección Xeral de Innovación e Xestión da Saúde Pública, Xunta de Galicia, España, Organización Panamericana de la Salud e Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana) y Stata® versión 14.2 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

#### *4.1.16 Consideraciones éticas*

Según la Resolución N° 8430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia-Artículo 11, el presente estudio correspondió a una investigación sin riesgo por ser un estudio retrospectivo con registro de datos a partir de la revisión de las historias clínicas de los pacientes seleccionados o de las fichas de notificación epidemiológica y, además, se utilizaron las muestras de suero conservadas para la evaluación de los analitos de interés, sin ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participaron en la investigación. El presente estudio fue revisado y aprobado por la IPS Universitaria sede Barranquilla-Colombia (Material Suplementario, Anexo 4) y por el Instituto Nacional de Salud del Perú (Material Suplementario, Anexo 5).

## **CAPÍTULO 5**

## 5. Resultados

### 5.1 Características de la población de estudio

#### 5.1.1 Grupo de derivación.

Los pacientes pediátricos procedían de Barranquilla y presentaron la misma mediana para la edad (11 años; RIC: 10 a 13), en casos y en controles. El sexo masculino fue predominante (63,3%; 38/60; IC95% 50,7% a 74,4%), sin evidencia de asociación estadística o diferencia significativa respecto a la severidad del dengue (prueba exacta de Fisher,  $p=0,573$ ; IC95%<sub>dif</sub> -15,8% a 31,8%).

La mediana para los días de evolución del dengue fue similar en casos y controles (5 días vs. 4 días; U de Mann-Whitney=479;  $p=0,192$ ; IC95%<sub>dif</sub> -1,0 día a 0,0 día). Sin embargo, los pacientes pediátricos con dengue grave presentaron una mayor mediana de estancia hospitalaria respecto a los que desarrollaron dengue con signos de alarma (5 días vs. 3 días; IC95%<sub>dif</sub> 1,0 día a 3,0 días). Adicionalmente, se encontró una fuerte asociación estadística y directamente proporcional entre la severidad del dengue y el número de días de estancia hospitalaria (coeficiente  $r$  de Rosenthal=0,6;  $p\leq 0,0001$ ).

La mayoría de los casos seleccionados (90,0%; 18/20; IC95% 69,9% a 97,2%) presentaron manifestaciones de fuga plasmática (taquicardia, derrame pleural o incremento del hematocrito) o evidencias clínicas de daño orgánico grave (hepatitis o insuficiencia renal aguda, principalmente), coincidiendo ambos tipos de manifestaciones graves en el 44,4% (8/18; IC95% 24,6% a 66,3%) de estos casos.

No se pudo encontrar evidencia de asociación estadística entre la severidad del dengue y la sintomatología asociada a esta enfermedad febril, excepto para la presencia de astenia (prueba exacta de Fisher,  $p=0,036$ ; OR=6,3; IC95% 1,1 a 36,3), la cual presentó una fuerte asociación estadística y directamente proporcional con la severidad del dengue en esta población pediátrica. Igualmente, se detectó una fuerte asociación estadística y directamente proporcional entre la presencia de trombocitopenia y la severidad del dengue (prueba exacta de Fisher,  $p=0,001$ ; OR=12,0; IC95% 3,4 a 41,8).

En el caso de los niveles alterados de transaminasas, transaminasa glutámico-pirúvica-GPT y transaminasa glutámico oxalacética-GOT, estas enzimas presentaron una fuerte asociación estadística y directamente proporcional con dengue grave en este grupo de pacientes pediátricos (prueba exacta de Fisher,  $p=0,0007$ ;  $OR=8,5$ ;  $IC95\%_{dif}$  2,5 a 28,9 y  $p=0,0001$ ;  $OR=13,8$ ;  $IC95\%_{dif}$  3,8 a 49,6; respectivamente).

Aproximadamente, el 50,0% (10/20;  $IC95\%_{dif}$  29,9% a 70,1%) de los casos y el 30,0% (12/40;  $IC95\%_{dif}$  18,1% a 45,4%) de los controles presentaron evidencia serológica sugestiva de reinfección, pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre ellos (prueba exacta de Fisher,  $p=0,161$ ;  $IC95\%_{dif}$  -5,3% a 43,4%). El resto de variables estudiadas en esta población pediátrica se presentan en la Tabla 1.

### 5.1.2 Grupo de validación externa

La mayoría de los casos procedían de los departamentos de Ucayali (6/20), Madre de Dios (3/20), Loreto (2/20), Lima (2/20) y Trujillo (2/20). El 72,5% de los controles procedían de los departamentos de Ucayali (25/40) y Madre de Dios (4/40).

En este grupo, la mediana para la edad de los casos fue comparable con la estimada para los controles (20 años vs. 16 años; U de Mann-Whitney=339,5;  $p=0,347$ ;  $IC95\%_{dif}$  -10,0 a 4,0). Tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa en la distribución de casos y de controles entre los pacientes pediátricos y los pacientes mayores de 15 años ( $IC95\%_{dif}$  -6,4% a 41,4%; prueba exacta de Fisher,  $p=0,174$ ). Igualmente, no se pudo encontrar asociación estadística o diferencia significativa entre la severidad del dengue y el sexo del paciente (prueba exacta de Fisher,  $p=0,176$ ;  $IC95\%_{dif}$  -6,3% a 42,7%).

Aunque se observó una moderada asociación estadística entre la presencia de dengue grave y el número de días de evolución de la enfermedad (coeficiente  $r$  de Rosenthal=0,3;  $p=0,031$ ), no se pudo encontrar una diferencia estadísticamente significativa al comparar casos y controles (5 días vs. 4 días, respectivamente;  $IC95\%_{dif}$  -1,0 día a 0,0 días).

Aproximadamente, el 42,5% (17/40;  $IC95\%$  28,5% a 57,8%) de los casos seleccionados presentaron manifestaciones de fuga plasmática (extremidades frías, pulso débil, distrés respiratorio o incremento del hematocrito, principalmente) o evidencias clínicas de daño

orgánico grave (letargia, principalmente), coincidiendo ambos tipos de manifestaciones graves en el 82,4% (14/17; IC95% 59,0% a 93,8%) de estos casos.

Los únicos síntomas que presentaron una fuerte asociación estadística con la severidad del dengue, pero con alta imprecisión, fueron: astenia (prueba exacta de Fisher,  $p=0,004$ ; OR=16,7; IC95% 2,3 a 113,1) y letargia (prueba exacta de Fisher,  $p=0,0004$ ; OR=15,6; IC95% 2,9 a 82,8), en cambio, la presencia de distrés respiratorio (prueba exacta de Fisher,  $p=0,042$ ; OR=3,4; IC95% 1,1 a 10,7) mostró una moderada asociación estadística con dengue grave. El resto de variables evaluadas en el grupo de validación externa, se presenta en la Tabla 2.

Ahora bien, el distrés respiratorio por acumulación de líquidos fue la única sintomatología que se relacionó con el dengue grave en la población pediátrica peruana, mostrando una fuerte asociación estadística, pero con alta imprecisión (prueba exacta de Fisher,  $p=0,013$ ; OR=18,0; IC95% 2,2 a 151,7) (Tabla 3).

Aproximadamente, el 55,0% (11/20; IC95% 34,2% a 74,2%) de los casos y el 40,0% (16/40; IC95% 26,4% a 55,4%) de los controles presentaron evidencia serológica sugestiva de reinfección, pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (prueba exacta de Fisher,  $p=0,288$ ; IC95%<sub>dif</sub> -10,9% a 38,5%).

En tan solo el 25,0% (4/20; IC95% 11,2% a 46,9%) de los casos y el 30,0% (12/40; IC95% 18,1% a 45,4%) de los controles se pudo identificar al serotipo DENV infectante, siendo DENV-2, el único identificado. No se detectó la presencia del genoma de ZIKV, CHIKV o FAV en las muestras de suero analizadas.

**Tabla 1. Características clínicas y de laboratorio de pacientes pediátricos con dengue grave y dengue con signos de alarma, Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016**

Variables de estudio	Dengue grave n (%)	DCSA n (%)	p-valor*
Fiebre	20 (100,0)	40 (100,0)	NE
Dolor lumbar	10 (50,0)	24 (60,0)	0,582
Dolor retroocular	15 (75,0)	28 (70,0)	0,769
Frecuencia respiratoria alterada	3 (15,0)	2 (5,0)	0,322
Frecuencia cardíaca alterada	3 (15,0)	3 (7,5)	0,390
Astenia	5 (25,0)	2 (5,0)	0,036
Vómitos persistentes	10 (50,0)	24 (60,0)	0,582
Letargia	0 (0,0)	6 (15,0)	NE
Petequias	2 (10,0)	1 (2,5)	0,255
Exantema	5 (25,0)	10 (25,0)	0,998
Edema	1 (5,0)	3 (7,5)	0,998
Epistaxis	4 (20,0)	4 (10,0)	0,422
Gingivorragias	3 (15,0)	0 (0,0)	NE
Hematemesis	2 (10,0)	0 (0,0)	NE
Distensión abdominal	13 (65,0)	21 (52,5)	0,416
Derrame pleural	3 (15,0)	0 (0,0)	NE
Hemoglobina <12 g/dL	3 (15,0)	14 (35,0)	0,136
Incremento del HCT	9 (45,0)	11 (27,5)	0,246
<i>RLD (al ingreso hospitalario)</i>			
Trombocitopenia	15 (75,0)	8 (20,0)	0,001
Neutropenia	4 (20,0)	13 (32,5)	0,375
Linfopenia	4 (20,0)	13 (32,5)	0,375
Monocitosis	7 (35,0)	12 (30,0)	0,772
Linfocitosis	5 (25,0)	18 (45,0)	0,166
Basofilia	3 (15,0)	6 (15,0)	0,998
Neutrofilia	6 (30,0)	12 (30,0)	0,998
BUN alterado	1 (5,0)	2 (5,0)	0,998
Creatinina alterada	4 (20,0)	3 (7,5)	0,208
GPT alteradas	12 (60,0)	6 (15,0)	0,0007
GOT alteradas	16 (80,0)	9 (22,5)	0,0001

\* estimado por la prueba exacta de Fisher; DCSA: Dengue con signos de alarma; NE: no estimado; RLD: recuento de leucocitos diferencial; HCT: hematocrito; BUN: nitrógeno ureico sérico; GPT: transaminasa glutámico-pirúvica; GOT: transaminasa glutámico-oxalacética;

**Tabla 2. Características clínicas y de laboratorio de pacientes con dengue grave y dengue con signos de alarma, grupo de validación externa, Perú, 2018**

Variables de estudio	Dengue grave n (%)	DCSA n (%)	p-valor*
Fiebre	20 (100,0)	40 (100,0)	NE
Astenia	6 (30,0)	1 (2,5)	0,004
Epistaxis	2 (10,0)	2 (5,0)	0,595
Petequias	0 (0,0)	1 (2,5)	NE
Gingivorragias	1 (5,0)	1 (2,5)	0,998
Exantema	5 (25,0)	15 (37,5)	0,395
Mialgias	17 (85,0)	29 (72,5)	0,347
Artralgias	14 (70,0)	34 (85,0)	0,189
Letargia	9 (45,0)	11 (27,5)	0,0004
Lipotimia	3 (15,0)	1 (2,5)	0,103
Vómitos persistentes	13 (65,0)	30 (75,0)	0,545
Hematemesis	1 (5,0)	4 (10,0)	0,656
Melenas	1 (5,0)	0 (0,0)	NE
Hematuria	2 (10,0)	1 (2,5)	0,255
Distensión abdominal	13 (65,0)	30 (75,0)	0,545
Derrame seroso	3 (15,0)	0 (0,0)	NE
Hipotermia	4 (20,0)	0 (0,0)	NE
Disminución de la diuresis	3 (15,0)	2 (5,0)	0,322
Distrés respiratorio	10 (50,0)	9 (22,5)	0,042
Extremidades frías	7 (35,0)	0 (0,0)	NE
PAD $\leq$ 20 mmHg	5 (25,0)	0 (0,0)	NE
Pulso débil	5 (25,0)	0 (0,0)	NE
Trombocitopenia	2 (10,0)	11 (27,5)	0,186
Incremento del HCT	5 (25,0)	21 (52,5)	0,056

\* estimado por la prueba exacta de Fisher; DCSA: Dengue con signos de alarma; PAD: presión arterial diferencial; HCT: hematocrito; NE: no estimado

**Tabla 3. Características clínicas y de laboratorio de pacientes pediátricos con dengue grave y dengue con signos de alarma, grupo de validación externa, Perú, 2018**

VARIABLES DE ESTUDIO	DENGUE GRAVE n (%)	DCSA n (%)	p-valor*
Fiebre	6 (100,0)	20 (100,0)	NE
Astenia	1 (16,7)	0 (0,0)	NE
Epistaxis	0 (0,0)	2 (10,0)	NE
Petequias	0 (0,0)	1 (2,5)	NE
Gingivorragias	0 (0,0)	1 (2,5)	NE
Exantema	2 (33,3)	7 (35,0)	0,998
Mialgias	5 (83,3)	9 (45,0)	0,170
Artralgias	4 (66,7)	14 (70,0)	0,998
Letargia	6 (100,0)	0 (0,0)	NE
Lipotimia	1 (1,7)	1 (5,0)	0,415
Vómitos persistentes	4 (66,7)	12 (60,0)	0,998
Hematemesis	0 (0,0)	0 (0,0)	NE
Melenas	0 (0,0)	0 (0,0)	NE
Hematuria	1 (16,7)	1 (5,0)	0,415
Distensión abdominal	4 (66,7)	17 (85,0)	0,558
Derrame seroso	2 (33,3)	0 (0,0)	NE
Hipotermia	0 (0,0)	0 (0,0)	NE
Disminución de la diuresis	0 (0,0)	0 (0,0)	NE
Distrés respiratorio	4 (66,7)	2 (10,0)	0,013
Extremidades frías	2 (33,3)	0 (0,0)	NE
PAD $\leq$ 20 mmHg	2 (33,3)	0 (0,0)	NE
Pulso débil	0 (0,0)	0 (0,0)	NE
Trombocitopenia	1 (16,7)	2 (10,0)	0,998
Incremento del HCT	2 (33,3)	4 (20,0)	0,596

\* estimado por la prueba exacta de Fisher; DCSA: Dengue con signos de alarma; PAD: presión arterial diferencial; HCT: hematocrito; NE: no estimado

## 5.2 Comportamiento de los niveles séricos de los biomarcadores

### 5.2.1 Niveles de carbonilos proteicos en muestras de suero de pacientes pediátricos (grupo de derivación)

Para la determinación cuantitativa de PCOs en las muestras de suero se utilizó el método alcalino de 2,4-DNPH (Apéndice 1, Material Suplementario). Con este método, se estimaron medianas para la concentración de PCOs de 23,49 nmol/mL (RIC: 21,53 a 26,91) y 16,26 nmol/mL (RIC: 14,41 a 18,16) para casos y controles, respectivamente. Al ajustar estos valores con las concentraciones séricas de proteínas, se encontraron 7,30 nmol de PCOs/mg de proteína (RIC: 6,75 a 8,60) en los pacientes pediátricos con dengue grave y 4,82 nmol de PCOs/mg de proteína (RIC: 4,52 a 5,31) en los niños con dengue con signos de alarma.

Se pudo demostrar una diferencia estadísticamente significativa entre los valores séricos estimados en casos y controles, tanto con las concentraciones séricas de PCOs no ajustadas (IC95%<sub>dif</sub> 4,03 a 9,08 nmol/mL), como en las ajustadas con el nivel de proteínas séricas del paciente (IC95%<sub>dif</sub> 1,45 a 2,95 nmol de PCOs/mg de proteína). También se encontró una fuerte asociación estadística y directamente proporcional entre la severidad del dengue y las concentraciones séricas de PCOs (concentraciones de PCOs no ajustadas: coeficiente r de Rosenthal=0,5; p=0,0001; concentraciones de PCOs ajustadas: coeficiente r de Rosenthal=0,5; p=0,0002) (Figura 1a y 1b).

### 5.2.2 *Actividad enzimática de superóxido dismutasa mitocondrial, citosólica y total (grupo de derivación)*

Para este biomarcador, se encontraron valores séricos de  $1,39 \pm 0,05$  U/mL en los niños con diagnóstico de dengue grave, mientras que en los niños con dengue con signo de alarma se encontraron  $1,41 \pm 0,10$  U de MnSOD/mL. No se pudo encontrar diferencia estadísticamente significativa entre estos dos valores de actividad enzimática (IC95%<sub>dif</sub> - 0,02 a 0,06 U/mL de MnSOD; prueba t de Student para muestras independientes, t=0,988; gl: 58; p=0,327) (Material Suplementario, Figura S1a).

Al mismo tiempo, se estimaron las actividades enzimáticas de SOD total y de la isoforma citosólica Cu/ZnSOD. En los casos, se encontraron valores séricos de  $3,21 \pm 0,05$  U/mL y de  $1,82 \pm 0,07$  U/mL, respectivamente. Y en los controles, se encontraron niveles séricos de SOD total de  $3,18 \pm 0,05$  U/mL y niveles séricos de Cu/ZnSOD de  $1,78 \pm 0,10$  U/mL.

También, se encontró evidencia de asociación estadística, entre moderada y fuerte, de la actividad enzimática de SOD total con la severidad del dengue (prueba t de Student para muestras independientes, t=1,989; gl: 39,83; p=0,054; d de Cohen=0,7).

Además, la actividad enzimática de la isoforma Cu/ZnSOD también se asoció, pero con una magnitud entre débil y moderada, con el dengue grave (prueba t de Student para muestras independientes, t=1,996; gl: 52,96; p=0,051; d de Cohen=0,4).

La moderada fuerza de los datos contra la hipótesis nula, representada por el p-valor estimado para la relación entre la actividad enzimática total de SOD con la severidad del dengue, estuvo acompañada con la escasa ausencia de diferencia estadísticamente significativa detectada para la comparación de los niveles séricos de SOD total entre los pacientes con dengue grave y con dengue con signos de alarma (IC95%<sub>dif</sub> -0,0004 a 0,05 U/mL).

Lo anterior, también se presentó con la relación entre la actividad enzimática de la isoforma Cu/ZnSOD y el diagnóstico de dengue grave en los niños evaluados (IC95%<sub>dif</sub> -0,0002 a 0,09 U/mL) (Material Suplementario, Figuras S1b y S1c).

### 5.2.3 Niveles de hidroperóxidos lipídicos en muestras de suero de pacientes pediátricos (grupo de derivación)

En este grupo, se encontraron niveles séricos de LOOHs de  $61,20 \pm 6,88 \mu\text{M}$  en los niños con dengue grave y de  $59,79 \pm 7,08 \mu\text{M}$  en los niños con dengue con signos de alarma. No se encontró asociación estadística entre los niveles séricos de este biomarcador con la severidad del dengue (prueba t de Student para muestras independientes,  $t=-0,735$ ; gl: 58;  $p=0,465$ ), ni diferencia estadísticamente significativa al comparar estos valores séricos (IC95%<sub>dif</sub> -5,26 a 2,43  $\mu\text{M}$  de LOOHs) (Material Suplementario, Figura S2).

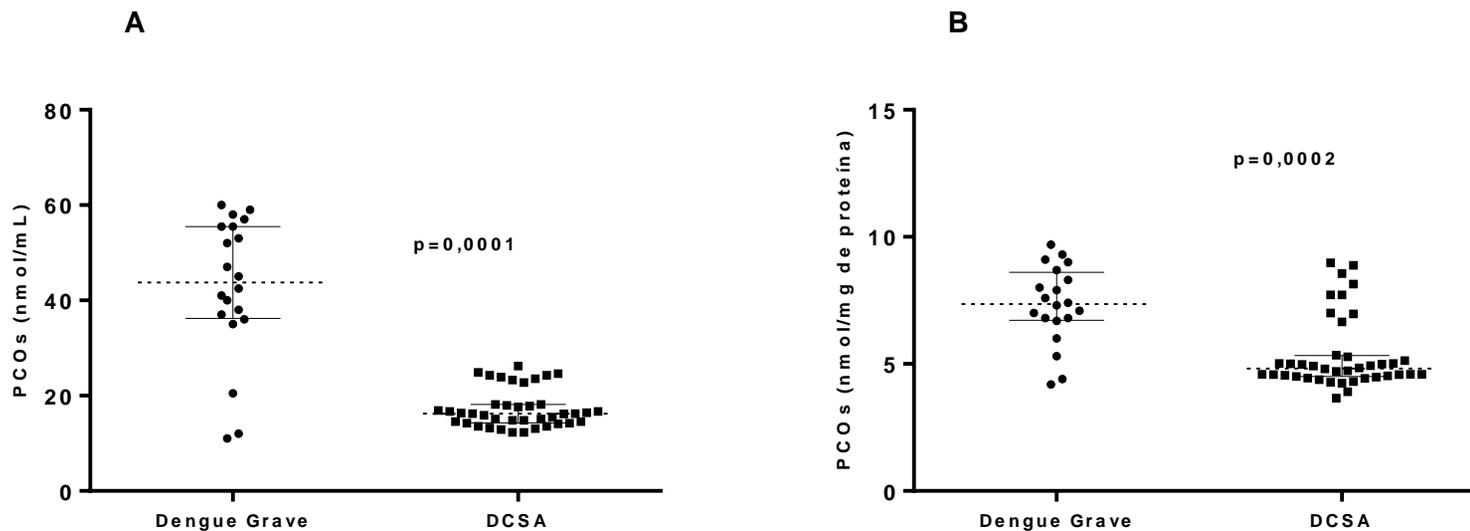


Figura 1. Comparación entre las concentraciones de carbonilos proteicos en las muestras de suero de pacientes pediátricos con dengue grave y con dengue con signos de alarma (DCSA). Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016  
 A: concentraciones no ajustadas; B: concentraciones ajustadas. Las barras representan la mediana y el rango intercuartílico de los datos

#### 5.2.4 Niveles de carbonilos proteicos en muestras de suero de pacientes (grupo de validación externa)

En este grupo de validación externa, se estimó una mediana para la concentración sérica de este biomarcador de 20,02 nmol/mL (RIC: 18,34 a 21,59) para los pacientes con diagnóstico de dengue grave y, en los controles, una mediana de 13,62 nmol de PCOs/mL (RIC: 12,11 a 16,26).

En los casos, la mediana para la concentración ajustada de PCOs fue de 6,95 nmol/mg de proteína (RIC: 6,63 a 7,56). Y en los controles, la mediana para los niveles séricos ajustados fue de 4,47 nmol de PCOs/mg de proteína (RIC: 4,00 a 5,19).

Las concentraciones séricas de PCOs en los pacientes con dengue grave fueron significativamente superiores en comparación con las estimadas en los pacientes con dengue con signos de alarma (niveles séricos no ajustados: IC95%<sub>dif</sub> 3,42 a 7,34 nmol de PCOs/mL y niveles séricos ajustados: IC95%<sub>dif</sub> 1,59 a 2,84 nmol de PCOs/mg de proteína).

Adicional a esto, se encontró una fuerte asociación estadística y directamente proporcional entre el diagnóstico de dengue grave y los niveles séricos de PCOs (niveles séricos no ajustados: coeficiente r de Rosenthal=0,6;  $p < 0,0001$ ; niveles séricos ajustados: coeficiente r de Rosenthal=0,6;  $p < 0,0001$ ) (Figuras 2a y 2b).

Algo semejante se presentó al comparar las medianas para los niveles séricos de PCOs entre casos y controles pediátricos (concentraciones no ajustadas: 20,13 nmol/mL vs. 12,11 nmol/mL, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> 5,33 a 9,42 nmol/mL; coeficiente r de Rosenthal=0,6;  $p = 0,001$ ; concentraciones ajustadas: 8,40 nmol/mg de proteína vs. 4,29 nmol/mg de proteína, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> 2,27 a 4,82 nmol/mg de proteína; coeficiente r de Rosenthal=0,7;  $p < 0,0001$ ) y entre casos y controles adultos (concentraciones no ajustadas: 19,74 nmol/mL vs. 15,00 nmol/mL, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> 0,62 a 6,17 nmol/mL; coeficiente r de Rosenthal=0,5;  $p = 0,007$ ; concentraciones ajustadas: 6,42 nmol/mg de proteína vs. 4,63 nmol/mg de proteína, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> 0,84 a 2,43 nmol/mg de proteína; coeficiente r de Rosenthal=0,5;  $p = 0,001$ ).

Por otra parte, se estimaron las concentraciones de este marcador biológico en muestras de suero de pacientes con: dengue sin signos de alarma, infectado con ZIKV y evidencia serológica o molecular de la presencia de DENV y otro arbovirus. Los niveles séricos de PCOs evaluados en estos tres grupos fueron similares a los estimados en pacientes con dengue con signos de alarma (niveles séricos sin ajustar: H de Kruskal-Wallis=5,812; gl: 3; n=90; p=0,121; niveles séricos ajustados: H de Kruskal-Wallis=1,821; gl: 3; n=90; p=0,610).

Algo diferente fue encontrado al ser comparados con las concentraciones séricas de PCOs estimadas en los pacientes con dengue grave (niveles séricos sin ajustar: H de Kruskal-Wallis=31,37; gl: 4; n=110; p<0,0001; niveles séricos ajustados: H de Kruskal-Wallis=38,382; gl: 4; n=110; p<0,0001) (Figuras 3a y 3b).

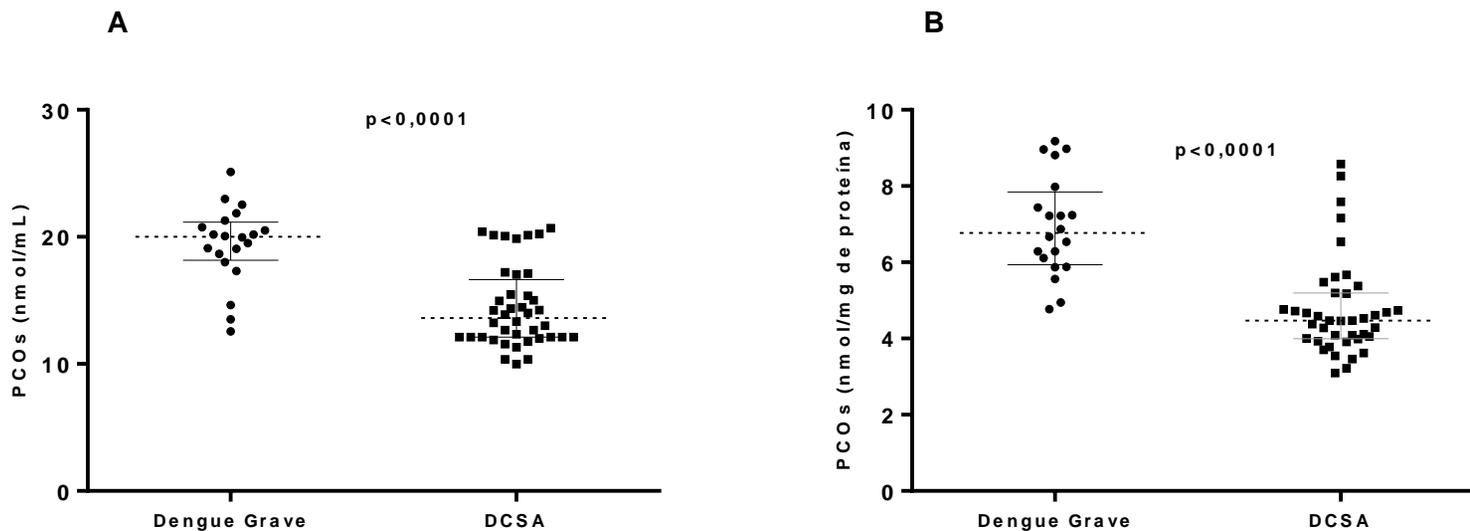
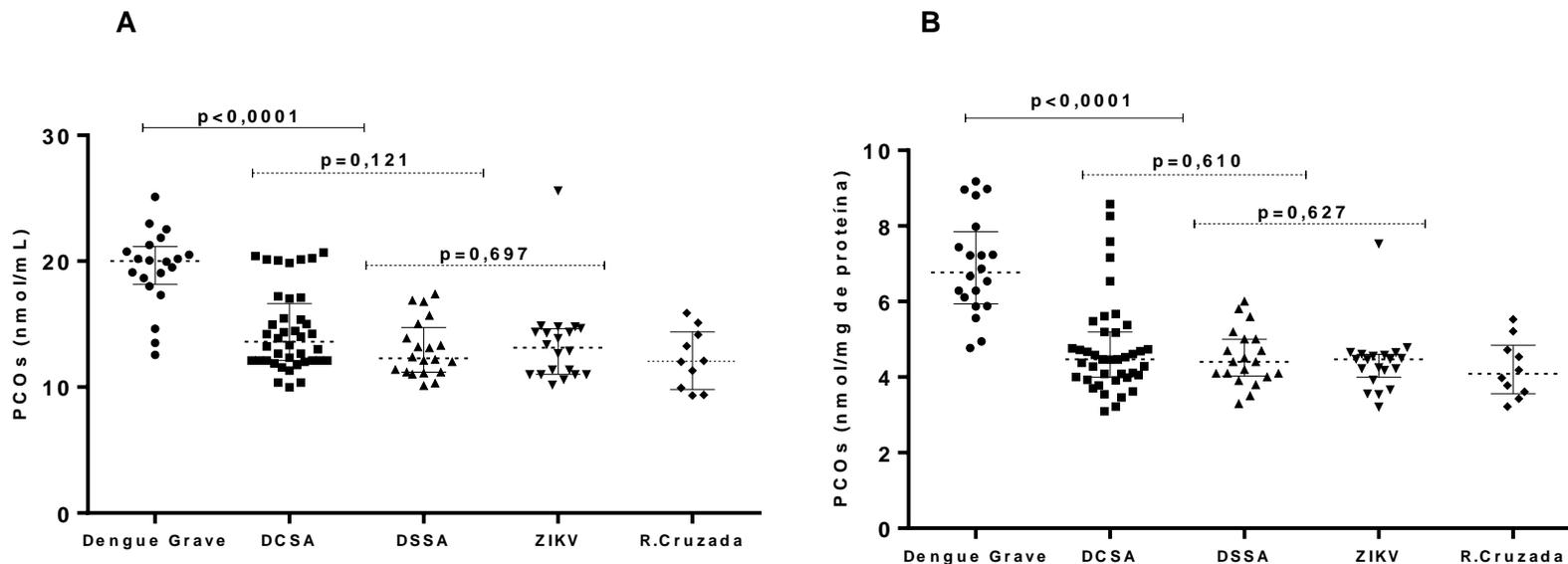


Figura 2. Comparación entre las concentraciones de carbonilos proteicos (PCOs) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave y con dengue con signos de alarma (DCSA). Grupo de validación externa, Perú, 2018  
 A: concentraciones no ajustadas; B: concentraciones ajustadas. Las barras representan la mediana y el rango intercuartílico de los datos



**Figura 3. Comparación entre las concentraciones de carbonilos proteicos (PCOs) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave, dengue con signos de alarma (DCSA), dengue sin signos de alarma (DSSA), infectados con virus zika (ZIKV) y con reacción cruzada (R. Cruzada: DENV + otro arbovirus). Grupo de validación externa, Perú, 2018**  
**A: concentraciones no ajustadas; B: concentraciones ajustadas. Las barras representan la mediana y el rango intercuartílico de los datos.**

### 5.2.5 Actividad enzimática de superóxido dismutasa mitocondrial en muestras de suero de pacientes (grupo de validación externa)

Las concentraciones séricas de MnSOD fueron estimadas en  $1,65 \pm 0,05$  U/mL en los casos y en  $1,61 \pm 0,13$  U/mL en los controles. Estos niveles séricos no se asociaron con el dengue grave (prueba t de Student para muestras independientes,  $t=-1,631$ ; gl: 54,25;  $p=0,109$ ), ni tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con dengue grave y los pacientes con dengue con signos de alarma (IC95%<sub>dif</sub> -0,08 a 0,01 U de MnSOD/mL).

Algo similar fue encontrado con las actividades enzimáticas de SOD total (casos vs. controles:  $3,77 \pm 0,04$  U/mL vs  $3,75 \pm 0,03$  U/mL, respectivamente; prueba t de Student para muestras independientes,  $t=-1,365$ ; gl: 28,56;  $p=0,183$ ; IC95%<sub>dif</sub> -0,03 a 0,01 U de MnSOD/mL) y de Cu/ZnSOD (casos vs. controles:  $2,12 \pm 0,05$  U/mL vs  $2,14 \pm 0,13$  U/mL, respectivamente; prueba t de Student para muestras independientes,  $t=0,973$ ; gl: 56,71;  $p=0,335$ ; IC95%<sub>dif</sub> -0,02 a 0,07 U de MnSOD/mL) (Material Suplementario, Figuras S3a, S3b y S3c).

Los resultados obtenidos con la prueba post-hoc permiten señalar que los niveles séricos de MnSOD en los pacientes con dengue grave fueron significativamente superiores que los estimados en los pacientes con dengue sin signos de alarma (IC95%<sub>dif</sub> 0,03 a 0,19 U/mL;  $p=0,005$ ) y en los infectados con ZIKV (IC95%<sub>dif</sub> 0,04 a 0,21 U/mL;  $p=0,002$ ). Asimismo, se determinó que la actividad enzimática de MnSOD fue significativamente superior en los pacientes con dengue con signos de alarma que en los pacientes infectados con virus ZIKV (IC95%<sub>dif</sub> 0,01 a 0,17 U/mL;  $p=0,028$ ) (Figura 4).

Tanto para SOD total como para la isoenzima Cu/ZnSOD, las actividades enzimáticas de ambas resultaron significativamente superiores en los pacientes con dengue grave en comparación con los infectados por virus zika (SOD total: IC95%<sub>dif</sub> 0,92 a 1,20 U/mL;  $p<0,0001$  y CU/ZnSOD: IC95%<sub>dif</sub> 0,32 a 0,67 U/mL;  $p<0,0001$ ) o con los categorizados con reacción cruzada (SOD total: IC95%<sub>dif</sub> 0,78 a 1,10 U/mL;  $p<0,0001$  y Cu/ZnSOD: IC95%<sub>dif</sub> 0,26 a 0,66 U/mL;  $p<0,0001$ ) (Figuras 5 y 6).

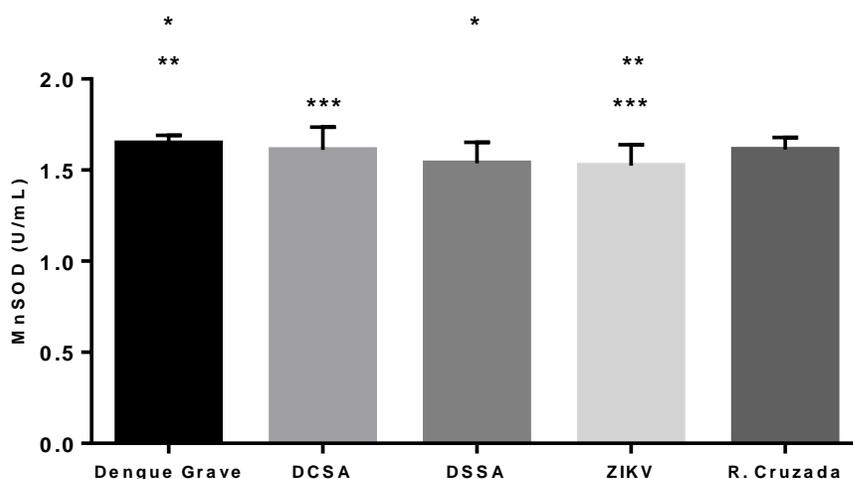


Figura 4. Comparación entre las concentraciones de superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave, dengue con signos de alarma (DCSA), dengue sin signos de alarma (DSSA), infectados con virus zika (ZIKV) y con reacción cruzada (R. Cruzada: DENV + otro arbovirus). Grupo de validación externa, Perú, 2018

\* $p=0,005$ ; \*\* $p=0,002$ ; \*\*\* $p=0,028$ . La barra representa la desviación estándar de los datos.

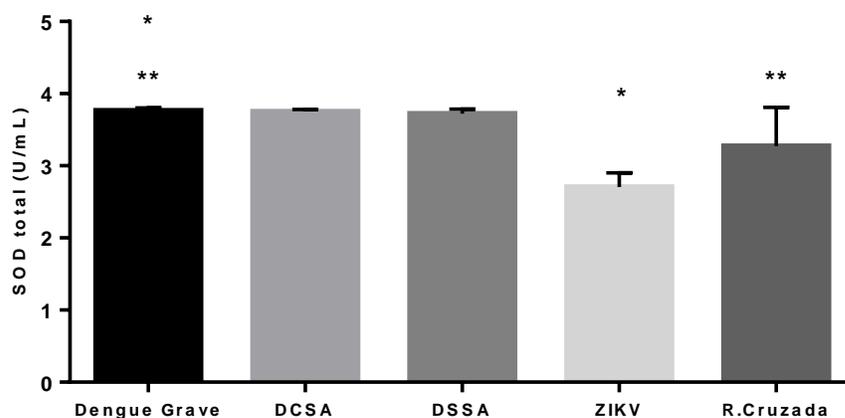
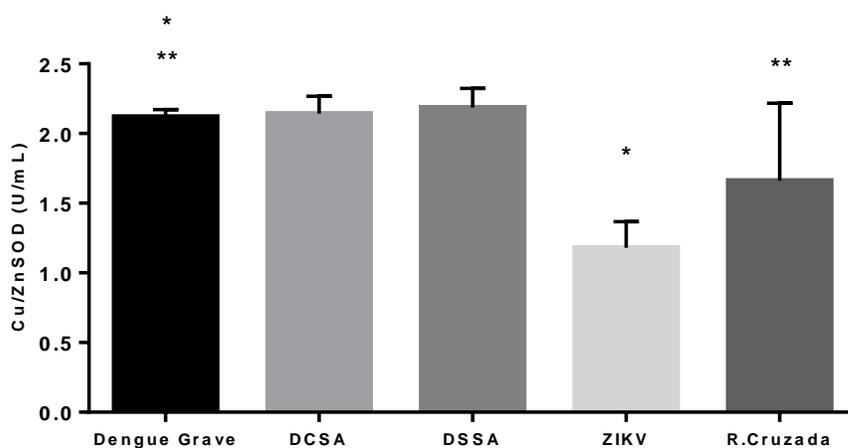


Figura 5. Comparación entre las concentraciones de superóxido dismutasa total (SOD total) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave, dengue con signos de alarma (DCSA), dengue sin signos de alarma (DSSA), infectados con virus zika (ZIKV) y con reacción cruzada (R. Cruzada: DENV + otro arbovirus). Grupo de validación externa, Perú, 2018

\* $p<0,0001$ ; \*\* $p<0,0001$ . La barra representa la desviación estándar de los datos.



**Figura 6. Comparación entre las concentraciones de superóxido dismutasa citosólica (Cu/ZnSOD) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave, dengue con signos de alarma (DCSA), dengue sin signos de alarma (DSSA), infectados con virus zika (ZIKV) y con reacción cruzada (R. Cruzada: DENV + otro arbovirus). Grupo de validación externa, Perú, 2018**

\* $p < 0,0001$ ; \*\* $p < 0,0001$ . La barra representa la desviación estándar de los datos.

### 5.2.6 Niveles de hidroperóxidos lipídicos en muestras de suero de pacientes (grupo de validación externa)

No se pudo encontrar diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores séricos de LOOHs estimados en los pacientes con dengue grave con los estimados en los pacientes con dengue con signos de alarma ( $33,21 \pm 11,94 \mu\text{M}$  vs  $32,82 \pm 11,49 \mu\text{M}$ , respectivamente; IC95%dif -6,77 a  $5,99 \mu\text{M}$ ; prueba t de Student para muestras independientes,  $t = -0,123$  M gl: 58;  $p = 0,903$ ).

Algo semejante se presentó al realizar las comparaciones múltiples de los valores séricos estimados de este biomarcador entre los cinco grupos de pacientes estudiados (Prueba de ANOVA de un factor,  $F = 0,085$ ; gl: 4;  $p = 0,987$ ) (Material Suplementario, Figura S4).

### 5.3 Punto de corte óptimo y área bajo la curva de cada biomarcador

El área bajo la curva (AUC) de los niveles séricos de PCOs en la población pediátrica estudiada fue calculada en 80,6% (IC95% 68,6% a 92,6%), siendo identificado como punto óptimo diagnóstico: 18,50 nmol de PCOs/mL ( $J = 0,63$ ) (Figura 7). Y para las concentraciones ajustadas de este biomarcador, se estimó una AUC de 80,2% (IC95%

67,2% a 93,2%), con 5,29 nmol de PCOs/mg de proteína como punto óptimo diagnóstico ( $J=0,65$ ) (Figura 8). En ambos casos (niveles séricos no ajustados:  $p=0,0001$  y niveles séricos ajustados:  $p=0,0002$ ), se observó una fuerte evidencia en los datos para rechazar la hipótesis nula.

Para el caso de la actividad enzimática de la MnSOD, el AUC fue estimada en 44,1% (IC95% 29,7% a 58,4%), siendo identificado como punto óptimo diagnóstico: 1,36 U de MnSOD/mL ( $J=0,08$ ) (Material Suplementario, Figura S5). Para las actividades enzimáticas séricas de SOD total y de Cu/ZnSOD se calcularon AUCs de 65,1% (IC95% 50,8% a 79,5%) y 64,9% (IC95% 50,9% a 78,9%), respectivamente (Material Suplementario, Figuras S6 y S7). El punto óptimo diagnóstico para la actividad enzimática de SOD total fue estimado en 3,17 U/mL ( $J=0,23$ ) y para Cu/ZnSOD, en 1,77 U/mL ( $J=0,40$ ).

El AUC de las concentraciones séricas de LOOHs en la población pediátrica evaluada fue calculada en 54,1% (IC95% 39,0% a 69,2%) (Material Suplementario, Figura S8), con un punto óptimo diagnóstico de 54,66  $\mu$ M ( $J=0,15$ ).

Tanto para la AUC de la actividad enzimática sérica de MnSOD ( $p=0,456$ ) como para la AUC de los niveles séricos de LOOHs ( $p=0,605$ ), se observó que la evidencia en los datos contra la hipótesis nula fue muy débil, en consecuencia, no se pudo rechazar la hipótesis nula planteada. En cambio, para las actividades enzimáticas séricas de SOD total ( $p=0,058$ ) y de Cu/ZnSOD ( $p=0,062$ ), la evidencia que arrojaron los datos contra la hipótesis nula no fue muy fuerte.

Por el comportamiento observado en la curva ROC, se calcularon los parámetros de validez diagnóstica, seguridad y utilidad clínica para PCOs (Tabla 4) y para las actividades enzimáticas de SOD total y de Cu/ZnSOD, a partir de los puntos de corte óptimos estimados (Tabla 5).

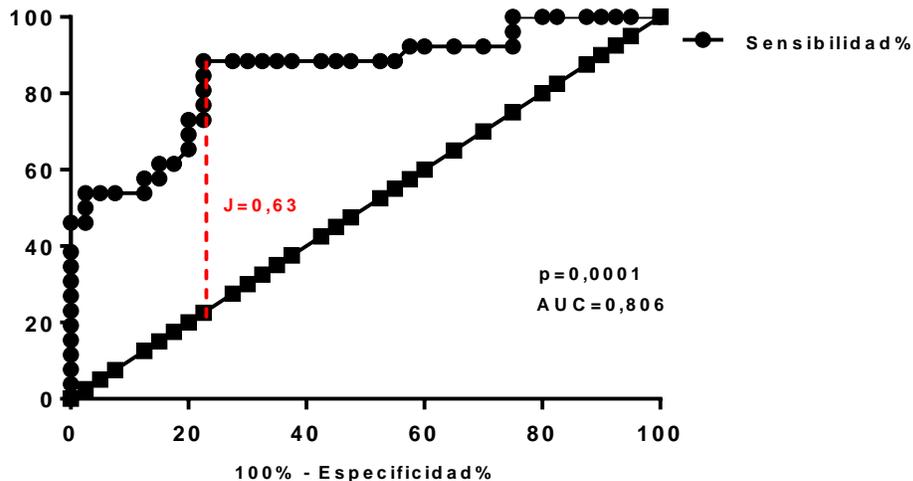


Figura 7. Curva ROC de las concentraciones de carbonilos proteicos (PCOs) en las muestras de suero de pacientes pediátricos con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016

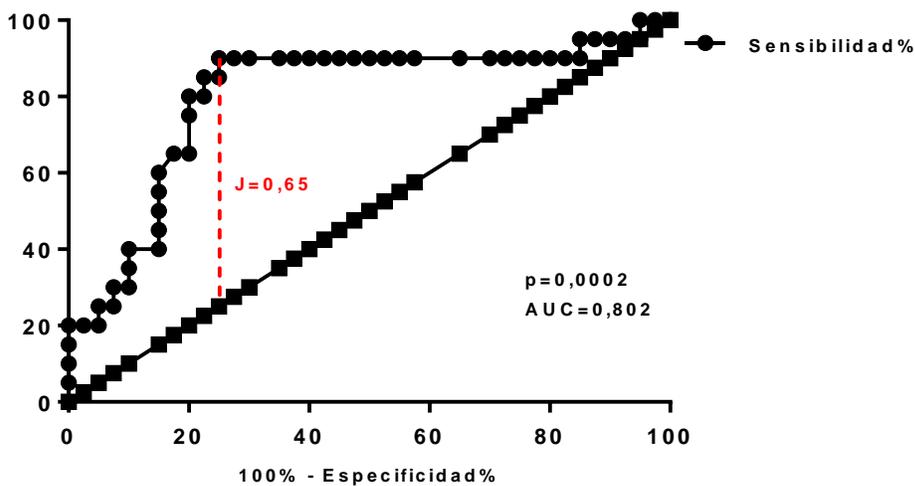


Figura 8. Curva ROC de las concentraciones ajustadas de carbonilos proteicos (PCOs-A) en las muestras de suero de pacientes pediátricos con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016

#### 5.4 *Pronóstico de severidad del dengue*

##### 5.4.1 *Modelos de regresión logística binaria*

Como resultado de la aplicación del método de selección de predictores hacia adelante-condicional, el único biomarcador de estrés oxidativo que cumplió con las condiciones de probabilidad para el método por pasos (entrada:  $p \leq 0,05$  y eliminación:  $p > 0,10$ ) fue: PCOs, lo cual le permitió ser incluido en los modelos pronósticos definitivos. El resto de biomarcadores evaluados no cumplieron con las condiciones de entrada al modelo (MnSOD: estadístico de Wald=1,53; gl: 1;  $p=0,216$ ; SOD total: estadístico de Wald=0,58; gl: 1;  $p=0,448$ ; Cu/ZnSOD: estadístico de Wald=1,73; gl: 1;  $p=0,188$ ; LOOHs: estadístico de Wald=0,22; gl: 1;  $p=0,643$ ).

La Tabla 6 muestra el resultado de ajustar estos modelos de regresión logística para describir la relación entre la progresión a dengue grave y el factor elegido. De igual manera, en la Tabla 7 se presentan los resultados de la regresión logística binaria utilizando los dos puntos de corte óptimos estimados para las concentraciones séricas de PCOs. Al mismo tiempo en estas dos tablas se presentan los resultados de la simulación de muestreo basado en 10 000 muestras de simulación de muestreo.

##### 5.4.2 *Modelos de regresión probit binario*

En las Tablas S1 y S2 (Material Suplementario) se muestran los elementos de los modelos de regresión probit binario para pronosticar la severidad del dengue en pacientes pediátricos a partir de las concentraciones séricas de PCOs y de la aplicación de sus puntos de corte óptimos, junto con los valores de sesgos y otros elementos estimados a partir de la aplicación del método de bootstrap a cada modelo pronóstico.

En cuanto al porcentaje de pacientes correctamente clasificados, independientemente del análisis de regresión aplicado, se puede señalar que:

- El primer modelo identificó correctamente el 65,0% (13/20; IC95% 43,3% a 81,9%) de los pacientes pediátricos con dengue grave y el 77,5% (31/40; IC95% 62,5% a 87,7%) de los que presentaron dengue con signos de alarma. Como porcentaje global

pronosticado, este primer modelo pronóstico identificó el 73,3% (44/60; IC95% 61,0% a 82,9%) de los pacientes pediátricos evaluados.

- Aproximadamente, el 55,0% (11/20; IC95% 34,2% a 74,2%) de los casos y el 85,0% (34/40; IC95% 70,9% a 92,9%) de los controles fueron correctamente identificados por el segundo modelo pronóstico. Para este modelo, el porcentaje global pronosticado fue estimado en 75,0% (45/60; IC95% 62,8% a 84,2%).
- El índice de exactitud global estimado para el tercer modelo pronóstico fue calculado en 76,7% (46/60; IC95% 64,6% a 85,6%). Para los casos y los controles, los índices de exactitud fueron estimados en 85,0% (17/20; IC95% 64,0% a 94,8%) y 72,5% (29/40; IC95% 57,2% a 83,9%), respectivamente.
- Para este cuarto modelo, existe un 80,0% (48/60; IC95% 68,2% a 88,2%) de probabilidad de acierto en la severidad del dengue en la población pediátrica, cuando se conoce que sus niveles séricos ajustados de PCOs son iguales o superiores a 5,29 nmol/mg de proteína; los índices de exactitud en casos y en controles fueron calculados en 90,0% (18/20; IC95% 69,9% a 97,2%) y 75,0% (30/40; IC95% 59,8% a 85,8%), respectivamente.

Las probabilidades de dengue grave en el grupo de derivación, a partir de las ecuaciones de regresión de los modelos estimados por el análisis de regresión logística binaria, siempre resultaron superiores a las estimadas por el análisis de regresión probit binario (modelo pronóstico-4 corregido: 64,0% vs 38,0%, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> 12,2% a 38,5% y modelo pronóstico-3 corregido: 60,0% vs 28,0%, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> 18,4% a 44,0%). Algo semejante ocurrió con los modelos pronósticos no corregidos por el sesgo estimado en el remuestreo (modelo pronóstico-4: 64% vs 37%, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> 13,2% a 39,4% y modelo pronóstico-3: 61% vs 27%, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> 20,4% a 45,9%).

En ambos análisis de regresión, se determinó que el uso del punto óptimo diagnóstico estimado para las concentraciones séricas de PCOs ajustadas (modelo pronóstico-4: 5,29 nmol/mg de proteína) permitió identificar un porcentaje de pacientes pediátricos con dengue

grave significativamente superior al detectado con el uso de las concentraciones séricas ajustadas de PCOs (modelo pronóstico-2) (predictor dicotomizado vs. predictor continuo: IC95%<sub>dif</sub> 7,2% a 57,0%) (Tabla 8). Mientras que no se pudo encontrar diferencias estadísticamente significativas al comparar los índices de exactitud estimados (Tabla 9).

### 5.5 Calibración y discriminación del mejor modelo pronóstico estimado

Como consecuencia de tener una sola variable predictora (PCOs), no se pudo evaluar la calibración del mejor modelo pronóstico mediante la prueba Hosmer-Lemeshow, sin embargo, éste sí pudo ser evaluado con otra medida de bondad de ajuste, como la puntuación de eficiencia estadística de ROA (prueba Ji-cuadrado en la prueba de ómnibus:  $X^2=24,92$ ; gl: 1;  $p \leq 0,00001$ ).

Aproximadamente, el 47,2% de la varianza de la variable criterio (severidad del dengue) puede ser explicada por el modelo basado en el punto de corte de 5,29 nmol de PCOs/mg de proteína (pseudo- $R^2$  de Nagelkerke=0,472), con una excelente discriminación (estadístico  $c=0,825$ ; IC95% 0,729 a 0,921). Nuevamente, se observó una fuerte evidencia en los datos para rechazar la hipótesis nula ( $p=0,00005$ ) (Figura 9).

De acuerdo con la aplicación del modelo pronóstico representado por la ecuación de regresión-4 (Tabla 7) en el grupo de derivación, la probabilidad pronosticada de dengue grave en un paciente pediátrico ( $\leq 15$  años) con niveles séricos superiores o iguales a 5,29 nmol/mg de proteína fue de 0,643 (IC95% 0,454 a 0,796), en cambio, la probabilidad pronosticada de dengue grave en un paciente pediátrico con niveles séricos inferiores al umbral óptimo fue estimada en 0,062 (IC95% 0,016 a 0,218).

**Tabla 4. Parámetros de validez y seguridad diagnóstica de los puntos de corte óptimo estimados para los niveles séricos de carbonilos proteicos en una población pediátrica. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016**

Parámetros	PCOs (18,50 nmol/mL)	IC95%	PCOs (5,29 nmol/mg de proteína)	IC95%
Sensibilidad (%)	85,0	66,9% a 100,0%	90,0	74,4% a 100,0%
Especificidad (%)	72,5	57,4% a 87,6%	75,0	60,3% a 89,7%
Eficiencia de la prueba (%)	76,7	64,6% a 85,6%	80,0	69,1% a 91,0%
VPP (%)	60,7	40,8% a 80,6%	64,3	44,8% a 83,8%
VPN (%)	90,6	79,0% a 100,0%	93,8	83,8% a 100,0%

PCOs: carbonilos proteicos; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

**Tabla 5. Parámetros de validez y seguridad diagnóstica de los puntos de corte óptimo estimados para las actividades enzimáticas séricas estimadas para la superóxido dismutasa mitocondrial, superóxido dismutasa total y superóxido dismutasa citosólica en una población pediátrica. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016**

Parámetros	SOD total (3,17 U/mL)	IC95%	Cu/ZnSOD (1,77 U/mL)	IC95%
Sensibilidad (%)	85,0	66,9% a 100,0%	95,0	83,0% a 100,0%
Especificidad (%)	37,5	21,3% a 53,8%	45,0	28,3% a 61,7%
Eficiencia de la prueba (%)	53,3	40,9% a 65,4%	55,0	42,5% a 66,9%
VPP (%)	40,5	24,4% a 56,5%	46,3	29,9% a 62,8%
VPN (%)	83,3	63,3% a 100,0%	94,7	82,1% a 100,0%

MnSOD: superóxido dismutasa mitocondrial; Cu/ZnSOD: superóxido dismutasa citosólica;  
VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo

**Tabla 6. Modelos de regresión logística binaria para pronosticar severidad del dengue en una población pediátrica, utilizando las concentraciones séricas de carbonilos proteicos. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016**

<b>Primer modelo de regresión logística binaria (MP-1)</b>					
<b>Predictor</b>	<b>B</b>	<b>Estadístico de Wald (gl)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Exp(B)</b>	<b>IC95%</b>
PCOs	0,28	14,41 (1)	0,0002	1,32	1,15 a 1,53
Constante	-6,36	16,12 (1)	0,0001	0,002	
<b>Ecuación de regresión-1: <math>\ln(p/1-p) = -6,36 + 0,28</math> (PCOs del paciente)</b>					
<b>Remuestreo del primer modelo de regresión logística binaria (10 000 muestras)</b>					
<b>Predictor</b>	<b>Sesgo</b>	<b>p-valor</b>			
PCOs	0,02	0,0001			
Constante	-0,43	0,0003			
<b>Ecuación de regresión-1 corregida: <math>\ln(p/1-p) = -5,93 + 0,26</math> (PCOs del paciente)</b>					
<b>Segundo modelo de regresión logística binaria (MP-2)</b>					
<b>Predictor</b>	<b>B</b>	<b>Estadístico de Wald (gl)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Exp(B)</b>	<b>IC95%</b>
PCOs-A	0,75	13,98 (1)	0,0002	2,12	1,43 a 3,14
Constante	-5,39	16,29 (1)	0,0001	0,004	
<b>Ecuación de regresión-2: <math>\ln(p/1-p) = -5,39 + 0,75</math> (PCOs-A del paciente)</b>					
<b>Remuestreo del segundo modelo de regresión logística binaria (10 000 muestras)</b>					
<b>Predictor</b>	<b>Sesgo</b>	<b>p-valor</b>			
PCOs-A	0,05	0,0002			
Constante	-0,35	0,0001			
<b>Ecuación de regresión-2 corregida: <math>\ln(p/1-p) = -5,04 + 0,70</math> (PCOs-A del paciente)</b>					

PCOs: carbonilos proteicos concentración no ajustada; PCOs-A: carbonilos proteicos concentración ajustada; B: parámetro dependiente de la relación biomarcador-dengue grave; Exp(B): exponencial del parámetro B; p: probabilidad que tiene un paciente pediátrico de progresar a dengue; MP: modelo pronóstico  
Método de selección de predictores hacia adelante-condicional

**Tabla 7. Modelos de regresión logística binaria para pronosticar severidad del dengue en una población pediátrica, utilizando los puntos de corte óptimos de las concentraciones séricas de carbonilos proteicos. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016**

<b>Tercer modelo de regresión logística binaria (MP-3)</b>					
<b>Predictor (punto de corte)</b>	<b>B</b>	<b>Estadístico de Wald (gl)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Exp(B)</b>	<b>IC95%</b>
PCOs (18,50 nmol/mL)	2,70	14,127 (1)	0,0002	14,94	3,65 a 61,20
Constante	-2,27	13,933 (1)	0,0002	0,103	
<b>Ecuación de regresión-3:</b> $\text{Ln}(p/1-p) = -2,27 + 2,70 (\text{PCOs del paciente} \geq 18,50 \text{ nmol/mL})$					
<b>Remuestreo del tercer modelo de regresión logística binaria (10 000 muestras)</b>					
<b>Predictor (punto de corte)</b>	<b>Sesgo</b>	<b>p-valor</b>			
PCOs (18,50 nmol/mL)	0,97	0,0001			
Constante	-0,95	0,0003			
<b>Ecuación de regresión-3 corregida:</b> $\text{Ln}(p/1-p) = -1,32 + 1,73 (\text{PCOs del paciente} \geq 18,50 \text{ nmol/mL})$					
<b>Cuarto modelo de regresión logística binaria (MP-4)</b>					
<b>Predictor (punto de corte)</b>	<b>B</b>	<b>Estadístico de Wald (gl)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Exp(B)</b>	<b>IC95%</b>
PCOs-A (5,29 nmol/mg de proteína)	3,30	15,77 (1)	0,0001	27,00	5,31 a 137,36
Constante	-2,71	16,75 (1)	0,0002	0,07	
<b>Ecuación de regresión-4:</b> $\text{Ln}(p/1-p) = -2,71 + 3,30 (\text{PCOs-A del paciente} \geq 5,29 \text{ nmol/mg de proteína})$					
<b>Remuestreo del cuarto modelo de regresión logística binaria (10 000 muestras)</b>					
<b>Predictor (punto de corte)</b>	<b>Sesgo</b>	<b>p-valor</b>			
PCOs-A (5,29 nmol/mg de proteína)	0,45	0,0001			
Constante	-0,42	0,001			
<b>Ecuación de regresión-4 corregida:</b> $\text{Ln}(p/1-p) = -2,29 + 2,85 (\text{PCOs-A del paciente} \geq 5,29 \text{ nmol/mg de proteína})$					

PCOs: carbonilos proteicos concentración no ajustada; PCOs-A: carbonilos proteicos concentración ajustada;  
 B: parámetro dependiente de la relación biomarcador-dengue grave; Exp(B): exponencial del parámetro B.  
 p: probabilidad que tiene un paciente pediátrico de progresar a dengue; MP: modelo pronóstico  
 Método de selección de predictores hacia adelante-condicional

**Tabla 8. Comparación de los parámetros de validez y seguridad diagnóstica de los modelos pronósticos de dengue grave en población pediátrica, estimados por análisis de regresión logística binaria y por análisis de regresión probit binario. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016**

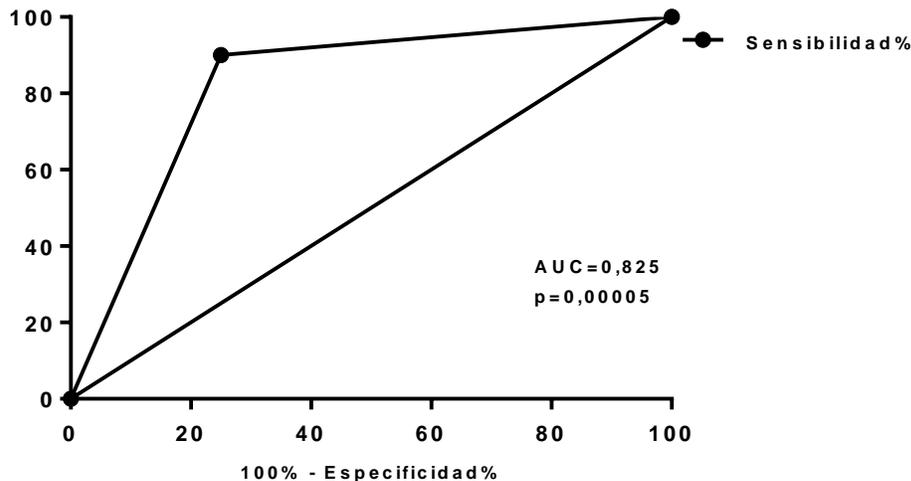
	CA vs. CNA		PD vs. PC	
	MP-1 vs MP-2	MP-3 vs MP-4	MP-1 vs MP-3	MP-2 vs MP-4
Sensibilidad (IC95% <sub>dif</sub> )	-19,0% a 36,8%	-17,4% a 27,2%	-7,0% a 43,8%	7,2% a 57,0%
Especificidad (IC95% <sub>dif</sub> )	-9,9% a 24,5%	-16,5% a 21,3%	-13,8% a 23,4%	-7,8% a 27,1%
VPP (IC95% <sub>dif</sub> )	-23,7% a 32,8%	-2,2% a 42,3%	-23,8% a 27,3%	-27,4% a 26,2%
VPN (IC95% <sub>dif</sub> )	-15,3% a 19,5%	-12,1% a 18,6%	-8,4% a 25,3%	-2,2% a 29,7%

MP: modelo pronóstico; DCSA: dengue con signos de alarma; CA: concentración ajustada; CNA: concentración no ajustada; PD: predictor dicotomizado; PC: predictor continuo; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; IC95%<sub>dif</sub>: intervalo de confianza del 95% de la diferencia de dos proporciones independientes

**Tabla 9. Comparación de índices de exactitud de los modelos pronósticos de dengue grave en población pediátrica, estimados por análisis de regresión logística binaria y por análisis de regresión probit binario. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016**

	CA vs. CNA		PD vs. PC	
	MP-1 vs MP-2	MP-3 vs MP-4	MP-1 vs MP-3	MP-2 vs MP-4
Eficiencia de la prueba (IC95% <sub>dif</sub> )	-13,9% a 17,1%	-11,4% a 17,9%	-12,1% a 18,6%	-10,0% a 19,7%

MP: modelo pronóstico; DCSA: dengue con signos de alarma; CA: concentración ajustada; CNA: concentración no ajustada; PD: predictor dicotomizado; PC: predictor continuo; IC95%<sub>dif</sub>: intervalo de confianza del 95% de la diferencia de dos proporciones independientes



**Figura 9. Curva ROC del modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,29 nmol de PCOs/mg de proteínas, aplicado a las muestras de suero de pacientes pediátricos con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de derivación, Barranquilla, 2014-2016**

### 5.6 Transportabilidad del mejor modelo pronóstico

Con la aplicación del modelo pronóstico, basado en el punto de corte óptimo ( $\geq 5,29$  nmol de PCOs/mg de proteína), en el grupo de muestras de suero de pacientes con dengue grave y dengue con signos de alarma remitidas al INS-Perú (grupo de validación externa), se calculó una AUC de 83,8% (IC95% 74,4% a 93,2%).

Otro rasgo de la transportabilidad de este modelo pronóstico consistió en la fuerte evidencia de los datos para rechazar la hipótesis nula ( $p=0,00002$ ) (Figura 10).

Como se mencionó anteriormente, no se pudo evaluar la calibración del modelo en este nuevo grupo de pacientes, mediante la prueba Hosmer-Lemeshow, pero sí por la puntuación de eficiencia estadística de ROA (prueba Ji-cuadrado en la prueba de ómnibus:  $X^2=26,92$ ; gl: 1;  $p\leq 0,00001$ ).

De acuerdo con la aplicación del modelo pronóstico representado por la ecuación de regresión-4 (Tabla 7) en el grupo de validación externa, la probabilidad pronosticada de

dengue grave en un paciente con niveles séricos superiores o iguales a 5,29 nmol/mg de proteína fue de 0,667 (IC95% 0,473 a 0,817), en cambio, la probabilidad pronosticada de dengue grave en un paciente pediátrico con niveles séricos inferiores al umbral óptimo fue estimada en 0,061 (IC95% 0,015 a 0,212). Estos valores de probabilidad son similares a los estimados en el grupo de derivación ( $\geq 5,29$  nmol de PCOs/mg de proteína: IC95%<sub>dif</sub> - 0,253 a 0,296;  $< 5,29$  nmol de PCOs/mg de proteína: IC95%<sub>dif</sub> - 0,126 a 0,128).

Se encontró un excelente poder de discriminación del modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,29 nmol de PCOs/mg de proteína en la población pediátrica peruana (estadístico  $c=0,925$ ; IC95% 0,845 a 1,00), pero tan solo una buena discriminación en los pacientes mayores de 15 años (estadístico  $c=0,779$ ; IC95% 0,638 a 0,919). A pesar de esta diferencia, no se encontró evidencia de asociación estadística entre la capacidad discriminativa de este modelo pronóstico con las dos franjas etarias evaluadas en el grupo de validación externa (prueba de Ji-cuadrado=3,16; gl: 1;  $p=0,076$ ).

Eso sí, destaca la similitud detectada entre la magnitud y el excelente poder de discriminación de los puntos de corte óptimos estimados en los pacientes pediátricos del grupo de validación externa y en el grupo de derivación (5,19 nmol de PCOs/mg de proteína; estadístico  $c=0,925$  vs. 5,29 nmol de PCOs/mg de proteína; estadístico  $c=0,825$ , respectivamente; prueba de Ji-cuadrado=2,46; gl: 1;  $p=0,117$ ).

Al llegar a este punto y considerando que a diferencia de los pacientes procedentes de Barranquilla-Colombia, la población peruana estuvo constituida por niños y adultos, se decidió utilizar la estrategia de validación retrospectiva, en otras palabras, se cambió el rol del grupo de pacientes peruanos, utilizándolo como un grupo de derivación y se tomó al grupo de pacientes pediátricos de Barranquilla-Colombia, como grupo de validación externa.

En esta nueva perspectiva, el AUC de los niveles séricos ajustados de PCOs fue calculada en 90,0% (IC95% 81,8% a 98,2%), siendo identificado como punto óptimo diagnóstico: 5,77 nmol de PCOs/mg de proteína ( $J=0,73$ ) (Figura 11). Cabe considerar que la evidencia en los datos contra la hipótesis nula fue muy fuerte, lo cual sustentó la decisión de rechazarla ( $p<0,0001$ ).

En la Tabla 10, se presentan los resultados de la regresión logística binaria utilizando el punto óptimo diagnóstico estimado (5,77 nmol de PCOs/mg de proteína). Al mismo tiempo, se presentan los resultados de la simulación de muestreo basado en 10.000 muestras de simulación de muestreo. El anterior modelo de regresión (MP-5) pudo ser evaluado con la puntuación de eficiencia estadística de ROA (prueba Ji-cuadrado en la prueba de ómnibus:  $X^2=24,92$ ; gl: 1;  $p \leq 0,00001$ ), como medida de bondad de ajuste.

Aproximadamente, el 67,4% de la varianza del criterio puede ser explicado por el modelo basado en el punto de corte de 5,77 nmol de PCOs/mg de proteína (pseudo- $R^2$  de Nagelkerke=0,674) con un excelente poder de discriminación (estadístico  $c=0,900$ ; IC95% 0,806 a 0,994;  $p < 0,0001$ ).

Se encontró evidencia tanto de la validez externa del modelo en cuestión como del aporte significativo de la aplicación del punto de corte 5,77 nmol de PCOs/mg de proteína, a la predicción de la severidad del dengue en la población peruana estudiada (estadístico de Wald=23,17; gl: 1;  $p \leq 0,00001$ ) (Tabla 10).

También, se estimaron los parámetros de validez diagnóstica de este punto de corte, encontrándose valores de sensibilidad y especificidad de 90,0%, para cada uno (sensibilidad: 18/20; IC95% 74,4% a 100,0% y especificidad: 36/40; IC95% 79,5% a 100,0%), junto a una alta confiabilidad en los resultados negativos y positivos (valor predictivo negativo: 94,7%; 36/38; IC95% 86,3% a 100,0% y valor predictivo positivo: 81,8%; 18/22; IC95% 63,4% a 100,0%).

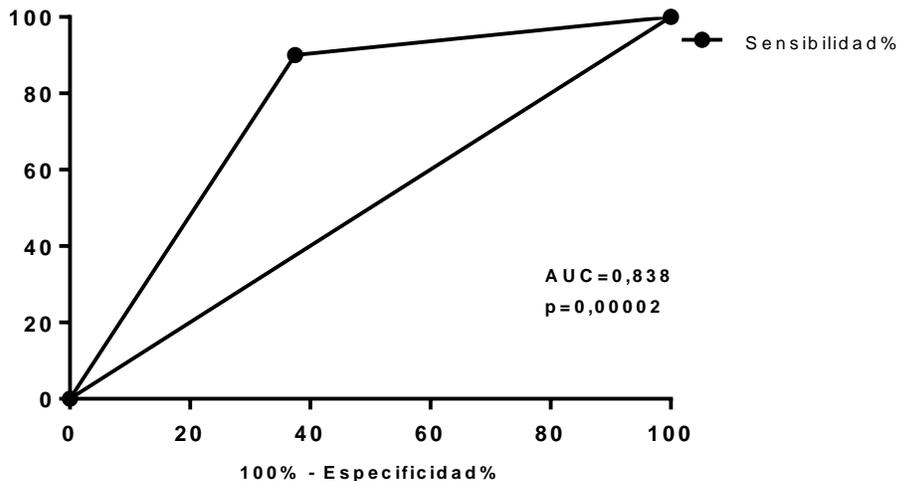


Figura 10. Curva ROC del modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,29 nmol de PCOs/mg de proteínas, aplicado a las muestras de suero de pacientes con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de validación externa, Perú, 2018

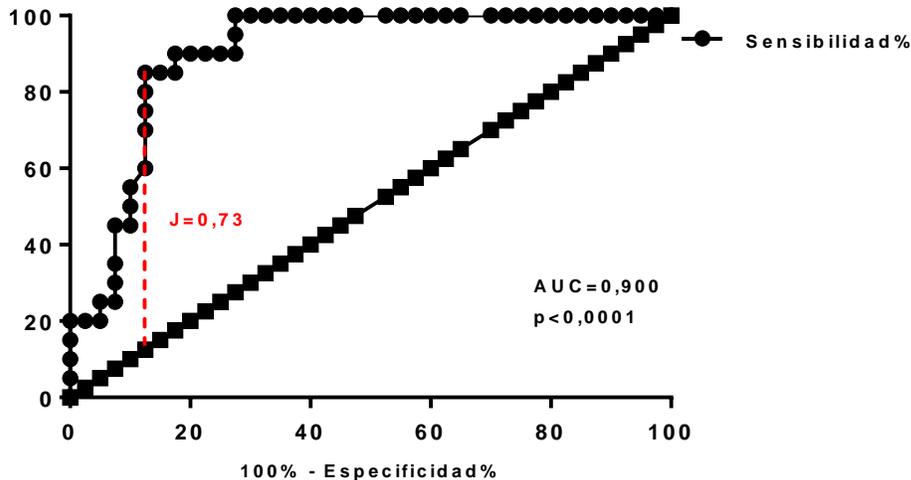


Figura 11. Curva ROC de las concentraciones ajustadas de carbonilos proteicos (PCOs-A) en las muestras de suero de pacientes con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de derivación, Perú, 2018. Estrategia de validación retrospectiva

Con la aplicación del modelo pronóstico, basado en el punto de corte óptimo ( $\geq 5,77$  nmol de PCOs/mg de proteína), en el grupo de muestras de suero de pacientes pediátricos con

dengue grave y dengue con signos de alarma, procedente de Barranquilla-Colombia (grupo de validación externa), se calculó una AUC de 82,5% (IC95% 72,3% a 98,7%).

Otro rasgo de la validez externa de este modelo pronóstico consistió en una fuerte evidencia de los datos contra la hipótesis nula ( $p < 0,0001$ ) (Figura 12). La calibración del modelo en este nuevo grupo de pacientes, fue evaluada con la puntuación de eficiencia estadística de ROA (prueba Ji-cuadrado en la prueba de ómnibus:  $X^2=23,18$ ; gl: 1;  $p < 0,00001$ ).

En la Tabla 11, se muestran los resultados obtenidos de la comparación de la capacidad discriminativa de los modelos pronósticos, basados en los puntos óptimos diagnósticos, estimados en el grupo de derivación y transportado al grupo de validación, por la estrategia de doble validación cruzada (prospectiva y retrospectiva).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de validez y seguridad diagnóstica de los dos modelos pronósticos estimados (MP-4 vs. MP-5, sensibilidad: 18/20 vs. 18/20, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> -21,5% a 21,5%; especificidad: 30/40 vs. 36/40, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> -2,0% a 31,4%; valor predictivo positivo: 18/28 vs. 18/22, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> -7,7% a 39,0%; valor predictivo negativo: 30/32 vs. 36/38, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> -11,9% a 15,4%). Tampoco, se encontró diferencia significativa al comparar los valores globales de los modelos pronósticos (eficiencia: 48/60 vs. 54/60, respectivamente; IC95%<sub>dif</sub> -3,0% a 22,9%).

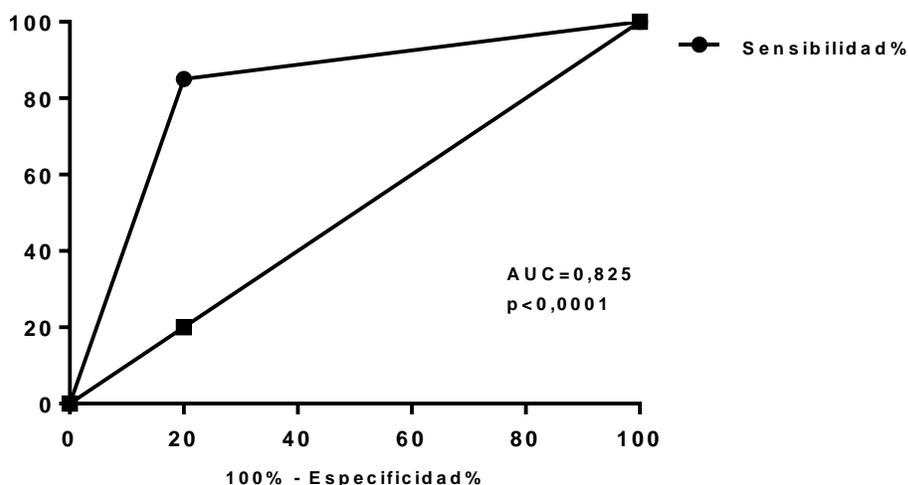
De acuerdo con la aplicación del modelo pronóstico representado por la ecuación de regresión de la Tabla 10 en el nuevo grupo de derivación, la probabilidad pronosticada de dengue grave en un paciente con niveles séricos superiores o iguales a 5,77 nmol/mg de proteína fue de 0,818 (IC95% 0,604 a 0,903), en cambio, la probabilidad pronosticada de dengue grave en un paciente con niveles séricos inferiores al umbral óptimo fue estimada en 0,053 (IC95% 0,013 a 0,187).

Y su aplicación en el nuevo grupo de validación externa, la probabilidad pronosticada de dengue grave en un paciente con niveles séricos superiores o iguales a 5,77 nmol/mg de proteína fue de 0,680 (IC95% 0,478 a 0,831), en cambio, la probabilidad pronosticada de

dengue grave en un paciente pediátrico con niveles séricos inferiores al umbral óptimo fue estimada en 0,086 (IC95% 0,028 a 0,234).

Estos valores de probabilidad son similares a los estimados en el grupo de derivación ( $\geq 5,77$  nmol de PCOs/mg de proteína: IC95%<sub>diff</sub> -0,166 a 0,349;  $< 5,77$  nmol de PCOs/mg de proteína: IC95%<sub>diff</sub> -0,100 a 0,154).

Por último, cabe destacar que ninguna de las variables clínicas o de laboratorio de interés, que mostraron asociación estadística con la severidad del dengue, aportaron significativamente a la capacidad discriminativa de los modelos pronósticos definitivos (Tabla S3, Material Suplementario).



**Figura 12. Curva ROC del modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,77 nmol de PCOs/mg de proteínas, aplicado a las muestras de suero de pacientes pediátricos con dengue grave y con dengue con signos de alarma. Grupo de validación externa, Barranquilla, 2014-2016. Estrategia de validación retrospectiva**

**Tabla 10. Modelos de regresión logística binaria para pronosticar severidad del dengue en una población, utilizando el punto de corte óptimo de las concentraciones séricas de carbonilos proteicos. Grupo de derivación, Perú, 2018. Estrategia de validación retrospectiva**

<b>Quinto modelo de regresión logística binaria (MP-5)</b>					
<b>Predictor (punto de corte)</b>	<b>B</b>	<b>Estadístico de Wald (gl)</b>	<b>p-valor</b>	<b>Exp(B)</b>	<b>IC95%</b>
PCOs-A (5,77 nmol/mg de proteína)	4,39	23,17 (1)	≤0,00001	81,00	13,54 a 484,76
Constante	-2,89	15,83 (1)	0,00007	0,056	
<b>Ecuación de regresión-5: <math>\ln(p/1-p) = -2,89 + 4,39</math> (PCOs-A del paciente <math>\geq 5,77</math> nmol/mg de proteína)</b>					
<b>Remuestreo del modelo de regresión logística binaria (10 000 muestras)</b>					
<b>Predictor (punto de corte)</b>	<b>Sesgo</b>	<b>p-valor</b>			
PCOs-A (5,77 nmol/mg de proteína)	2,74	0,0001			
Constante	-2,37	0,0004			
<b>Ecuación de regresión-5 corregida: <math>\ln(p/1-p) = -5,63 + 2,02</math> (PCOs-A del paciente <math>\geq 5,77</math> nmol/mg de proteína)</b>					

PCOs: carbonilos proteicos concentración no ajustada; PCOs-A: carbonilos proteicos concentración ajustada;  
 B: parámetro dependiente de la relación biomarcador-dengue grave; Exp(B): exponencial del parámetro B.  
 p: probabilidad que tiene un paciente pediátrico de progresar a dengue.  
 Método de selección de predictores hacia adelante-condicional

**Tabla 11.** Comparación de la capacidad discriminativa de los modelos de regresión logística binaria para pronosticar severidad del dengue en una población, utilizando el punto de corte óptimo de las concentraciones séricas ajustadas de carbonilos proteicos. Estrategias de validación prospectiva y retrospectiva

Estrategia de validación	Prospectiva	Retrospectiva
Población objeto de estudio	MP-4 Estadístico c (IC95%)	MP-5 Estadístico c (IC95%)
Grupo de derivación	0,825 (0,729 a 0,921)	0,900 (0,818 a 0,982)
Grupo de validación externa	0,838 (0,744 a 0,932)	0,825 (0,723 a 0,987)
p-valor	0,855	0,262
X <sup>2</sup> (gl)	0,03 (1)	1,26 (1)

MP-4:  $\ln(p/1-p) = -2,71 + 3,30$  (PCOs-A del paciente  $\geq 5,29$  nmol/mg de proteína)

MP-5:  $\ln(p/1-p) = -2,89 + 4,39$  (PCOs-A del paciente  $\geq 5,77$  nmol/mg de proteína)

Prueba de homogeneidad de área, X<sup>2</sup>: estadístico Ji-cuadrado; gl: grados de libertad

## **CAPÍTULO 6**

## 6. Discusión

De acuerdo con las cifras de morbilidad reportadas, el dengue es considerada la enfermedad transmitida por vectores artrópodos más importante en el mundo <sup>95</sup>. Por ello se considera prioritario realizar avances en la detección temprana de los pacientes con mayor probabilidad de desarrollar cuadros severos <sup>166, 188</sup>.

En atención a la problemática expuesta, en la presente investigación, con diseño de casos y controles, se evalúa el potencial pronóstico de severidad de cinco marcadores de estrés oxidativo (carbonilos proteicos, hidroperóxidos lipídicos, superóxido dismutasa mitocondrial, superóxido dismutasa citosólica y superóxido dismutasa total) en pacientes con diagnóstico de dengue.

En primer lugar y con la finalidad de explorar la homogeneidad entre los dos grupos de pacientes estudiados, se revisan las posibles relaciones entre las características sociodemográficas, clínicas, de laboratorio y virológicas con la severidad del dengue.

Indistintamente del grupo al que pertenecen, los casos y los controles seleccionados resultan ser similares en cuanto a edad y sexo. En el contexto de la búsqueda de marcadores pronóstico de severidad del dengue, este hallazgo resulta relevante, dado que existen reportes que señalan no solo la importancia de la edad del paciente en el desenlace clínico de las infecciones por este arbovirus <sup>189-195</sup>, sino que también existen evidencias discordantes entre la relación del sexo masculino <sup>196-199</sup> o femenino <sup>188, 200</sup> con el desarrollo de cuadros de dengue con mayor severidad. En general, se considera que la distribución de esta última variable sociodemográfica en los casos de dengue parece estar más relacionada con su distribución en la población en riesgo de infección por dengue <sup>201</sup>.

Con respecto a los días de evolución del estado febril registrados, que se encuentran dentro del período de defervescencia <sup>31</sup>, se observa una igualdad estadística entre los pacientes con dengue grave y con dengue con signos de alarma, tanto en el grupo de derivación como en el de validación externa. Este comportamiento resulta coherente con lo reportado por otros autores <sup>202-205</sup>. En este punto, es importante señalar la aparente discordancia entre la igualdad estadística detectada y la moderada asociación estadística encontrada entre la presencia de dengue grave y los días de evolución de la enfermedad en el grupo de

validación externa. Lo anterior podría ser explicado por la capacidad que posee la estimación de los intervalos de confianza de la diferencia para establecer diferencias estadísticamente significativas entre variables o entre grupos <sup>206, 207</sup>, lo cual no puede ser establecido con la interpretación de un p-valor estimado a partir de una prueba de hipótesis <sup>207, 208</sup>.

La mayor frecuencia de complicaciones en los pacientes con dengue grave en comparación con los pacientes con dengue con signos de alarma <sup>209</sup>, podría explicar la diferencia detectada entre la permanencia hospitalaria promedio de estos dos tipos de pacientes.

La mayoría de los casos seleccionados en este estudio presentaron sintomatología consistente con dos categorías de dengue grave, pérdida plasmática grave y compromiso orgánico grave. Lo anterior ha sido reportado por Thanachartwet, *et al.* <sup>210</sup>, por Thomas, *et al.* <sup>197</sup> y por Fernandez, *et al.* <sup>211</sup>, en pacientes adultos; pero también en población pediátrica, por Londoño y cols. <sup>212</sup>, Lugo y cols. <sup>213</sup>, Alvarado, *et al.* <sup>214</sup> y por Ledika *et al.* <sup>215</sup>.

La presencia de ciertos signos de alarma en el paciente con dengue, entre los que se incluye el estado letárgico, puede anunciar su progresión a un estado de choque <sup>216</sup>, el cual sería resultado de una pérdida severa de plasma que puede conducir a una acumulación de líquido con aparición de distrés respiratorio agudo, como complicación en el paciente <sup>31, 217</sup>.

La relación estadística entre la presencia de la letargia y del distrés respiratorio con el dengue grave fue encontrada en los datos de la población peruana. Dicho lo anterior, la posible interpretación ambigua de letargia por parte del paciente y su dificultad para realizar una diferenciación objetiva con el cansancio <sup>115</sup>, podría explicar la imprecisión encontrada en la medida del tamaño del efecto estimado para este signo de alarma en el grupo de validación externa. Incluso, estas dos limitaciones han sido razones para excluir a la presencia de letargia de la búsqueda de predictores de severidad en otras poblaciones con dengue <sup>114</sup>.

Con referencia al síndrome de distrés respiratorio agudo, existen varios reportes de su asociación con la severidad del dengue en adultos <sup>218, 219</sup> y en niños <sup>220</sup>. Se entiende que la

severidad de esta enfermedad tropical está determinada por un incremento transitorio en la permeabilidad vascular, dentro de un contexto de homeostasis alterada, resultando en una pérdida plasmática progresiva en diversas cavidades serosas del cuerpo <sup>221-223</sup>, como por ejemplo, la filtración de líquido intersticial dentro de los alveolos y los pulmones, propia del síndrome de distrés respiratorio agudo <sup>218</sup>.

En el presente estudio, la presencia de trombocitopenia presentó una fuerte asociación con la severidad del dengue en el grupo de derivación. Este hallazgo de laboratorio es uno de los más frecuentemente reportados en pacientes con diagnóstico de dengue grave <sup>195, 224, 225</sup>. Esta alteración del hemograma podría ser originada tanto por la disminución en la producción de plaquetas por daño a los megacariocitos como por la destrucción plaquetaria mediada por mecanismo inmunológico <sup>161, 195, 226</sup>.

El proceso inflamatorio derivado de la infección DENV conlleva la formación de lesiones en el parénquima hepático, las cuales producen una elevación sérica de las enzimas aminotransferasas en el hospedador <sup>227, 228</sup>.

En el grupo de derivación, se encontró evidencia de fuerte asociación estadística entre las concentraciones séricas alteradas de las aminotransferasas y el dengue grave, siendo el tamaño del efecto superior para los niveles séricos de GOT, en comparación con la enzima GPT. De manera semejante, se ha reportado este patrón en otras poblaciones pediátricas <sup>213, 228, 229</sup>.

La frecuencia de casos de dengue grave es superior en el grupo de pacientes con evidencia de infección secundaria por serotipo DENV heterólogo que en el grupo de pacientes que cursaron primoinfección por un serotipo DENV <sup>230</sup>, lo cual es coherente con la hipótesis de la participación de la amplificación dependiente de anticuerpo en la inmunopatogénesis del dengue <sup>161</sup>.

Algunas explicaciones para la aparición de casos de dengue grave en pacientes con evidencia serológica de primoinfección van desde una posible coinfección con más de un serotipo DENV hasta la participación de factores desconocidos dependientes del hospedador o del agente vírico <sup>231</sup>. En esta investigación se encontró un mayor, pero no

significativo, porcentaje de reinfección en los casos que en los controles. Ninguna de las posibles explicaciones antes mencionadas puede ser descartada en el grupo de pacientes pediátricos.

A continuación, se analiza el comportamiento de las concentraciones séricas estimadas para cada biomarcador de estrés oxidativo en los diferentes tipos de pacientes incluidos en el presente estudio, con la finalidad de tener, desde el nivel relacional de la investigación, un acercamiento estadístico que permita la identificación del mejor biomarcador candidato para el pronóstico de dengue grave.

En ambos grupos, los valores séricos de PCOs estimados no pueden ser comparados con los niveles séricos reportados por otros autores<sup>40, 73, 232</sup>, a causa de las diferentes medidas de tendencia central y de dispersión utilizadas.

Tanto en el grupo de derivación como en el de validación externa, se encontraron concentraciones séricas de PCOs, ajustadas y no ajustadas, significativamente superiores en los casos en comparación con los controles. Conforme con esto, se pudo rechazar la hipótesis nula planteada para este propósito estadístico, dado que se encontró una fuerza de la evidencia de los datos contra la hipótesis nula muy fuerte.

Lo anterior muestra coherencia con la evidencia publicada por Soundravally, *et al.*<sup>40, 73</sup>, en individuos con infección DENV y en adultos sanos, durante un brote por DENV-3 en una ciudad costera de India. Si bien es cierto que en estos dos referentes se reportan altos niveles séricos ajustados de PCOs en pacientes adultos con dengue hemorrágico y con síndrome de choque por dengue en comparación con los pacientes con fiebre dengue, la significancia de estas diferencias está basada en la interpretación de p-valores obtenidos por ANOVA de un factor. Ahora bien, al estimar los intervalos de confianza para la diferencia entre dos medias con los datos publicados por este autor, se observan diferencias estadísticamente significativas similares a las reportadas en el presente estudio.

Lo dicho hasta aquí permite sugerir que los casos más severos de dengue presentan una mayor concentración de proteínas irreversiblemente alteradas por oxidación, comparados con casos de menor severidad y con controles sanos.

Uno de los principales mecanismos vinculados a este tipo de modificación química de proteínas resulta ser la producción incrementada de ROS intracelular<sup>54, 233</sup>, siendo la mitocondria el principal sitio celular generador de este tipo de especies químicamente reactivas<sup>234</sup>. Dicho de otra manera, la determinación de PCOs resulta ser una buena medida para evaluar la oxidación de proteínas mediada por ROS de origen mitocondrial<sup>234, 235</sup>.

En concordancia con lo anterior, hay que destacar que la señalización inducida por el TNF- $\alpha$ , vía su receptor TNF-R1, tiene la capacidad de inducir la producción de ROS mitocondriales<sup>236</sup>.

Llegado a este punto, se hace necesario retomar la posible relación entre la severidad del dengue y la carbonilación proteica, destacando que la producción de ROS dependiente de TNF- $\alpha$ , es un evento crítico en el desarrollo de hemorragias en modelos murinos infectados con DENV-2<sup>237</sup>.

Aquí conviene hacer una pequeña digresión sobre un segundo mecanismo productor de carbonilos proteicos, en el cual participan productos inestables, derivados de la lipoperoxidación, tales como: malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal (4-HNE), 4-hidroxiálquenos (4-HAE) y 2-propenal (acroleína)<sup>238</sup>.

En dos revisiones sistemáticas realizadas sobre el papel del estrés oxidativo-nitrosativo en la patogénesis del dengue<sup>239, 240</sup>, se reportaron: (I) altas concentraciones de MDA en los casos más severos de dengue; (II) correlación positiva entre los niveles séricos de MDA y de TNF- $\alpha$  en pacientes con mayor severidad y (III) niveles séricos y tisulares de MDA significativamente superiores en ratones infectados con DENV-2, en comparación con ratones sanos.

Como complemento, se estimaron los niveles séricos de PCOs en pacientes con dengue sin signos de alarma, con infección por ZIKV y con evidencia de reacción cruzada entre DENV y otro arbovirus.

Sobre la base de la relación detectada entre la carbonilación proteica y el dengue grave, es conveniente anotar la similitud estadística encontrada entre las concentraciones séricas de PCOs, ajustadas y no ajustadas, estimadas en los cuatro grupos de pacientes diferentes a los de dengue grave.

En definitiva, los niveles séricos de PCOs, ajustados y no ajustados, parecen ser buenos candidatos para evaluar su potencial pronóstico de severidad en pacientes con dengue.

En cuanto a la SOD, recientemente, Cherupanakkal, *et al.*<sup>241</sup>, reportaron que los niveles de expresión génica de su isoforma mitocondrial y de otras enzimas antioxidantes no se asociaron con la severidad del dengue, durante la fase de defervescencia, en una población de niños y adultos clasificados con el actual sistema OMS-2009. Estos autores intentan explicar estos resultados considerando la participación de factores dependientes del agente vírico en la regulación decreciente de las enzimas antioxidantes en el curso clínico del dengue.

Relacionado con lo anterior, en el presente estudio no se detectaron diferencias significativas al comparar la actividad enzimática de MnSOD en pacientes con dengue grave y con dengue con signos de alarma. De hecho, esta misma similitud estadística fue observada tanto en adultos como en niños. Coherentemente, no se pudo rechazar la hipótesis nula planteada para esta situación, debido a que la fuerza de la evidencia de los datos contra ella fue muy débil.

En conjunto, estas evidencias permiten sugerir la posibilidad de que la actividad antioxidante de esta isoforma mitocondrial de SOD no participa en la patogénesis del dengue grave.

Dentro de las posibles explicaciones a estos resultados, además de las consideradas por los autores del referente en cuestión, hay que tener en cuenta la presencia de auto-anticuerpos tipo IgM específicos contra MnSOD que pudieran inhibir su actividad enzimática protectora, dado que estos anticuerpos han sido reportados en pacientes que cursan infecciones virales agudas<sup>242, 243</sup>, y se ha demostrado que pueden contribuir con el daño oxidativo de células endoteliales, por acumulación de ROS intracelulares<sup>244</sup>.

Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre las actividades enzimáticas totales de SOD y de la isoenzima Cu/ZnSOD estimadas en casos y en controles. Al respecto, se debe considerar que altas concentraciones de citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , inducidas por la infección DENV, pueden disminuir la expresión génica de enzimas antioxidantes, incluidas SOD <sup>245</sup>.

Aunque la actividad enzimática total de SOD siempre ha sido reportada superior en los pacientes con dengue que en controles sanos <sup>239</sup>, no se tiene conocimiento de la existencia de referentes que permitan comparar el comportamiento de estas enzimas antioxidantes en relación con la severidad descrita en el actual sistema de clasificación de casos.

Es justo decir que no es casualidad que las actividades enzimáticas de MnSOD, Cu/ZnSOD y SOD total resultaran significativamente superiores en los pacientes con dengue grave en comparación con los pacientes con diagnóstico de infección por ZIKV. Análogamente, con la actividad enzimática de MnSOD entre los pacientes con dengue con signos de alarma y los pacientes con infección por ZIKV. Cabría preguntarse si estas evidencias pueden ser un indicio de una participación diferencial del radical anión superóxido o del peróxido de hidrógeno en los mecanismos patogénicos de estos dos flavivirus.

En relación con los LOOHs, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre sus niveles séricos estimados en casos y controles, de los grupos de derivación y de validación externa, y al mismo tiempo, no se pudo rechazar la hipótesis nula, ya que se encontró en los datos, una fuerza de la evidencia muy débil contra ella.

Se han encontrado reportes discordantes en cuanto al comportamiento de este biomarcador de estrés oxidativo en pacientes con dengue <sup>41, 69</sup>. Debido a diferencias metodológicas y analíticas importantes, tales como: la aplicación del anterior sistema de clasificación de casos OMS-1997, la ausencia de métodos de extracción de LOOHs previos a la determinación y el uso del cromógeno naranja de xilenol para detectar los iones férricos, en vez de tiocianato de amonio, lo cual conlleva a utilizar longitudes de ondas diferentes para cuantificar este analito. En consecuencia, no es posible comparar los resultados obtenidos en este estudio con los dos referentes identificados.

Tampoco, se pudo diferenciar a los pacientes con dengue grave de los cuatro grupos de pacientes restantes, utilizando las concentraciones séricas de este producto de la lipoperoxidación. Al respecto, se debe mencionar que metales pesados, con dos o más estados de oxidación, tales como: Fe, Cu y Mn, pueden dar inicio a la lipoperoxidación de un ácido graso insaturado, solamente en presencia de hidroperóxidos <sup>50, 246</sup>.

Esto adquiere importancia al considerar que no existen diferencias significativas en los niveles séricos de hierro y de cobre entre pacientes con dengue grave, con dengue con signos de alarma y con dengue sin signos de alarma <sup>247</sup>.

Para terminar este punto, es oportuno señalar que también se ha encontrado discordancia en la correlación entre las concentraciones de LOOHs y de PCOs en diferentes contextos, como infección vírica en línea celular de insecto <sup>248</sup> y en ejercicios isométricos <sup>249</sup>. Aunque ciertos errores en la etapa pre-analítica y un limitado tamaño de muestra han sido considerados como posibles razones para esta discrepancia, es posible que las diferencias entre las reacciones productoras de estos dos biomarcadores expliquen este fenómeno <sup>250</sup>.

Para la elaboración de las curvas ROC de los biomarcadores de interés, se decidió utilizar el método no paramétrico, puesto que a cada punto constituyente de la curva ROC se le considera un estimador insesgado, es decir, ni sobreestiman ni subestiman los verdaderos valores de la proporción de verdaderos positivos (sensibilidad) y de la proporción de falsos positivos (1 – especificidad) <sup>251</sup>.

Se reconoce al estadístico *c* como una medida global de la exactitud de una prueba diagnóstica, porque este índice permite estimar la probabilidad de que un clasificador ordene o puntúe a un individuo enfermo, elegido al azar del grupo de enfermos, más alto que un individuo sano elegido al azar del grupo de no enfermos <sup>251-253</sup>.

En términos de los estadísticos *c* estimados para las concentraciones séricas de PCOs, ajustadas y no ajustadas, en el grupo de derivación, un individuo seleccionado aleatoriamente del grupo de pacientes pediátricos con dengue grave tendrá, aproximadamente, el 80,0% de las veces un valor de PCOs mayor que un individuo seleccionado aleatoriamente del grupo de pacientes pediátricos con dengue con signos de

alarma. Estos valores de exactitud global son considerados útiles según los criterios de Swets <sup>184</sup>.

La evaluación de la capacidad de discriminación de una prueba diagnóstica puede realizarse verificando si el valor de 0,5 se encuentra incluido en el intervalo de confianza estimado para el estadístico  $c$  <sup>251</sup>. En consecuencia, los niveles séricos de PCOs, ajustados y no ajustados, por igual, son capaces de discernir entre los pacientes pediátricos con dengue grave y los pacientes pediátricos con dengue con signos de alarma.

Estas determinaciones séricas presentaron altos valores de sensibilidad y altos valores predictivos negativos, características operativas preferibles cuando la enfermedad es grave y tratable, y propias de las pruebas diagnósticas aplicadas para la detección precoz de enfermedades <sup>254</sup>.

Salvando las diferencias del vigente sistema de clasificación de casos de dengue con el anterior esquema OMS-1999, resalta que el punto óptimo diagnóstico estimado en el grupo de derivación (5,29 nmol de PCOs/mg de proteína; AUC=80,2%; IC95% 67,2% a 93,2%), se localiza entre los puntos de corte estimados para pronosticar fiebre hemorrágica por dengue (5,22 nmol/mg de proteína; AUC=90,3%; IC95% 83,0% a 97,6%) y síndrome de choque por dengue (6,13 nmol/mg de proteína; AUC=79,2%; IC95% 67,0% a 92,0%) en adultos hindúes <sup>40</sup>. Esta evidencia resulta interesante si se considera que la mayoría de los pacientes, que cumplen los criterios de dengue grave, pueden ser categorizados como pacientes con fiebre hemorrágica por dengue <sup>116</sup>.

Con respecto a la actividad enzimática de MnSOD, esta isoenzima no tiene la capacidad de discernir entre los pacientes pediátricos con dengue grave y los pacientes pediátricos con dengue con signos de alarma. Las concentraciones séricas de LOOHs tampoco permiten discernir entre estos pacientes.

Tanto para la actividad enzimática de SOD total como la de Cu/ZnSOD, la capacidad de discriminación de estos biomarcadores resulta mínima, pero con valores de sensibilidad y valores predictivos negativos entre aceptables y buenos.

En cuanto al modelado estadístico, las concentraciones séricas de PCOs, ajustadas y no ajustadas, fueron las únicas determinaciones séricas incluidas en los modelos pronósticos definitivos, lo cual resulta coherente con los hallazgos encontrados en el análisis de curva ROC de los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados en el grupo de derivación.

Por otro lado, cabe resaltar que todas las puntuaciones de Wald estimadas indican que la determinación sérica de PCOs aporta significativamente a la predicción de la severidad del dengue en la población pediátrica estudiada, y de igual forma, estas puntuaciones indican que los resultados obtenidos de estos modelos pronósticos pueden ser generalizados a la población (Tablas 6 y 7).

Se debe agregar que la medida estandarizada de los exponenciales de  $b$  estimados para la variable predictora dicotomizada, en sus dos presentaciones (niveles séricos ajustados y no ajustados) (Tabla 7), permite señalar que:

- Es 15 veces más probable que un paciente pediátrico evolucione a dengue grave si presenta una concentración sérica de PCOs igual o superior a 18,50 nmol/mL, en comparación con un paciente pediátrico con valores séricos inferiores a ese punto de corte.
- Es 27 veces más probable que un paciente pediátrico evolucione a dengue grave si presenta una concentración sérica de PCOs igual o superior a 5,29 nmol/mg de proteína, en comparación con un paciente pediátrico con valores séricos inferiores a ese punto de corte.

A partir de los efectos marginales de los dos modelos de regresión probit binario presentados en la Tabla S2 (Material Suplementario), se puede mencionar que:

- En promedio, la probabilidad de ocurrencia de dengue grave para esta muestra específica se estimó, aproximadamente, entre 28,0% a 58,0%.

- Si el paciente pediátrico presenta una concentración sérica de 18,50 nmol de PCOs/mL, su probabilidad de evolucionar a dengue grave aumenta, aproximadamente, 51 puntos porcentuales.
- Si el paciente pediátrico presenta una concentración sérica de 5,29 nmol de PCOs/mg de proteína, su probabilidad de evolucionar a dengue grave aumenta, aproximadamente, 26 puntos porcentuales.

Con los resultados obtenidos a partir de la comparación de los dos modelos de regresión aplicados y de la comparación entre los puntos de corte estimados para las concentraciones séricas de PCOs, en sus dos presentaciones, se puede indicar que el mejor modelo pronóstico de severidad del dengue en la población pediátrica estudiada resulta ser el modelo pronóstico obtenido por análisis de regresión logística binaria, basado en el punto de corte de 5,29 nmol de PCOs/mg de proteína.

Los resultados obtenidos de la aplicación de las pruebas de bondad de ajuste al mejor modelo pronóstico estimado, indican que con el uso del punto de corte de 5,29 nmol de PCOs/mg de proteína existe una mejora significativa en la predicción de la probabilidad de la ocurrencia de dengue grave en los pacientes pediátricos evaluados (grupo de derivación).

Es más, el uso de este punto óptimo diagnóstico mostró un cambio significativo en el logaritmo de verosimilitud del modelo ( $-2LL=51,46$ ;  $p=0,00002$ ), cuando fue eliminado de la ecuación de regresión, lo cual indica su participación en la capacidad pronóstica del respectivo modelo.

Ahora bien, con la interpretación del estadístico  $c$  se puede señalar que un paciente pediátrico seleccionado al azar del grupo de pacientes con dengue grave tendrá, aproximadamente, el 83,0% de las veces un valor sérico igual o superior a 5,29 nmol de PCOs/mg de proteína que un paciente pediátrico elegido al azar del grupo de pacientes pediátricos con dengue con signos de alarma. Este valor de exactitud global, también, es considerado útil, según los criterios propuestos por Swets <sup>184</sup>.

Adicional a esto y de acuerdo con la evaluación de la capacidad de discriminación, con el uso de este punto óptimo diagnóstico se puede discernir entre los pacientes pediátricos con dengue grave y los pacientes pediátricos con dengue con signos de alarma.

Los valores porcentuales de sensibilidad y especificidad estimados para este punto óptimo diagnóstico, indican una mejor capacidad para identificar los niños con dengue grave en comparación con su capacidad para identificar los niños sin dengue grave.

Algo similar se encontró con la interpretación de los parámetros de seguridad diagnóstica calculados ya que, aproximadamente, el 64,0% de los pacientes pediátricos con niveles séricos de PCOs iguales o mayores a 5,29 nmol/mg de proteína presentan dengue grave, y, aproximadamente, el 94,0% de los pacientes pediátricos con niveles séricos de PCOs inferiores a este punto de corte óptimo, no presentan dengue grave.

La validez interna de un modelo pronóstico consiste en que éste mantenga su precisión cuando sea aplicado a pacientes obtenidos del mismo grupo de derivación del modelo utilizando, por ejemplo, la estrategia de bootstrapping de un modelo pronóstico basado en un análisis de regresión logística, la cual es considerada superior a la estrategia de validación en muestra dividida <sup>255, 256</sup>.

Luego del remuestreo, el modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,29 nmol de PCOs/mg de proteína mantiene su capacidad discriminativa de severidad del dengue en población pediátrica.

Ahora bien, se considera que un modelo pronóstico tiene validez externa (transportabilidad) cuando mantiene su precisión al ser aplicado a pacientes obtenidos de un grupo diferente al de derivación del modelo, conocido como grupo de validación externa. Las diferencias en cuestión pueden estar relacionadas con la ubicación geográfica de su origen o con el periodo de tiempo en que son analizados <sup>255</sup>.

Con respecto a los resultados obtenidos en la evaluación de la transportabilidad geográfica del mejor modelo pronóstico en el grupo de validación externa, éstos permiten señalar que existe, aproximadamente, un 84,0% de probabilidad de que el diagnóstico basado en el

punto de corte óptimo (5,29 nmol de PCOs/mg de proteína) realizado en un paciente con dengue grave sea más correcto que el de un paciente con dengue con signos de alarma, elegido al azar en el grupo de validación externa. De acuerdo con los criterios de interpretación según Swets <sup>184</sup>, este valor de exactitud global puede ser considerado útil.

De igual manera, la evaluación de la capacidad de discriminación permite señalar que con el uso de este punto óptimo diagnóstico se puede discernir entre los pacientes con dengue grave y los pacientes con dengue con signos de alarma, seleccionados en el grupo de validación externa.

Antes de continuar, es importante destacar que existen varias investigaciones biomédicas, de nivel predictivo, que han utilizado la estrategia de validación retrospectiva, es decir, el grupo de validación externa fue constituido con anterioridad al grupo de derivación del modelo <sup>257-261</sup>.

Con respecto a la utilización de la población peruana como un nuevo grupo de derivación, la interpretación del AUC permite indicar que un paciente elegido al azar del grupo de pacientes con dengue grave tendrá, aproximadamente, el 90,0% de las veces un valor sérico igual o superior a 5,77 nmol de PCOs/mg de proteína que un paciente elegido al azar del grupo de pacientes con dengue con signos de alarma.

A partir de la interpretación del intervalo de confianza estimado para el AUC, se puede indicar que el uso del punto óptimo diagnóstico estimado (5,77 nmol de PCOs/mg de proteína), permite discernir entre los pacientes con dengue grave y los pacientes con dengue con signos de alarma.

Basándose en el modelo pronóstico estimado, todas las puntuaciones de Wald calculadas indican que la determinación sérica de PCOs aporta significativamente a la predicción de la severidad del dengue en la población peruana evaluada, y al mismo tiempo, éstas indican que los resultados obtenidos de este modelo pronóstico pueden ser generalizados a la población (Tabla 11).

Adicional a esto, cuando se eliminó este biomarcador de la ecuación de regresión, se observó un cambio significativo en el logaritmo de verosimilitud del modelo ( $-2LL=36,53$ ;  $p \leq 0,00001$ ), lo cual es evidencia de su participación en la capacidad pronóstica de dicho modelo.

La significancia encontrada en la prueba de ómnibus indica que con el uso de este punto óptimo diagnóstico de PCOs (5,77 nmol de PCOs/mg de proteína) existió una mejora significativa en la predicción de la probabilidad de ocurrencia del dengue grave en los pacientes peruanos evaluados.

La medida estandarizada del exponencial de b estimado (Tabla 11), permite señalar que es, aproximadamente, 81 veces más probable que un paciente evolucione a dengue grave si presenta una concentración sérica de PCOs igual o superior a 5,77 nmol/mg de proteína, en comparación con un paciente con valores séricos inferiores a ese umbral diagnóstico.

Los valores porcentuales de sensibilidad y especificidad del modelo pronóstico que utiliza este umbral, indican la buena capacidad que tiene este umbral diagnóstico para identificar la severidad del dengue en la población peruana.

De acuerdo con la interpretación del valor predictivo positivo calculado, aproximadamente, el 82,0% de los pacientes con niveles séricos de PCOs iguales o mayores a 5,77 nmol/mg de proteína presentan dengue grave. De modo similar, aproximadamente, el 95,0% de los pacientes con niveles séricos de PCOs inferiores a este punto de corte óptimo, no presentan dengue grave.

Luego de aplicar el método de bootstrap, el modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,77 nmol de PCOs/mg de proteína, mantiene su capacidad discriminativa de severidad del dengue en la población peruana.

Sobre la base de los resultados obtenidos al comparar las dos estrategias de validación utilizadas en este estudio (Tabla 12), pareciera que ambos modelos pronósticos tienen la misma capacidad discriminatoria entre pacientes con dengue grave y paciente con dengue con signos de alarma, de manera independiente a la edad del paciente evaluado, es más,

ambos muestran características propias de las pruebas de cribado <sup>254</sup>, sin diferencias significativas en sus parámetros de validez y seguridad diagnóstica.

En cuanto a las potenciales limitaciones del presente estudio se pueden mencionar:

- La homogeneidad entre el grupo de derivación y el grupo de validación externa se vio comprometida, dado que este último grupo estuvo constituido por pacientes pediátricos y adultos, a diferencia de la composición del grupo de derivación, solo con pacientes pediátricos.
- En las muestras de suero obtenidas de los pacientes pediátricos del grupo de derivación, no se realizó la detección molecular del virus dengue y de otros arbovirus, por el limitado volumen de muestra obtenido. En consecuencia, en este grupo de pacientes, no se puede excluir la posibilidad de coinfecciones entre arbovirus.
- La calidad de la información y el nivel de completitud de la ficha de notificación epidemiológica no permitió acceder a toda la información del recuento diferencial de leucocitos en la sangre de los pacientes del grupo de validación externa, a diferencia de una mejor completitud de las historia clínicas de los pacientes pediátricos del grupo de derivación.
- En teoría, la selección de casos y controles de origen hospitalario, puede conllevar a un sesgo de selección en la investigación, dado que existe la posibilidad de que estos sujetos de estudio seleccionados no sean representativos de todos los pacientes con una patología dada, afectando así la validez externa del estudio <sup>262</sup>.

Las similitudes encontradas en los resultados obtenidos con la estrategia de doble validación cruzada y la asociación estadística entre los niveles séricos de carbonilos proteicos y dengue grave, detectada en ambos grupos de pacientes, permiten pensar que las dos primeras limitaciones antes descritas, pudieron no tener efecto sobre el comportamiento de los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados en este estudio.

Por último, se piensa que el impacto teórico del origen hospitalario de los casos y controles seleccionados, puede verse limitado si se considera que las muestras de suero analizadas en este estudio, provenían de pacientes pediátricos que fueron atendidos en la red distrital de hospitales de Barranquilla-Colombia, durante un período de dos años, o hacían parte de las muestras de suero que fueron remitidas desde 12 de los 25 departamentos del Perú al Instituto Nacional de Salud de ese país.

**CONCLUSIONES**

## 7. Conclusiones

Inicialmente, cabe destacar que hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer estudio que reporta concentraciones séricas de carbonilos proteicos, hidroperóxidos lipídicos, superóxido dismutasa mitocondrial y citosólica en niños con diagnóstico de dengue. Igualmente, se considera la primera investigación que aborda el comportamiento de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con infección por virus zika.

A partir de la evaluación de la capacidad pronóstica de los biomarcadores de estrés oxidativos evaluados, en pacientes pediátricos y en adultos, se concluye:

- Los casos de dengue grave presentaron una mayor concentración sérica de carbonilos proteicos, en comparación con los casos de dengue con signos de alarma, independiente del sexo, de la edad, de la procedencia y del nivel sérico de proteínas del paciente evaluado.
- Los niveles séricos de hidroperóxidos lipídicos, la actividad enzimática sérica total de superóxido dismutasa y las actividades enzimáticas séricas de superóxido dismutasa mitocondrial y de la superóxido dismutasa citosólica, no permiten diferenciar a los pacientes con dengue grave de los pacientes con dengue con signos de alarma.
- Los pacientes con diagnóstico de dengue con signos de alarma, con diagnóstico de dengue sin signos de alarma, infectados con virus zika o con evidencia serológica o molecular de la presencia de dengue y otro arbovirus, no pueden ser diferenciados entre sí, usando la determinación sérica de carbonilos proteicos, hidroperóxidos lipídicos o de la actividad enzimática sérica total de superóxido dismutasa o de su isoforma citosólica.
- A partir del comportamiento encontrado de las actividades enzimáticas evaluadas, se presentan evidencias que sugieren la participación diferencial del radical anión superóxido o del peróxido de hidrógeno entre los mecanismos patogénicos de la infección por virus dengue y de la infección por virus zika.

- Junto con lo reportado por otros autores, en el presente estudio se encontraron evidencias que sugieren que la actividad antioxidante de la superóxido dismutasa mitocondrial no participa en la patogénesis del dengue grave.
- Los carbonilos proteicos fue el único biomarcador de estrés oxidativo evaluado que mostró capacidad pronóstica de severidad en pacientes con dengue, tanto por regresión logística binaria como por regresión probit binario.
- Luego de la aplicación de la estrategia de doble validación cruzada, existen evidencias para asegurar que el modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,29 nmol de carbonilos proteicos/mg de proteína y el modelo pronóstico basado en el punto de corte de 5,77 nmol de carbonilos proteicos/mg de proteína, fueron los mejores para pronosticar la severidad del dengue en una población constituida solamente por pacientes pediátricos y en una población constituida por pacientes pediátricos y adultos, respectivamente.
- Basado en el menor punto óptimo diagnóstico y en las similitudes encontradas en la capacidad discriminativa y en la probabilidad pronosticada, se puede señalar que, independiente de la edad y de la procedencia del paciente, el mejor modelo pronóstico de severidad del dengue se encuentra representado en la ecuación de regresión:

$\ln(p/1-p) = -2,71 + 3,30 (\text{PCOs-A del paciente} \geq 5,29 \text{ nmol/mg de proteína})$ , siendo PCOs-A, la concentración sérica ajustada de carbonilos proteicos en el paciente evaluado.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 8. Bibliografía

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. Laughlin CA, Morens DM, Cassetti MC, Costero-Saint Denis A, San Martin JL, Whitehead SS, et al. Dengue research opportunities in the Americas. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(7):1121-7.
3. Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Indian journal of dermatology*. 2010;55(1):68-78.
4. McBride WJ, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2000;2(9):1041-50.
5. Mangold KA, Reynolds SL. A review of dengue fever: a resurging tropical disease. *Pediatric emergency care*. 2013;29(5):665-9; quiz 70-1.
6. Kularatne SAM. Dengue fever. *BMJ : British Medical Journal*. 2015;351.
7. Dhanoa A, Hassan SS, Ngim CF, Lau CF, Chan TS, Adnan NAA, et al. Impact of dengue virus (DENV) co-infection on clinical manifestations, disease severity and laboratory parameters. *BMC infectious diseases*. 2016;16(1):406.
8. Venkatachalam RS, V. Homology and conservation of amino acids in E-protein sequences of dengue serotypes. *Asian Pac J Trop Dis* 2014;2(Suppl 2):5.
9. Acosta EG, Castilla, V. and Damonte, E. B. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cellular microbiology*. 2009;11(10):12.
10. Noisakran S, Onlamoon N, Songprakhon P, Hsiao HM, Chokeyphaibulkit K, Perng GC. Cells in dengue virus infection in vivo. *Advances in virology*. 2010;2010:164878.
11. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*. 2006;80(23):11418-31.
12. Guabiraba R, Ryffel B. Dengue virus infection: current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. *Immunology*. 2014;141(2):143-56.
13. Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM. Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection: Protection versus Disease Induction. *The American journal of pathology*. 2013;182(6):1950-61.
14. Padilla JCR, D. P.; Sáenz-Gómez, R. Dengue en Colombia. *Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia*. Bogotá-Colombia: Los Autores; 2012. 249 p.
15. Cafferata ML B, A, Rey-Ares, L, Alcaraz, A, Cormick, G, Gibbons, L, Romano, M. Cesaroni, S, Ruvinsky, S. Dengue Epidemiology and Burden of Disease in Latin America and the Caribbean: A Systematic Review of the Literature and Meta-Analysis. *Value in Health Regional Issues*. 2013;2:10.
16. Tabor E. *Emerging Viruses in Human Populations*. Zuckerman AJM, I.K, editor: Elsevier Science; 2007 January 30, 2007. 374 p.
17. Torres J, Orduna, TA, Piña-Pozas, M, Vázquez-Vega, D, Sarti, E. Epidemiological Characteristics of Dengue Disease in Latin America and in the Caribbean: A Systematic Review of the Literature. *Journal of tropical medicine*. 2017;3:18.
18. Romero L. Informe final del evento dengue, año 2012. Instituto Nacional de Salud. *Vigilancia y Control en Salud Pública*. 2012:1-19.
19. Zea D, Osorio L. Situación del sistema de vigilancia de casos de Dengue en un municipio de Colombia. *Revista de salud publica*. 2011;13(5):785-95.
20. Salud INd. Boletín Epidemiológico Semanal. In: Pública SdVyCeS, editor. *Semana Epidemiológica 51 de 2013* 2013.

21. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. In: Pública SdVyCeS, editor. Semana Epidemiológica 53 de 20142014. p. 34.
22. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. In: Pública SdVyCeS, editor. Semana Epidemiológica 52 de 20152015. p. 72.
23. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. In: Pública SdVyCeS, editor. Semana Epidemiológica 52 de 20162016. p. 121.
24. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal. In: Pública SdVyCeS, editor. Semana Epidemiológica 51 de 20132013. p. 25.
25. Salud Md. Boletín Epidemiológico Semana Epidemiológica 13. In: Epidemiología DGd, editor. 2010. p. 234-56.
26. Salud Md. Boletín Epidemiológico Semana Epidemiológica 52. In: Epidemiología DGd, editor. 2010. p. 1095-128.
27. Salud Md. Anuario Estadístico 2014. In: Instituto Nacional de Salud, editor. 2014. p. 281.
28. Instituto Nacional de Salud. Anuario Estadístico 2015. In: Salud Md, editor. 2015. p. 320.
29. Salud Md. Anuario Estadístico 2016. In: Instituto Nacional de Salud, editor. 2016. p. 330.
30. Instituto Nacional de Salud. Anuario Estadístico 2017. In: Salud Md, editor. 2017. p. 305.
31. World Health Organization. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Geneva2009. p. 147.
32. Anders KL, Nguyet NM, Chau NV, Hung NT, Thuy TT, Lien le B, et al. Epidemiological factors associated with dengue shock syndrome and mortality in hospitalized dengue patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011;84(1):127-34.
33. Thai KT, Nishiura H, Hoang PL, Tran NT, Phan GT, Le HQ, et al. Age-specificity of clinical dengue during primary and secondary infections. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(6):e1180.
34. Nguyen TH NT, Lei HY, Lin YS, Le BL, Huang KJ, Lin CF, Do QH, Vu TQ, Lam TM, Yeh TM, Huang JH, Liu CC, Halstead SB. Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;72(4):370-4.
35. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgraduate medical journal*. 2004;80(948):588-601.
36. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2004;8(2):69-80.
37. Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU. Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012;03(07):997-1019.
38. Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free radical biology & medicine*. 2009;46(5):531-42.
39. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 5):1147-50.
40. 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 tropica*. 2008;106(3):156-61.

41. Gil L, Martinez G, Tapanes R, Castro O, Gonzalez D, Bernardo L, et al. Oxidative stress in adult dengue patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2004;71(5):652-7.
42. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free radical biology & medicine*. 1999;26(1-2):202-26.
43. Noori S. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*. 2012;01(08).
44. Kohen R, Nyska A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*. 2002;30(6):620-50.
45. Rojas A, Figueroa H, Re L, Morales MA. Oxidative stress at the vascular wall. Mechanistic and pharmacological aspects. *Archives of medical research*. 2006;37(4):436-48.
46. Hamilton RT, Walsh ME, Van Remmen H. Mouse Models of Oxidative Stress Indicate a Role for Modulating Healthy Aging. *J Clin Exp Pathol*. 2012;Suppl 4:S4:005.
47. Tamari Y, Nawata H, Inoue E, Yoshimura A, Yoshii H, Kashino G, et al. Protective roles of ascorbic acid in oxidative stress induced by depletion of superoxide dismutase in vertebrate cells. *Free radical research*. 2013;47(1):1-7.
48. Iadecola C, Zhang F, Niwa K, Eckman C, Turner SK, Fischer E, et al. SOD1 rescues cerebral endothelial dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein. *Nature neuroscience*. 1999;2(2):157-61.
49. Didion SP, Kinzenbaw DA, Fegan PE, Didion LA, Faraci FM. Overexpression of CuZn-SOD Prevents Lipopolysaccharide-Induced Endothelial Dysfunction. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2004;35(8):1963-7.
50. Niki E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2014;1840(2):809-17.
51. Katz R. Biomarkers and Surrogate Markers: An FDA Perspective. *NeuroRX*. 2004;1(2):189-95.
52. Medicine Io. Evaluation of Biomarkers and Surrogate Endpoints in Chronic Disease. Micheel CM, Ball JR, editors. Washington, DC: The National Academies Press; 2010. 334 p.
53. Rogowska-Wrzesinska A, Wojdyla K, Nedic O, Baron CP, Griffiths HR. Analysis of protein carbonylation--pitfalls and promise in commonly used methods. *Free radical research*. 2014;48(10):1145-62.
54. Díaz-Acosta A, Membrillo-Hernández, J. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2006;9(1):34-44.
55. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *The Biochemical journal*. 1997;324 ( Pt 1):1-18.
56. Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*. 2014;33(2):79-97.
57. Semchyshyn HM. Reactive carbonyl species in vivo: generation and dual biological effects. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:417842.
58. Pamplona R. Advanced lipoxidation end-products. *Chemico-biological interactions*. 2011;192(1):14-20.
59. Rabbani N, Thornalley PJ. Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino acids*. 2012;42(4):1087-96.

60. Miller A-F. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2004;8(2):162-8.
61. Abreu IA, Cabelli DE. Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2010;1804(2):263-74.
62. Miao L, St. Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;47(4):344-56.
63. Miyamoto S, Ronsein GE, Prado FM, Uemi M, Corrêa TC, Toma IN, et al. Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life*. 2007;59(4-5):322-31.
64. Castro-Orozco R, Pinzon-Redondo, H.S., Alvis-Guzman, N. A systematic review of observational studies on oxidative/nitrosative stress involvement in dengue pathogenesis. *Colombia Medica*. 2015;46(3):135-43.
65. Rasool M, Malik A, Khan KM, Qureshi MS, Shabbir B, Zahid S, et al. Assessment of biochemical and antioxidative status in patients suffering from dengue fever. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2015;35(3):411-8.
66. Chandrasena LG, Peiris H, Kamani J, Wanigasuriya P, Jayaratne SD, Wijayasiri WA, et al. Antioxidants in patients with dengue viral infection. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2014;45(5):1015-22.
67. Soundravally R, Hoti SL, Patil SA, Cleetus CC, Zachariah B, Kadhivaran T, et al. Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2014;18:68-72.
68. 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 I-NMMA. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;106(3):174-9.
69. Gil L, León OS, Pérez J, Milián LC, González I, Guevara M. Characterization of oxidative stress in different clinical conditions, using redox indexes of diagnostic value. *Biotechnología Aplicada*. 2012;29(3):175-83.
70. 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. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;104(1):16-23.
71. Seet RC, Lee CY, Lim EC, Quek AM, Yeo LL, Huang SH, et al. Oxidative damage in dengue fever. *Free radical biology & medicine*. 2009;47(4):375-80.
72. 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. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(3):407-20.
73. Rajendiran S, Lakshamanappa HS, Zachariah B, Nambiar S. Desialylation of plasma proteins in severe dengue infection: possible role of oxidative stress. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;79(3):372-7.
74. 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.
75. Mendes-Ribeiro AC, Moss MB, Siqueira MA, Moraes TL, Ellory JC, Mann GE, et al. Dengue fever activates the L-arginine-nitric oxide pathway: an explanation for reduced

- aggregation of human platelets. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2008;35(10):1143-6.
76. 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. *Revista Médica de Chile*. 2007;135(6):743-50.
77. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj 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. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 2):365-75.
78. Trairatvorakul P, Chongsrisawat V, Ngamvasinont D, Asawarachun D, Nantasook J, Poovorawan Y. Serum nitric oxide in children with dengue infection. *Asian Pacific journal of allergy and immunology / launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand*. 2005;23(2-3):115-9.
79. Klassen P, Biesalski HK, Mazariegos M, Solomons NW, Furst P. Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidants. *Nutrition*. 2004;20(6):542-7.
80. Valero N, Espina LM, Anez G, Torres E, Mosquera JA. Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2002;66(6):762-4.
81. Ray G, Kumar V, Kapoor AK, Dutta AK, Batra S. Status of antioxidants and other biochemical abnormalities in children with dengue fever. *Journal of tropical pediatrics*. 1999;45(1):4-7.
82. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 1990;9(6):515-40.
83. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*. 2004;142(2):231-55.
84. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research*. 1998;39(8):1529-42.
85. Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods in molecular biology*. 2000;99:15-24.
86. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. 2003;329(1):23-38.
87. Mesquita CS, Oliveira R, Bento F, Geraldo D, Rodrigues JV, Marcos JC. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical biochemistry*. 2014;458:69-71.
88. Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Analytical biochemistry*. 1989;179:8-18.
89. Zhang Y, Zhao W, Zhang HJ, Domann FE, Oberley LW. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer research*. 2002;62(4):1205-12.
90. Lipid Oxidation: Measurement Methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*.
91. Ibusuki D, Nakagawa K, Asai A, Oikawa S, Masuda Y, Suzuki T, et al. Preparation of pure lipid hydroperoxides. *Journal of lipid research*. 2008;49(12):2668-77.
92. Molyneux D. Neglected tropical diseases. *Community eye health / International Centre for Eye Health*. 2013;26(82):21-4.
93. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. Dengue: the continual re-emergence of a centuries-old disease. *EcoHealth*. 2013;10(1):104-6.

94. Tapia-Conyer R, Mendez-Galvan JF, Gallardo-Rincon H. The growing burden of dengue in Latin America. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;46 Suppl 2:S3-6.
95. Zapata JC, Cox D, Salvato MS. The Role of Platelets in the Pathogenesis of Viral Hemorrhagic Fevers. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(6):e2858.
96. Diaz-Quijano FA, Waldman EA. Factors associated with dengue mortality in Latin America and the Caribbean, 1995-2009: an ecological study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;86(2):328-34.
97. San Martin JL, Brathwaite O, Zambrano B, Solorzano JO, Bouckennooghe A, Dayan GH, et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2010;82(1):128-35.
98. Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical epidemiology*. 2013;5:299-309.
99. Hay SEa. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*. 2017;390(10100):1260-344.
100. Luz PM, Grinsztejn B, Galvani AP. Disability adjusted life years lost to dengue in Brazil. *Tropical Medicine & International Health*. 2009;14(2):237-46.
101. Meltzer MR-P, JG; CLARK, GG; REITER, P; GUBLER, DJ. Using disability-adjusted life years to assess the economic impact of dengue in Puerto Rico: 1984–1994. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;59(2):265-71.
102. Shepard DS, Suaya JA, Halstead SB, Nathan MB, Gubler DJ, Mahoney RT, et al. Cost-effectiveness of a pediatric dengue vaccine. *Vaccine*. 2004;22(9):1275-80.
103. Clark DM, MP; Nisalak, A; Puthimethee, V; Endy TP. Economic impact of dengue fever/dengue hemorrhagic fever in Thailand at the family and population levels. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;72(6):786-91.
104. Undurraga EA, Betancourt-Cravioto M, Ramos-Castaneda J, Martinez-Vega R, Mendez-Galvan J, Gubler DJ, et al. Economic and disease burden of dengue in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(3):e0003547.
105. Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA. Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(2):e2055.
106. Luh DL, Liu CC, Luo YR, Chen SC. Economic cost and burden of dengue during epidemics and non-epidemic years in Taiwan. *Journal of infection and public health*. 2018;11(2):215-23.
107. Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet infectious diseases*. 16(6):712-23.
108. Sarti E, L'Azou M, Mercado M, Kuri P, Siqueira JB, Solis E, et al. A comparative study on active and passive epidemiological surveillance for dengue in five countries of Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016;44:44-9.
109. Organization PAH. Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas. World Health Organization, 2015.
110. Organization PAH. Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas. World Health Organization, 2016.
111. Organization PAH. Number of reported cases of dengue and severe dengue (SD) in the Americas. World Health Organization, 2017.

112. Castro-Orozco R, Alvis-Guzmán N, Gómez-Arias R. Diferencias y similitudes entre las estrategias de gestión integrada para la prevención y control del dengue en Colombia y Perú. 2015. 2015:7.
113. Sharp TM, Tomashek KM, Read JS, Margolis HS, Waterman SH. A New Look at an Old Disease: Recent Insights into the Global Epidemiology of Dengue. *Current Epidemiology Reports*. 2017;4(1):11-21.
114. Leo YS, Gan VC, Ng EL, Hao Y, Ng LC, Pok KY, et al. Utility of warning signs in guiding admission and predicting severe disease in adult dengue. *BMC infectious diseases*. 2013;13:498.
115. Thein TL, Gan VC, Lye DC, Yung CF, Leo YS. Utilities and limitations of the World Health Organization 2009 warning signs for adult dengue severity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(1):e2023.
116. Tsai CY, Lee IK, Lee CH, Yang KD, Liu JW. Comparisons of dengue illness classified based on the 1997 and 2009 World Health Organization dengue classification schemes. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2013;46(4):271-81.
117. Srikiatkachorn AR, A.L.; Gibbons, R.V.; Sittisombut, N.; Malasit, P.; Ennis, F.A.; Nimmannitya, S.; Kalayanarooj, S. Dengue--how best to classify it. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;53(6):563-7.
118. Setiati TE, Mairuhu AT, Koraka P, Supriatna M, Mac Gillavry MR, Brandjes DP, et al. Dengue disease severity in Indonesian children: an evaluation of the World Health Organization classification system. *BMC infectious diseases*. 2007;7:22.
119. Bandyopadhyay SL, L.C.S.; Kroeger, A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical Medicine and International Health*. 2006;11(8):1238-55.
120. Phuong CN, NT.; Kneen, R. Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in vietnamese children: is the World Health Organization classification system helpful? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004;70(2):172-9.
121. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *The Journal of infectious diseases*. 1997;176(2):313-21.
122. Halstead SB. Dengue: the syndromic basis to pathogenesis research. Inutility of the 2009 WHO case definition. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2013;88(2):212-5.
123. van de Weg CA, van Gorp EC, Supriatna M, Soemantri A, Osterhaus AD, Martina BE. Evaluation of the 2009 WHO dengue case classification in an Indonesian pediatric cohort. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;86(1):166-70.
124. Hadinegoro SR. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? *Paediatr Int Child Health*. 2012;32 Suppl 1(S1):33-8.
125. Alexander N, Balmaseda A, Coelho IC, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. *Tropical medicine & international health : TM & IH*. 2011;16(8):936-48.
126. Dalrymple NA, Mackow ER. Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Advances in virology*. 2012;2012:840654.
127. Srikiatkachorn A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thromb Haemost*. 2009;102(6):1042-9.

128. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008;53(3):287-99.
129. Lei HY, Yeh TM, Liu HS, Lin YS, Chen SH, Liu CC. Immunopathogenesis of dengue virus infection. *Journal of biomedical science*. 2001;8(5):377-88.
130. Yacoub S, Wertheim H, Simmons CP, Screaton GR, Wills B. Microvascular and endothelial function for risk prediction in dengue: an observational study. *The Lancet*. 2015;385:S102.
131. Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Frontiers in physiology*. 2012;3:441.
132. Gori T, Munzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction: therapeutic implications. *Annals of medicine*. 2011;43(4):259-72.
133. Rodríguez-Manas L, El-Assar M, Vallejo S, Lopez-Doriga P, Solis J, Petidier R, et al. Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. *Aging cell*. 2009;8(3):226-38.
134. Wadsworth RM. Oxidative stress and the endothelium. *Experimental physiology*. 2008;93(1):155-7.
135. Pereira EC, Ferderbar S, Bertolami MC, Faludi AA, Monte O, Xavier HT, et al. Biomarkers of oxidative stress and endothelial dysfunction in glucose intolerance and diabetes mellitus. *Clinical biochemistry*. 2008;41(18):1454-60.
136. Zalba G, Fortuno A, San Jose G, Moreno MU, Beloqui O, Diez J. Oxidative stress, endothelial dysfunction and cerebrovascular disease. *Cerebrovascular diseases*. 2007;24 Suppl 1:24-9.
137. Muller G, Goettsch C, Morawietz H. Oxidative stress and endothelial dysfunction. *Hamostaseologie*. 2007;27(1):5-12.
138. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharron JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular diabetology*. 2006;5:4.
139. Parodi O, De Chiara B, Campolo J, Sedda V, Roubina E. [Endothelial dysfunction and oxidative stress in sepsis]. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia*. 2006;23 Suppl 36:S69-73.
140. Fayers KE, Cummings MH, Shaw KM, Laight DW. Nitrate tolerance and the links with endothelial dysfunction and oxidative stress. *British journal of clinical pharmacology*. 2003;56(6):620-8.
141. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart*. 2001;85(3):342-50.
142. Bermudez V, Bermudez F, Acosta G, Acosta A, Anez J, Andara C, et al. Molecular mechanisms of endothelial dysfunction: from nitric oxide synthesis to ADMA inhibition. *American journal of therapeutics*. 2008;15(4):326-33.
143. Badimón L, Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Revista Española de Cardiología*. 2006;6(Supl.A):21-30.
144. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(7):1149-60.
145. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*. 2000;87(10):840-4.
146. Levent G, Ali A, Ahmet A, Polat EC, Aytac C, Ayse E, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. *Journal of translational medicine*. 2006;4:25.
147. Yang TC, Lai CC, Shiu SL, Chuang PH, Tzou BC, Lin YY, et al. Japanese encephalitis virus down-regulates thioredoxin and induces ROS-mediated ASK1-ERK/p38

- MAPK activation in human promonocyte cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2010;12(8-9):643-51.
148. Kalugalage T, Rodrigo C, Vithanage T, Somaratne P, De Silva HJ, Handunnetti S, et al. Low serum total nitrite and nitrate levels in severe leptospirosis. *BMC infectious diseases*. 2013;13:206.
149. Hosakote YM, Liu T, Castro SM, Garofalo RP, Casola A. Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;41(3):348-57.
150. Fabbri C, de Cassia Mascarenhas-Netto R, Lalwani P, Melo GC, Magalhaes BM, Alexandre MA, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in *Plasmodium vivax* malaria patients evolving with cholestatic jaundice. *Malaria journal*. 2013;12(1):315.
151. Machado FS, Tanowitz HB, Ribeiro AL. Pathogenesis of chagas cardiomyopathy: role of inflammation and oxidative stress. *Journal of the American Heart Association*. 2013;2(5):e000539.
152. Cunha GM, Silva VM, Bessa KD, Bitencourt MA, Macedo UB, Freire-Neto FP, et al. Levels of oxidative stress markers: correlation with hepatic function and worm burden patients with schistosomiasis. *Acta parasitologica / Witold Stefanski Institute of Parasitology, Warszawa, Poland*. 2012;57(2):160-6.
153. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *British journal of anaesthesia*. 2003;90(2):221-32.
154. Valyi-Nagy T, Dermody TS. Role of oxidative damage in the pathogenesis of viral infections of the nervous system. *Histology and histopathology*. 2005;20(3):957-67.
155. Ubol S, Chareonsirisuthigul T, Kasisith J, Klungthong C. Clinical isolates of dengue virus with distinctive susceptibility to nitric oxide radical induce differential gene responses in THP-1 cells. *Virology*. 2008;376(2):290-6.
156. Rabablert J, Wasi C, Kinney R, Kasisith J, Pitidhamabhorn D, Ubol S. Attenuating characteristics of DEN-2 PDK53 in flavivirus-naive peripheral blood mononuclear cells. *Vaccine*. 2007;25(19):3896-905.
157. Moreno-Altamirano MM, Romano M, Legorreta-Herrera M, Sanchez-Garcia FJ, Colston MJ. Gene expression in human macrophages infected with dengue virus serotype-2. *Scandinavian journal of immunology*. 2004;60(6):631-8.
158. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *Journal of virology*. 2003;77(7):3929-38.
159. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2003;329(1-2):23-38.
160. Pawitan JA. Dengue virus infection: predictors for severe dengue. *Acta medica Indonesiana*. 2011;43(2):129-35.
161. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(4):564-81.
162. Atrasheuskaya A, Petzelbauer P, Fredeking TM, Ignatyev G. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2003;35(1):33-42.
163. Wong GH, Goeddel DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science*. 1988;242(4880):941-4.
164. Marikovskiy M, Ziv V, Nevo N, Harris-Cerruti C, Mahler O. Cu/Zn Superoxide Dismutase Plays Important Role in Immune Response. *The Journal of Immunology*. 2003;170(6):2993-3001.

165. van de Weg CAM, Pannuti CS, van den Ham H-J, de Araújo ESA, Boas LSV, Felix AC, et al. Serum angiopoietin-2 and soluble VEGF receptor 2 are surrogate markers for plasma leakage in patients with acute dengue virus infection. *Journal of Clinical Virology*. 60(4):328-35.
166. Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *The Lancet infectious diseases*. 2017;17(3):e88-e100.
167. Gil-Gonzalez D, Ruiz-Cantero MT, Alvarez-Dardet C. How political epidemiology research can address why the millennium development goals have not been achieved: developing a research agenda. *Journal of epidemiology and community health*. 2009;63(4):278-80.
168. Moons KG, Royston P, Vergouwe Y, Grobbee DE, Altman DG. Prognosis and prognostic research: what, why, and how? *Bmj*. 2009;338:b375.
169. Pang J, Thein TL, Leo YS, Lye DC. Early clinical and laboratory risk factors of intensive care unit requirement during 2004-2008 dengue epidemics in Singapore: a matched case-control study. *BMC infectious diseases*. 2014;14(1):649.
170. Juneja D, Nasa P, Singh O, Javeri Y, Uniyal B, Dang R. Clinical profile, intensive care unit course, and outcome of patients admitted in intensive care unit with dengue. *Journal of critical care*. 2011;26(5):449-52.
171. Kamath SR, Ranjit S. Clinical features, complications and atypical manifestations of children with severe forms of dengue hemorrhagic fever in South India. *Indian journal of pediatrics*. 2006;73(10):889-95.
172. Vittinghoff E, McCulloch CE. Relaxing the rule of ten events per variable in logistic and Cox regression. *American journal of epidemiology*. 2007;165(6):710-8.
173. Arguelles S, Gomez A, Machado A, Ayala A. A preliminary analysis of within-subject variation in human serum oxidative stress parameters as a function of time. *Rejuvenation research*. 2007;10(4):621-36.
174. Perdomo Celis F, Perilla P, Salgado DM, Narváez CF. Detección y cuantificación de virus dengue 2 en lisado celular y plasma de niños por qPCR en tiempo real usando un estuche comercial y el equipo EcoTM System-Illumina. 2014. 2014;6(1):8.
175. Bhoomboonchoo P, Nisalak A, Chansatiporn N, Yoon I-K, Kalayanaroj S, Thipayamongkolgul M, et al. Sequential dengue virus infections detected in active and passive surveillance programs in Thailand, 1994–2010. *BMC public health*. 2015;15(1):250.
176. Alera MT, Srikiatkachorn A, Velasco JM, Tac-An IA, Lago CB, Clapham HE, et al. Incidence of Dengue Virus Infection in Adults and Children in a Prospective Longitudinal Cohort in the Philippines. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(2):e0004337.
177. Méndez MR, Calisher CH, Kruger H, Sipan F, Sánchez S, Lazuick JS. A continuing focus of yellow fever in the Apurimac River Valley, Ayacucho, Peru, and the first isolation of yellow fever virus in that country. *Bull Pan Am Hdh Organ* 1984;18(2):172-9.
178. CDC. Triplex Real-time RT-PCR Assay For use under an Emergency Use Authorization only Instructions for Use. 2016.
179. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(3):545-51.
180. Yap BW, Sim CH. Comparisons of various types of normality tests. *Journal of Statistical Computation and Simulation*. 2011;81(12):2141-55.
181. Razali NY, BW. Power Comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*. 2011;2(1):21-33.

182. Gaskin CJ, Happell B. Power, effects, confidence, and significance: An investigation of statistical practices in nursing research. *International Journal of Nursing Studies*.51(5):795-806.
183. Nuñez E, Steyerberg, E., Nuñez, J. Estrategias para la elaboración de modelos estadísticos de regresión. *Revista Española de Cardiología*. 2011;64(6):501-7.
184. Swets J. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988;240(4857):1285-93.
185. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology*. 1983;148(3):839-43.
186. Sterne JA, Davey Smith G. Sifting the evidence-what's wrong with significance tests? *Bmj*. 2001;322(7280):226-31.
187. Osborne JW. Prediction in Multiple Regression. *Practical Assessment , Research & Evaluation*. 2000;7(2):1-6.
188. Carrasco LR, Leo YS, Cook AR, Lee VJ, Thein TL, Go CJ, et al. Predictive Tools for Severe Dengue Conforming to World Health Organization 2009 Criteria. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(7):e2972.
189. Guzmán MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Susana V, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *International Journal of Infectious Diseases*. 2002;6(2):118-24.
190. Karunakaran A, Ilyas WM, Sheen SF, Jose NK, Nujum ZT. Risk factors of mortality among dengue patients admitted to a tertiary care setting in Kerala, India. *Journal of infection and public health*. 2014;7(2):114-20.
191. Cavalcanti LP, Vilar D, Souza-Santos R, Teixeira MG. Change in Age Pattern of Persons with Dengue, Northeastern Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(1):132-4.
192. Suárez-Ognio L, Arrasco, J, Casapía, M, Sihuincha, M, Ávila, J, Soto, G, Álvarez, C, Rodríguez, H. Factores asociados a dengue grave durante la epidemia de dengue en la ciudad de Iquitos, 2010 – 2011. *Revista Peruana de Epidemiología* 2011;15(1):17-23.
193. Nunes PCG, Sampaio SAF, Costa NRd, Mendonça MCLd, Lima MdRQ, Araujo SEM, et al. Dengue severity associated with age and a new lineage of dengue virus-type 2 during an outbreak in Rio De Janeiro, Brazil. *Journal of medical virology*. 2016;88(7):1130-6.
194. Burattini MN, Lopez LF, Coutinho FAB, Siqueira-Jr JB, Homsani S, Sarti E, et al. Age and regional differences in clinical presentation and risk of hospitalization for dengue in Brazil, 2000-2014. *Clinics*. 2016;71:455-63.
195. de Souza LJB, L.; Carvalho, L.; Assed de Souza, L.; Barbosa, R; do Vale da Silveira, M.; Souto, J.T.D. Comparison of clinical and laboratory characteristics between children and adults with dengue. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2013;17(1):27-31.
196. Vicente CR, Cerutti Junior C, FröSchl G, Romano CM, Cabidelle ASA, Herbinger KH. Influence of demographics on clinical outcome of dengue: a cross-sectional study of 6703 confirmed cases in Vitória, Espírito Santo State, Brazil. *Epidemiology and infection*. 2016;145(1):46-53.
197. Thomas L, Brouste Y, Najjioullah F, Hochedez P, Hatchuel Y, Moravie V, et al. Predictors of severe manifestations in a cohort of adult dengue patients. *Journal of Clinical Virology*. 2010;48(2):96-9.
198. Khan MIH, Anwar E, Agha A, Hassanien NSM, Ullah E, Syed IA, et al. Factors predicting severe dengue in patients with dengue Fever. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1):e2013014.

199. Hsieh C-C, Cia C-T, Lee J-C, Sung J-M, Lee N-Y, Chen P-L, et al. A Cohort Study of Adult Patients with Severe Dengue in Taiwanese Intensive Care Units: The Elderly and APTT Prolongation Matter for Prognosis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(1):e0005270.
200. Huy NT, Van Giang T, Thuy DHD, Kikuchi M, Hien TT, Zamora J, et al. Factors Associated with Dengue Shock Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(9):e2412.
201. Sun J, Lu L, Wu H, Yang J, Xu L, Sang S, et al. Epidemiological trends of dengue in mainland China, 2005-2015. *International Journal of Infectious Diseases*. 57:86-91.
202. Reyes-García SZ, Zambrano LI, Sierra M. Caracterización clínica y hematológica de pacientes pediátricos con Dengue en Honduras. *Revista Médica de Risaralda*. 2014;20:95-100.
203. Real JJR, S.G.; Gómez, M.D.; Roby, A.J.; Ordoñez, J.M. . Caracterización clínica del dengue con signos de alarma y grave, en hospitales de Guayaquil. . *Revista científica INSPILIP*. 2017;1(1):18.
204. Talarico LB, Byrne AB, Amarilla S, Lovera D, Vázquez C, Chamorro G, et al. Characterization of type I interferon responses in dengue and severe dengue in children in Paraguay. *Journal of Clinical Virology*. 2017;97:10-7.
205. Biswas HH, Gordon A, Nuñez A, Perez MA, Balmaseda A, Harris E. Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels Are Associated with Severe Dengue Outcome. *PLoS neglected tropical diseases*. 2015;9(9):e0003904.
206. G. NR. Interval estimation for the difference between independent proportions: comparison of eleven methods. *Statistics in medicine*. 1998;17(8):873-90.
207. Ranganathan P, Pramesh C, Buyse M. Common pitfalls in statistical analysis: Clinical versus statistical significance. *Perspectives in Clinical Research*. 2015;6(2):116-7.
208. Monterrey PG, C. Aplicación de las pruebas de hipótesis en la investigación en salud: ¿estamos en lo correcto? *Universitas Medica*. 2007;48(3):193-206.
209. Jayanthi HK, Tulasi SK. Correlation study between platelet count, leukocyte count, nonhemorrhagic complications, and duration of hospital stay in dengue fever with thrombocytopenia. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 2016;5(1):120-3.
210. Thanachartwet V, Oer-areemitr N, Chamnanchanunt S, Sahassananda D, Jitmittraphap A, Suwannakudt P, et al. Identification of clinical factors associated with severe dengue among Thai adults: a prospective study. *BMC infectious diseases*. 2015;15(1):420.
211. Fernandez E, Smieja M, Walter SD, Loeb M. A retrospective cohort study to predict severe dengue in Honduran patients. *BMC infectious diseases*. 2017;17(1):676.
212. Londoño JO, J.M.; Casanova, M.E.; Muriel, A.J. Caracterización de pacientes con dengue y evaluación de biomarcadores de morbimortalidad en un centro de nivel III de Cali. *Revista Colombiana Salud Libre*. 2014;9(1):15-20.
213. Lugo SM, L.; Bejarano, O.; Basualdo, W.; Pavlicich, V. Resumen. En dengue con signos de alarma ¿Podemos predecir evolución a grave desde la emergencia? *Revista Chilena de Pediatría*. 2015;86(4):305.
214. Alvarado-Castro VM, Ramírez-Hernández E, Paredes-Solís S, Legorreta-Soberanis J, Saldaña-Herrera VG, Salas-Franco LS, et al. Clinical profile of dengue and predictive severity variables among children at a secondary care hospital of Chilpancingo, Guerrero, Mexico: case series. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México (English Edition)*. 2016;73(4):237-42.

215. Ledika MA, Setiabudi D, Dhamayanti M. Association between Clinical Profiles and Severe Dengue Infection in Children in Developing Country. *American Journal of Epidemiology and Infectious Disease*. 2015;3(3):45-9.
216. Martínez Torres E. Dengue. *Estudios Avanzados*. 2008;22:33-52.
217. Yacoub S, Trung TH, Lam PK, Thien VHN, Hai DHT, Phan TQ, et al. Cardio-haemodynamic assessment and venous lactate in severe dengue: Relationship with recurrent shock and respiratory distress. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(7):e0005740.
218. Lum LCS, Thong MK, Cheah YK, Lam SK. Dengue-associated adult respiratory distress syndrome. *Annals of tropical paediatrics*. 1995;15(4):335-9.
219. Yeh C-Y, Chen P-L, Chuang K-T, Shu Y-C, Chien Y-W, Perng GC, et al. Symptoms associated with adverse dengue fever prognoses at the time of reporting in the 2015 dengue outbreak in Taiwan. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(12):e0006091.
220. Pothapregada S, Kamalakannan B, Thulasingham M, Sampath S. Clinically Profiling Pediatric Patients with Dengue. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2016;8(3):115-20.
221. Noisakran S, Perng GC. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. *Experimental biology and medicine*. 2008;233(4):401-8.
222. Agudelo IYP, L.D.; Gonzalo, L.; Avendaño, E.; Bedoya, G.; Restrepo, B.N. Factores asociados a extravasación plasmática en pacientes con dengue de Antioquia y Chocó entre el 2000 y 2013. *Colombia. CES Medicina*. 2015;29:23-4.
223. Halstead SB. Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatrics and International Child Health*. 2012;32(s1):5-9.
224. Wang C-C, Lee I-K, Su M-C, Lin H-I, Huang Y-C, Liu S-F, et al. Differences in clinical and laboratory characteristics and disease severity between children and adults with dengue virus infection in Taiwan, 2002. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009;103(9):871-7.
225. Sivathanu SM, K.; Sampath, S.; Nagaraj, P.; Sunder, S.K.; Pachaimuthu, R.A. To study the clinical profile of dengue fever and to evolve a prognostic marker based on hematological parameters for severe dengue. *International Journal of Contemporary Pediatrics*. 2017;4(2):538-42.
226. Sridharan A, Chen Q, Tang KF, Ooi EE, Hibberd ML, Chen J. Inhibition of megakaryocyte development in the bone marrow underlies dengue virus-induced thrombocytopenia in humanized mice. *Journal of virology*. 2013;87(21):11648-58.
227. Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;100(7):608-14.
228. Souza LJd, Nogueira RMR, Soares LC, Soares CEC, Ribas BF, Alves FP, et al. The impact of dengue on liver function as evaluated by aminotransferase levels. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2007;11:407-10.
229. Lugo SP, V. Indicadores tempranos de dengue grave en pacientes hospitalizados. *Pediatría*. 2014;41(2).
230. Soo K-M, Khalid B, Ching S-M, Chee H-Y. Meta-Analysis of Dengue Severity during Infection by Different Dengue Virus Serotypes in Primary and Secondary Infections. *PLoS one*. 2016;11(5):e0154760.
231. Khurram M, Qayyum W, Hassan SJu, Mumtaz S, Bushra HT, Umar M. Dengue hemorrhagic fever: Comparison of patients with primary and secondary infections. *Journal of infection and public health*. 7(6):489-95.

232. Santhosh NK, K.N.; Ramadas, D. Hepatic Proteins & Protein Oxidation - Role in Dengue Fever. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 2016;12(2):161-5.
233. Lushchak VI. Free radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of organisms. *Biochemistry (Moscow)*. 2007;72(8):809-27.
234. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2009;20(7):332-40.
235. Dirmeier R, O'Brien K, Engle M, Dodd A, Spears E, Poyton RO. Measurement of Oxidative Stress in Cells Exposed to Hypoxia and Other Changes in Oxygen Concentration. *Methods in enzymology*. 381: Academic Press; 2004. p. 589-603.
236. Kim JJ, Lee SB, Park JK, Yoo YD. TNF- $\alpha$ -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. *Cell Death And Differentiation*. 2010;17:1420.
237. Yen YT, Chen HC, 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. *Journal of virology*. 2008;82(24):12312-24.
238. Singh M, Kapoor A, Bhatnagar A. Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls. *Chemico-biological interactions*. 2015;234:261-73.
239. Castro R, Pinzon HS, Alvis-Guzman N. A systematic review of observational studies on oxidative/nitrosative stress involvement in dengue pathogenesis. *Colomb Med (Cali)*. 2015;46(3):135-43.
240. Castro R, Pinzon HS, Alvis-Guzman N. Oxidative-nitrosative stress and dengue disease: a systematic review of *in vivo/in vitro* studies. *Revista cubana de medicina tropical*. 2015;67(2):244-63.
241. Cherupanakkal C, Ramachadrappa V, Kadhiraivan T, Parameswaran N, Parija SC, Pillai AB, et al. A Study on Gene Expression Profile of Endogenous Antioxidant Enzymes: CAT, MnSOD and GPx in Dengue Patients. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2017;32(4):437-45.
242. Semrau F, Kühl RJ, Ritter S, Ritter K. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) and autoantibodies against MnSOD in acute viral infections. *Journal of medical virology*. 1998;55(2):161-7.
243. Ritter K, Kühl RJ, Semrau F, Eiffert H, Kratzin HD, Thomssen R. Manganese superoxide dismutase as a target of autoantibodies in acute Epstein-Barr virus infection. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(5):1995-8.
244. Dalpke AH, Thomssen R, Ritter K. Oxidative injury to endothelial cells due to Epstein-Barr virus-induced autoantibodies against manganese superoxide dismutase. *Journal of medical virology*. 2003;71(3):408-16.
245. Ho JCM, Zheng S, Comhair SAA, Erzurum SC, Farver C. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer research*. 2001;61(23):8578-85.
246. Niki E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;47(5):469-84.
247. Soundravally R, Sherin J, Agieshkumar BP, Daiisy MS, Cleetus C, Narayanah P, et al. Serum levels of copper and iron in dengue fever. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2015;57:315-20.
248. Wang Y, Oberley LW, Murhammer DW. Evidence of oxidative stress following the viral infection of two lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(11):1448-55.

249. ALESSIO HM, HAGERMAN AE, FULKERSON BK, AMBROSE J, RICE RE, WILEY RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2000;32(9):1576-81.
250. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in lipid research*. 2004;43(3):200-27.
251. Burgueño MJ, García-Bastos JL, González-Buitrago JM. Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Medicina clínica*. 1995;104:661-70.
252. Linnet K, Bossuyt PMM, Moons KGM, Reitsma JB. Quantifying the Accuracy of a Diagnostic Test or Marker. *Clinical chemistry*. 2012;58(9):1292-301.
253. Metz CE. Receiver Operating Characteristic Analysis: A Tool for the Quantitative Evaluation of Observer Performance and Imaging Systems. *Journal of the American College of Radiology*.3(6):413-22.
254. Bravo-Grau S, Cruz Q JP. Estudios de exactitud diagnóstica: Herramientas para su Interpretación. *Revista chilena de radiología*. 2015;21:158-64.
255. Terrin N, Schmid CH, Griffith JL, D'Agostino RB, Selker HP. External validity of predictive models: a comparison of logistic regression, classification trees, and neural networks. *Journal of Clinical Epidemiology*. 2003;56(8):721-9.
256. Steyerberg EW, Harrell FE, Borsboom GJJM, Eijkemans MJC, Vergouwe Y, Habbema JDF. Internal validation of predictive models: Efficiency of some procedures for logistic regression analysis. *Journal of Clinical Epidemiology*. 2001;54(8):774-81.
257. Ranke MB, Lindberg A, Chatelain P, Wilton P, Cutfield W, Albertsson-Wikland K, et al. Derivation and Validation of a Mathematical Model for Predicting the Response to Exogenous Recombinant Human Growth Hormone (GH) in Prepubertal Children with Idiopathic GH Deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999;84(4):1174-83.
258. Lehmann ED, Hermanyi I, Deutsch T. Retrospective validation of a physiological model of glucose-insulin interaction in type 1 diabetes mellitus. *Medical Engineering & Physics*. 1994;16(3):193-202.
259. Altmann A, Däumer M, Beerenwinkel N, Peres Y, Schülter E, Büch J, et al. Predicting the Response to Combination Antiretroviral Therapy: Retrospective Validation of geno2pheno-THEO on a Large Clinical Database. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(7):999-1006.
260. de Vries Robbé M, de Vogel V, de Spa E. Protective Factors for Violence Risk in Forensic Psychiatric Patients: A Retrospective Validation Study of the SAPROF. *International Journal of Forensic Mental Health*. 2011;10(3):178-86.
261. Goodacre S, Wilson R, Shephard N, Nicholl J. Derivation and validation of a risk adjustment model for predicting seven day mortality in emergency medical admissions: mixed prospective and retrospective cohort study. *BMJ : British Medical Journal*. 2012;344.
262. Gómez M, Danglot, C., Huerta, S. G., García de la Torre, S. . El estudio de casos y controles. Su diseño, análisis e interpretación, en investigación clínica. *Rev Mex Pediatr*. 2003;70(5):257-63.