



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Bárbara Ferreira dos Santos

Influência do diabetes mellitus na infecção aguda
por dengue durante epidemia de 2019 em São
José do Rio Preto, SP

São José do Rio Preto
2023

Bárbara Ferreira dos Santos

Influência do diabetes mellitus na infecção aguda por dengue durante epidemia de 2019 em São José do Rio Preto, SP

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Fernanda Estofolete

São José do Rio Preto

2023

Santos, Barbara Ferreira

Influência do diabetes mellitus na infecção aguda por dengue durante epidemia de 2019 em São José do Rio Preto
São José do Rio Preto, SP, 2023
40p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Cássia Fernanda Estofolete

1. Dengue vírus
2. Diabetes mellitus
3. Resposta imune
4. Gravidade
5. Zika vírus.

Bárbara Ferreira dos Santos

Influência do diabetes mellitus na infecção aguda por dengue durante epidemia de 2019 em São José do Rio Preto, SP

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Cássia Fernanda
Estofolete

1º Examinador: Prof. Dr. Irineu Luiz Maia

2º Examinador: Profa. Dra. Milena Polotto de Santi

1º Suplente: Cecília Artico Banho

2º Suplente: Carolina Colombelli Pacca Mazaro

São José do Rio Preto

2023

SUMÁRIO

SUMÁRIO	5
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1- O vírus	16
2- Epidemiologia	19
3- Formas clínicas.....	26
4- Patogênese e resposta imune das formas graves.....	30
4.1 Papel do NS1.....	31
4.2 “Antibody Dependent Enhancement (ADE)	31
4.3 Variação do Genoma DENV e RNA Subgenômico.....	32
4.4 Infecção prévia pelo vírus Zika	33
5- Diabetes mellitus	34
6- Dengue x Diabetes mellitus	37
3- MATERIAL E MÉTODOS	39
1- Considerações éticas	39
2- Área de estudo.....	40
3- Elegibilidade da amostra para inclusão.....	40
4- Métodos moleculares para investigação da dengue	42
5- Investigação de infecção prévia por dengue ou Zika.....	42
6- Características demográficas e clínicas.....	43
7- Análise estatística	44
4- RESULTADOS	45
1- Características gerais da população de estudo	45
2- Associação de características demográficas, comorbidades e gravidade da dengue... 47	
5- DISCUSSÃO	51
6- CONCLUSÃO	56
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	57
Anexo I	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura do DENV	17
Figura 2.	Ciclo de replicação do DENV	19
Figura 3.	Linha do tempo dos biomarcadores de dengue em pacientes com infecção primária e secundária	23
Figura 4.	Fluxograma para inclusão de pacientes no estudo	41
Figura 5.	Fluxograma dos critérios de elegibilidade e características gerais das amostras de pacientes inscritos	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas, sorológicas e comorbidades de acordo com a gravidade da dengue	46
Tabela 2	Risco de formas graves de dengue segundo características dos indivíduos incluídos	49
Tabela 3	Análise uni e multivariada avaliando o risco de formas graves de dengue segundo características dos indivíduos	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADE	Antibody dependente enhancement
C	Complemento
COX-2	ciclooxigenase-2
DcSA	Dengue com sinais de alarme
DCV	doenças cardiovasculares
DENV	Vírus da dengue
DF	Dengue Fever
DHF	Febre hemorrágica do dengue
DM2	Diabetes Mellitus 2
DNTs	doenças não transmissíveis
DSS	Síndrome de Choque do Dengue
DsSA	Dengue sem sinais de alarme
DV	Dengue Vírus
DWS	Dengue with warning signs
DwWS	Dengue without warning signs
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Famerp	Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto
FiO ₂	fração inspirada de oxigênio
GAG	glicosaminoglicano
IC	intervalo de confiança
ICAM	molécula de adesão celular intracelular
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
MAC	Complexo de ataque a membrana
MCP	Monócitos
MM	milímetros
mmHg	milímetros de mercúrio
MR	receptor de manose
NO	óxido nítrico
NS1	Proteína não estrutural 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	odds ratio
PaO ₂	pressão arterial de oxigenio
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
Th	Células T helper
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

UI/L	unidade por litro
VCAM	molécula de adesão celular vascular
ZIKV	Zika vírus
ZV	Zika vírus

RESUMO

Introdução: A dengue, um problema persistente de saúde pública desde o seu surto inicial na década de 1950, registou um aumento global significativo nas taxas de incidência e mortalidade nas últimas três décadas. Embora, a dengue normalmente se apresente como uma doença febril autolimitada; alguns casos podem progredir para formas graves e potencialmente fatais, particularmente em casos de presença de infecções heterólogas secundárias. Pesquisas recentes exploraram fatores de risco adicionais sobre infecções secundárias, incluindo condições de saúde subjacentes, mesmo em indivíduos sem exposição prévia à dengue, especialmente aquelas associadas à disfunção endotelial e à inflamação crônica. **Objetivo:** Este estudo examina a ligação entre diabetes e o desenvolvimento de dengue grave em pacientes sem experiência de dengue durante um surto de 2019; destacando o papel do diabetes como fator de risco na gravidade da dengue. **Material e métodos:** Este estudo transversal foi baseado em dados obtidos de prontuários informatizados e fichas de notificação de pacientes com dengue confirmada, cadastrados em coorte hospitalar de casos febris agudos entre dezembro de 2018 e novembro de 2019, em São José do Rio Preto, SP, Brasil. Foram registrados 769 casos de dengue confirmados laboratorialmente, identificados por meio de DENV RT-PCR ou teste de antígeno NS1. Posteriormente, investigamos a presença de anticorpos IgG antidengue e anti-Zika para examinar a história dessas duas infecções. Após análises laboratoriais, três grupos foram delineados: virgens/controle, histórico de Zika e histórico de dengue. As amostras com resultados positivos tanto para dengue quanto para

Zika foram excluídas das análises desde o início. **Resultados:** Inicialmente, idade superior a 59 anos, diabetes, hipertensão, doença renal, doença péptica, além de não ter dengue, foram associados à maior frequência de casos graves e potencialmente graves. A análise univariada de regressão logística binária identificou idade acima de 59 anos, diabetes, doença renal, doença péptica e hipertensão arterial, juntamente com a presença de anticorpos IgG anti-Zika, como fatores de risco; enquanto a presença de anticorpos anti-dengue foi considerada protetora. Quando analisamos exclusivamente amostras naives, o diabetes foi destacado como fator de risco independente para formas graves de dengue. **Conclusões:** Neste estudo, investigamos o diabetes como um fator de risco independente para dengue grave em indivíduos sem exposição prévia à dengue ou ao Zika. Esta descoberta é preocupante dada a prevalência global da diabetes e o seu potencial impacto mesmo naqueles sem exposição prévia à dengue. O reconhecimento destes fatores de risco é crucial para o desenvolvimento de estratégias de tratamento eficazes para reduzir a morbidade e mortalidade associadas à coexistência destas doenças.

Palavras- Chave: Dengue vírus; Diabetes mellitus; Resposta imune; Gravidade; Zika vírus.

ABSTRACT

Introduction: Dengue has been an ongoing public health problem since its initial outbreak in the 1950s, and this has recorded a significant global increase in incidence and mortality rates over the last three decades. While dengue typically presents as a self-limiting febrile illness, some cases can progress to

severe and life-threatening forms, particularly in cases of secondary heterologous infections. Recent research has explored additional risk factors over secondary infections, including underlying health conditions, even in individuals without prior exposure to dengue, notably, such ones associated with endothelial dysfunction and chronic inflammation. **Objective:** This study examines the link between diabetes and the development of severe dengue in dengue-naive patients during a 2019 outbreak, pointing out the role of diabetes as a risk factor for dengue severity. **Material and Methods:** This cross-sectional study was based on data obtained from computerized medical records and disease notification forms for patients with confirmed dengue enrolled in hospital cohort of acute febrile cases between December 2018 and November 2019, in São José do Rio Preto, SP, Brazil. We enrolled 769 laboratory-confirmed dengue cases, identified through DENV RT-PCR or NS1 antigen testing. Subsequently, we investigated the presence of anti-dengue and anti-Zika IgG antibodies to examine the history of these two infections. After laboratory analyses, three groups were delineated: naive/control, Zika history, and dengue history. Samples testing positive for both dengue and Zika were excluded from the analyses from the beginning. **Results:** Initially, age over 59 years, diabetes, high blood pressure, renal disease, peptic disease, as well as being dengue-naive, were associated with a higher frequency of severe and potentially severe cases. Binary logistic regression univariate analysis identified age over 59 years, diabetes, renal disease, peptic disease, and high blood pressure, along with the presence of anti-Zika IgG antibodies, as risk factors, while the presence of anti-dengue antibodies was considered protective. When

we analyzed exclusively naïve-samples, diabetes highlighted as independent risk factor to severe forms of dengue. **Conclusions:** In this study, we investigated diabetes as an independent risk factor for severe dengue in individuals with no previous exposure to dengue or Zika. This finding is troubling in view of the global prevalence of diabetes and its potential impact even in those without prior exposure to dengue. Recognizing these risk factors is crucial for developing effective treatment strategies to reduce the morbidity and mortality associated with the coexistence of these diseases.

Keywords: Dengue virus; Diabetes mellitus; Immune response; Severity; Zika virus.

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A infecção pelo vírus dengue (DENV) é um grande problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais. Todos os anos, cerca de 400 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus da dengue, com uma taxa de mortalidade de cerca de 1% entre os pacientes com dengue grave. (1) O vírus endêmico, em mais de 100 países da África, América e Ásia. (2)

Causada por um vírus de RNA de fita única, pertencente à família *Flaviviridae*, a dengue é transmitida por artrópodes como o *Aedes aegypti*, seguida pelo mosquito *Aedes albopictus* e outras espécies do gênero *Aedes*. (3) Existem quatro sorotipos de DENV, antigenicamente distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e DENV-5 (Malásia), que podem desencadear a doença, apresentando-se desde um quadro febril agudo, autolimitado, até doença grave e potencialmente fatal. Até 2008, a dengue era classificada de acordo com os critérios de propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) ,em 1997, como febre da dengue, febre hemorrágica da dengue (DHF) e síndrome do choque da dengue (DSS). (4) A atual classificação revisada pela OMS ,em 2009, categoriza os casos sintomáticos em dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta e dengue grave. Dentre as razões para o desenvolvimento de uma nova classificação, está a dificuldade de identificar formas graves, uma vez que a classificação de 1997 não contemplava alguns sinais de gravidade. Exigia critérios específicos para apoiar o diagnóstico de DHF, classificando de forma equivocada pacientes com clara evidência de extravasamento plasmático como DF e ,assim, gerando um atraso no

tratamento adequado. Além disso, durante a triagem e gerenciamento clínico, principalmente, em momentos de surtos, a classificação revisada atual tem maior potencial de a gravidade em qualquer momento de evolução da doença, diferente da classificação de 1997, em que o diagnóstico de DHF muitas vezes só era possível no final da evolução da infecção. (5,6)

A patogênese da infecção pelo DENV e manifestações graves da doença são bastante complexas e não completamente compreendidas. A marca fisiopatológica do DHF/DSS ou dengue grave (DG) é o extravasamento plasmático. Sabe-se que a resposta imune desempenha um papel fundamental na patogênese da doença; uma vez que a gravidade não está relacionada ao pico da viremia, mas sim ao momento posterior ao pico virêmico, no qual ocorre a ação do sistema imunológico e defervescência da febre. (4)

Estudos já foram realizados (7–9) enfatizando o papel dos fatores implicados na patogênese da dengue em humanos. Apesar de uma grande literatura disponível sobre a patogênese da dengue, ainda existem várias lacunas em nosso conhecimento, que representam um desafio crítico na compreensão dos conceitos de patogênese da doença e manifestações graves.

Classicamente, infecções heterólogas secundárias por DENV, em que um sorotipo diferente ao primeiro infectante está envolvido, têm sido associadas a manifestações graves de dengue. Esta ligação surge de uma intensa reação inflamatória e do aumento da resposta imune, fenômeno denominado “Antibody dependente enhancement” (ADE). (2) Uma infecção subsequente por um sorotipo distinto do primeiro DENV desencadeia uma reação inflamatória amplificada, resultando em carga viral elevada, danos às

células endoteliais e extravasamento de plasma. (4) No entanto, este mecanismo tem sido implicado para infecções secundárias e não é suficiente para explicar todas as ocorrências de episódios graves. Nos últimos anos foram identificados fatores adicionais como riscos potenciais, inclusive em indivíduos sem exposição prévia à dengue (naive). (10) Aspectos não-imunes do hospedeiro, como a presença de condições de saúde subjacentes (comorbidades), têm sido implicados no desenvolvimento de formas graves de dengue. Digno de nota é a associação com diabetes mellitus.

Considerando o impacto da dengue em termos de morbi-mortalidade e as lacunas que ainda são vigentes nas formas graves da doença, especialmente, aquelas que não envolvem o mecanismo já extensamente explorado de ADE, estudos visando tais elucidações fisiopatogênicas fazem-se iminentemente necessários.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1- O vírus

O DENV é um vírus de RNA, de fita única, envolto com um nucleocapsídeo coberto pela bicamada lipídica. Ele é composto por três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais (NS). As proteínas estruturais - Capsídeo (C), Envelope (E), pré-membrana (prM) –são os componentes estruturais de uma partícula viral que formam o nucleocapsídeo viral, além do envolvimento na formação de membranas, maturação e envolvimento dos virions. As proteínas não-estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3,

NS4A, NS4B e NS5 têm diversas atividades enzimáticas que estão sendo exploradas por seus múltiplos papéis em um ciclo infeccioso. Destacamos a atividade das proteínas NS2B, uma serina protease viral e, juntamente com outras proteínas NS NS1, NS2A, NS4 e NS4B, desempenha diversos papéis na replicação, montagem e liberação viral. Figura 1. (1)

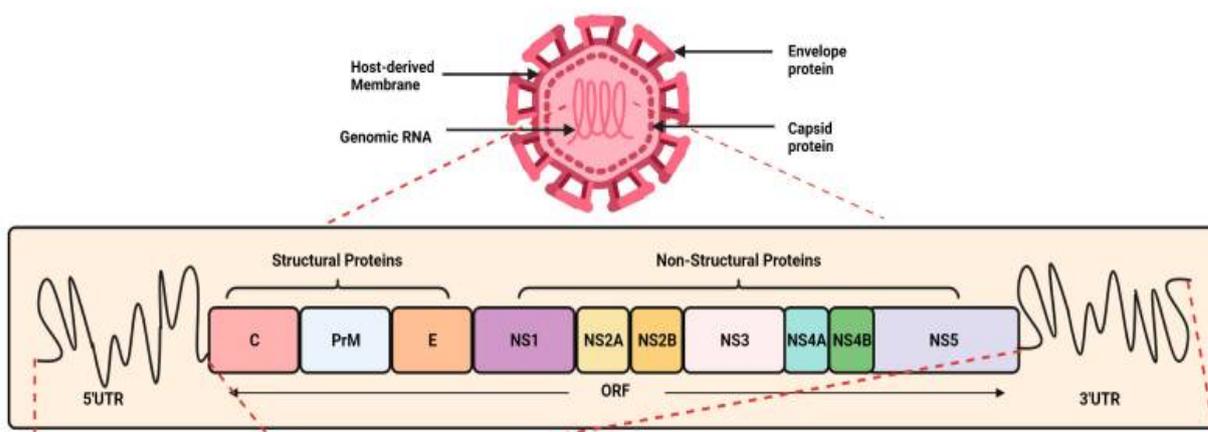


Figura 1 Estrutura do DENV, adaptado de Calisher CH et.al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. J Gen Virol (2021)

Além da NS2B, merece destaque a NS1. Atualmente, a confirmação laboratorial da dengue pode ser feita pela detecção do antígeno NS1, (11) que representa um marcador de multiplicação viral, sendo detectado precocemente na doença, Além disso, verificou-se que o nível sérico ou plasmático de DENV NS1 se correlaciona diretamente com o título de viremia e a gravidade da doença. (12)

A transmissão do vírus aos seres humanos ocorre durante o repasto sanguíneo de mosquitos fêmeas, principalmente, das espécies *Aedes aegypti*, mas também por outras espécies do gênero, como *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*, *Ae. scutellaris*. O vírus, presente na glândula salivar do

mosquito, liga-se a uma variedade de moléculas do hospedeiro, incluindo as células epiteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células T, células endoteliais e hepatócitos, iniciando-se assim o ciclo de replicação. (1) Dentre os principais receptores estão receptor de manose (MR), presente em monócitos e macrófagos e sulfato de heparano, glicosaminoglicano (GAG) receptor de células epiteliais. Através destes receptores ou de vias alternativas, como a mediada por clarina, ocorre a endocitose do vírion. Após a endocitose, forma-se um endossoma, que por sua vez já maduro, sofre mudanças conformacionais, fazendo com que o genoma viral encapsulado seja liberado no citoplasma da célula hospedeira. Assim, o RNA viral funciona como modelo para replicação e tradução viral no retículo endoplasmático da célula hospedeira. O genoma replicado e as proteínas virais traduzidas formam uma partícula viral imatura no retículo endoplasmático. Este vírus imaturo transforma-se no complexo de Golgi, tornando-se um vírus maduro, que sofre exocitose, completando o ciclo de infecção. Figura 2. (1)

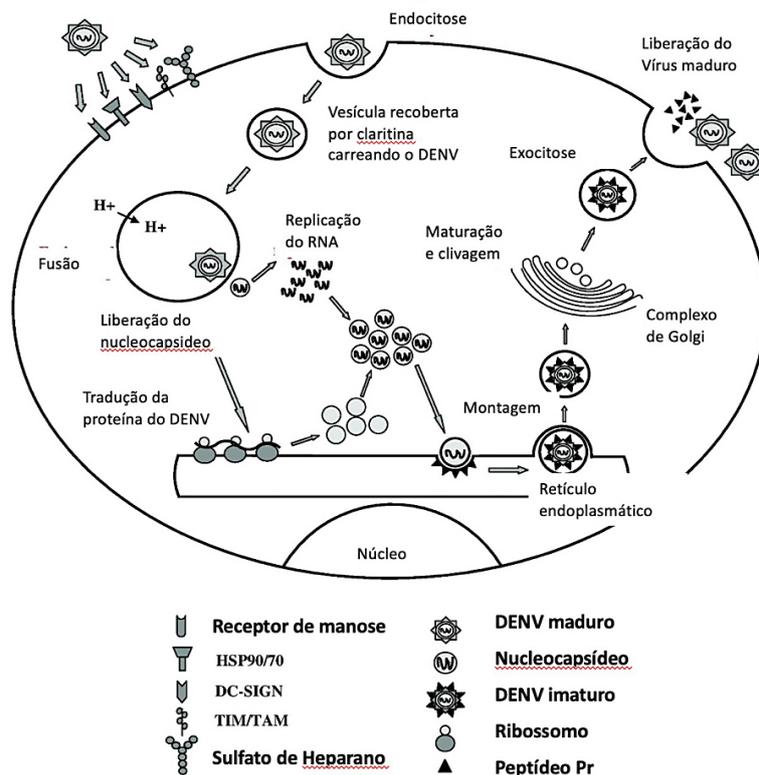


Figura 2 - Ciclo de replicação do DENV – adaptado de Sudipta Kumar Roy and Soumen Bhattacharjee. 2021. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. Canadian Journal of Microbiology. 2021. 67(10): 627-702.

2- Epidemiologia

A referência mais antiga à dengue no Brasil foi feita durante o período colonial, sendo o primeiro caso descrito na cidade de Recife em 1685. Sete anos depois, em Salvador, uma epidemia de dengue ocasionou aproximadamente 2000 mortes. O surto de dengue de 1846 também foi considerado uma epidemia, atingindo vários estados, como Rio de Janeiro e São Paulo. Entre 1846 e 1916, São Paulo foi atingido por várias epidemias de dengue. Sendo assim, no início do século XX, Oswaldo Cruz implementou um programa de controle de mosquitos que durou muitos anos, *Aedes aegypti* foi

erradicado no Brasil na década de 1950, mas foi introduzido novamente na década de 1980.

Desde a primeira epidemia de dengue em Roraima, *A. Aegypti* persistiu no Brasil até o presente. Durante a epidemia de Roraima, os sorotipos DENV1 e 4 foram isolados. Em 1986, uma epidemia de dengue surgiu no Rio de Janeiro e em algumas áreas urbanas do nordeste do Brasil, com disseminação de DENV1 e relatos de mais de 50.000 casos. (13)

Em 1990, o DENV2 foi introduzido no Rio de Janeiro, atingindo várias áreas do Sudeste do Brasil. Em 1998, uma pandemia de mais de 500.000 casos ocorreu no Brasil. O vírus se espalhou por todo o país, com o maior número de casos sendo relatados no nordeste do Brasil. (13) Em 2000, o DENV3 foi isolado no Rio de Janeiro, e uma nova epidemia de dengue ocorreu entre 2001 e 2003. Vários estados do sul foram afetados pela dengue pela primeira vez, com a maioria dos casos ocorrendo em pessoas com mais de 15 anos de idade. (13)

O padrão de surtos de epidemia de dengue que ocorrem a cada três a cinco anos foi mantido no Brasil até 2010, quando mudou para a cada dois anos, talvez por causa do movimento de pessoas para eventos esportivos globais no país citados acima. (13)

A dengue distribui-se em uma larga faixa abaixo e acima do Equador, 35 graus norte a 35 graus sul, sendo endêmica em mais de 100 países na maioria das áreas povoadas tropicais e subtropicais do mundo, sendo relatada

predominantemente no Sudeste Asiático, nas Américas e no Pacífico Ocidental e com menos frequência nas regiões da OMS da África e no Mediterrâneo Oriental. (14) Até a década de 1990, o Sudeste Asiático constituía-se na região do mundo mais atingida por dengue. Após, os países das Américas Central e do Sul destacaram-se nesse cenário e passaram a contribuir com mais da metade dos casos notificados no mundo. (15) Vem se expandindo gradualmente para áreas anteriormente livres de dengue como resultado da expansão vetorial e do movimento humano, que desempenham papéis vitais.

Globalmente, os casos de incidentes de dengue têm aumentado gradualmente de 30 668 000 casos, em 1990, para 56 879 000 casos, em 2019. (14) Sendo os casos mais frequentes entre as mulheres do que entre os homens, e com maior positividade na faixa etária de 15 a 49 anos no globo e em diferentes regiões. (14) Quanto à mortalidade, observou-se uma transição da faixa etária de <5 anos para a faixa etária de 15 a 49 anos. (14) O Sudeste Asiático e o Sul da Ásia com maior número de casos, no entanto, os indicadores denotam uma rápida expansão de casos nas Américas. A dengue é hiperendêmica na América Latina tropical, especialmente, no Brasil, onde vários sorotipos de DENV co-circulam. A mudança do sorotipo predominante do DENV 1-4 contribui muito para a morte por dengue. O aumento da taxa de mortalidade foi observado, após o grande movimento de pessoas causado por quatro eventos esportivos globais: os Jogos Pan-Americanos de 2011 em Guadalajara (México), a Copa das Confederações de 2013 (Brasil), a Copa do Mundo de 2014 (Brasil) e as Olimpíadas de 2016 (Brasil). À medida que a geografia da dengue se expande, as características epidemiológicas da dengue

também têm evoluído. O índice sociodemográfico é uma medida que integra renda, anos médios de escolaridade e fertilidade para refletir o espectro de desenvolvimento comparativo de um país ou território mais intimamente ligado à previsão de resultados de saúde. A maior incidência de dengue ocorreu em regiões com índice sociodemográfico baixo-médio. (14)

3- Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial pode contribuir para a decisão clínica e diagnóstico diferencial nos casos de dengue. Um estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que os testes diagnósticos laboratoriais auxiliam nas decisões em saúde em 60-70% dos casos. (16) A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que os testes laboratoriais ideais sejam acessíveis, sensíveis, específicos, fáceis de usar, rápidos (podem ser armazenados à temperatura ambiente e interpretados dentro de 30 minutos), sem equipamentos e entregues àqueles que precisam deles.

Para o diagnóstico laboratorial de dengue podemos utilizar alguns biomarcadores. Dentre eles, aqueles que incluem o próprio vírus (isolamento do vírus em cultura ou mosquitos, difícil realização e aplicação prática, ou a detecção direta de RNA genômico viral), produtos virais (captura e detecção da proteína NS1 secretada). Também, a resposta imune do hospedeiro à infecção viral (através da medição da imunoglobulina M [IgM] específica do vírus e da imunoglobulina G [IgG]).

A dinâmica destes marcadores difere tanto na infecção primária e secundária quanto nos estágios da doença. Na infecção primária, a proteína

não estrutural 1 (NS1) e o vírus podem ser detectados desde o início da doença, com a imunoglobulina M (IgM) , aparecendo por volta terceiro dia e a imunoglobulina G (IgG) aparecendo no final do período agudo. As infecções secundárias são caracterizadas pela presença de IgG no início da fase aguda da e uma duração mais curta da detecção de NS1. (17) Figura 3. Abaixo, estão detalhadas algumas particularidades de cada teste diagnóstico.

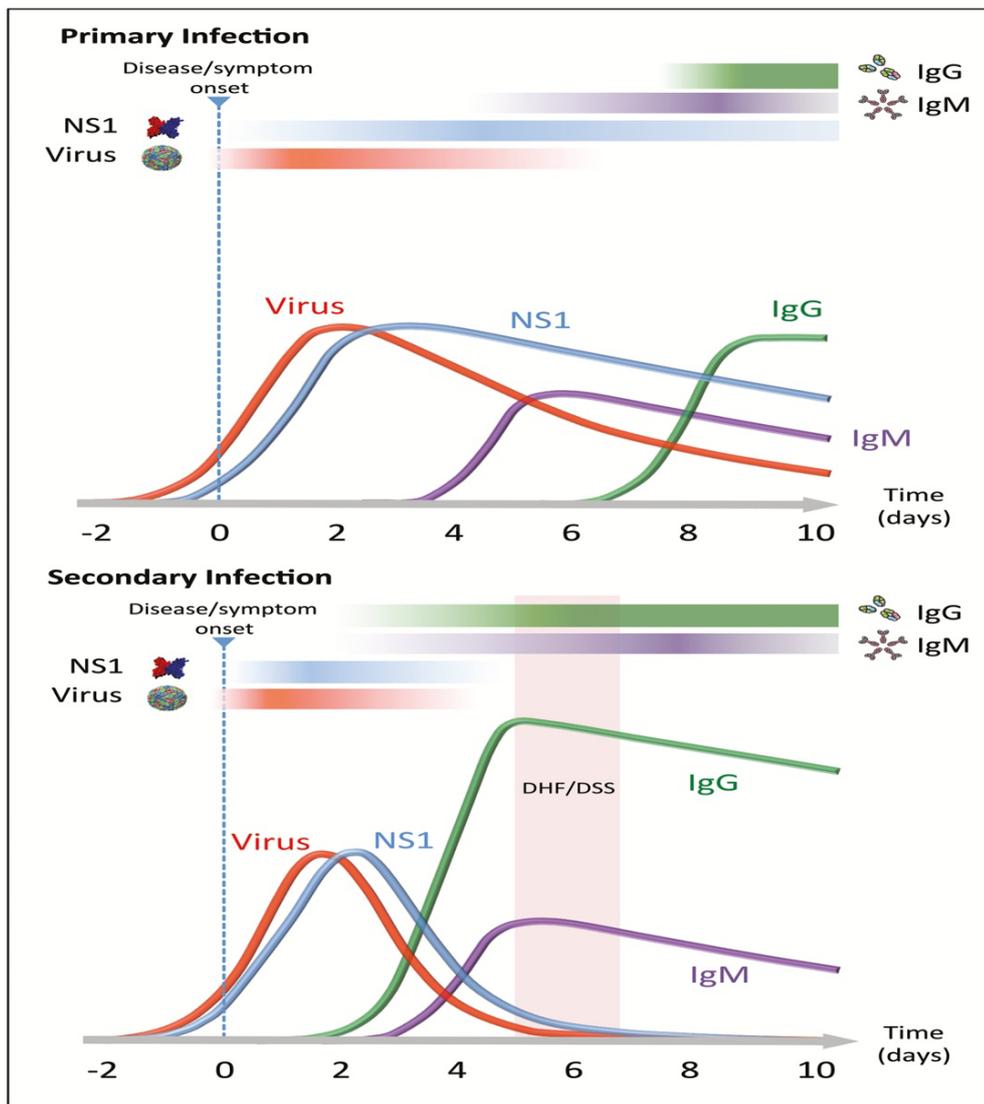


Figura 3 - Linha do tempo dos biomarcadores de dengue em pacientes com infecção primária e secundária. Adaptado de David A. Muller, et.al. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection (2017)

a. Detecção de RNA viral

A detecção de RT-PCR do RNA viral da dengue pode ser realizada através do sangue, soro ou plasma, sendo um método rápido, sensível e específico para a confirmação da infecção pela dengue. A sensibilidade da RT-PCR convencional varia de 48,4 a 98,2% e tem um limite de detecção de uma a 50 unidades formadoras de placa. (17) Esses ensaios empregam primers que se ligam a regiões conhecidas do genoma DENV. Além das amostras de sangue, a RT-PCR também pode ser usada para detectar RNA DENV em tecidos, incluindo espécimes fixados em formalina. Embora a RT-PCR geralmente exija experiência em técnicas moleculares e equipamentos caros, protocolos modificados usando termociclos de rampa rápida podem ser usados em conjunto com operadores recém-treinados durante períodos de emergência.(12) Porém o custo deste método ainda é elevado.

b. Detecção de antígeno

Dengue NS1 é uma glicoproteína essencial para a viabilidade do DENV e é secretada de células infectadas. Verificou-se que o nível sérico ou plasmático de DENV NS1 se correlaciona com o título de viremia e a gravidade da doença. Kits de detecção baseados em captura NS1 disponíveis comercialmente apresentam sensibilidades que variaram de 54,2 a 93,4%. No entanto, a detecção de NS1 é menos sensível na infecção secundária por dengue (67,1–77,3%) em comparação com os casos primários de dengue (94,7–98,3%), provavelmente devido à presença de anticorpos anti-NS1

reativos cruzados que impedem a detecção de proteínas NS1 livres no soro ou plasma.

(12)

c. Detecção de anticorpos (IgM e IgG)

A detecção de anticorpos antidengue (IgM e IgG) é o teste mais utilizado no diagnóstico de dengue. Existem duas versões desses testes, ELISA (teste de imunoensaio) ou formato de tiras (teste rápido). Embora o ELISA forneça maior sensibilidade, o formato de tira é aceitável para uso à beira do leito. (17) Um estudo multinacional e multicêntrico de dez kits IgM concluiu que os kits de detecção baseados em ELISA têm sensibilidades mais altas (61,5–99,0%) em comparação com os formatos de teste rápido (20,5–97,7%). (18) As especificidades estão na faixa de 79,9–97,8% e 76,6–90,6% para ELISA e testes rápidos, respectivamente. (12,18)

A resposta de anticorpos na forma de IgM antidengue pode ser detectada a partir de 3-5 dias, após o início da doença. Os níveis de IgM aumentam por aproximadamente duas semanas, persistindo por aproximadamente 179 e 139 dias, após a infecção primária e secundária, respectivamente. (12)

Durante a infecção primária, a IgG só pode ser detectada após 10 dias do início da doença, tornando-a menos útil para o diagnóstico precoce. No entanto, o rápido aumento dos níveis de IgG durante a infecção secundária (no quarto dia da doença) pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica de

infecção aguda por dengue, associada ao IgM quando interpretados corretamente. (12,17,19) As limitações dos testes de IgM anti-DENV incluem sua incapacidade de identificar o tipo DENV infectante e a potencial reatividade cruzada de anticorpos com outros flavivírus (18). Portanto, informações epidemiológicas sobre a prevalência de outros flavivírus seriam úteis para orientar a interpretação de um achado positivo de IgM. Falsos positivos também foram observados em pacientes com dengue ou infecção por malária prévia, assim como infecção por Zika, que devido a similaridade gênica de 58%, apresentam reatividade cruzada. (20) Assim, apesar de ser amplamente utilizado, os testes sorológicos apresentam falhas no diagnóstico, por esse motivo, é utilizado como diagnóstico presumptivo em termos de pesquisa e não confirmatório.

3- Formas clínicas

Logo após a infecção do hospedeiro, o vírus inicia o processo de invasão. As primeiras células infectadas pelo DENV são os macrófagos presentes na pele e as células dendríticas. Quando essas células atingem os gânglios linfáticos, os macrófagos e monócitos presentes neste local são infectados, fazendo com que ocorra a disseminação do vírus. A viremia pode ser detectada 24 a 48 h antes do início dos sintomas clínicos e pode durar até 10 a 12 dias. (1) . O período de incubação varia de quatro a 10 dias nas formas sintomáticas.

A dengue possui um amplo espectro clínico, incluindo desde formas oligossintomáticas até quadros graves, podendo evoluir para o óbito. As formas assintomáticas ou subclínicas compreendem entre 29% e 56% dos casos.

Dentre os fatores de risco que determinam a gravidade da doença estão infecção secundária, idade, etnia e possivelmente doenças crônicas (asma brônquica, anemia falciforme e diabetes mellitus). (3)

Na apresentação habitual, a primeira manifestação é a febre, geralmente alta (39oC a 40oC), de início abrupto, associada à cefaleia, adinamia, mialgias, artralgias, dor retroorbitária. O exantema, presente em 50% dos casos, é predominantemente do tipo máculo-papular, atingindo face, tronco e membros de forma aditiva, não poupando plantas de pés e mãos, e podendo apresentar-se sob outras formas com ou sem prurido, frequentemente no desaparecimento da febre. Anorexia, náuseas e vômitos podem estar presentes. Entre o terceiro e o sétimo dia do início da doença, quando ocorre a defervescência da febre, podem surgir sinais e sintomas classificados como sinais de alarme que devem ser rotineiramente pesquisados, bem como, os pacientes devem ser orientados a procurar a assistência médica na ocorrência deles. (21–23)

Em geral, os sinais de alarme anunciam a perda plasmática e a iminência de choque circulatório. Se reconhecidos precocemente, valorizados e tratados com reposições volumétricas adequadas, melhoram o prognóstico da doença. O sucesso do tratamento do paciente com dengue está no reconhecimento precoce dos sinais de alarme. O período de extravasamento plasmático e choque leva de 24 a 48 horas, devendo o médico estar atento à rápida mudança das alterações hemodinâmicas. (23)

Foram criadas ao longo dos anos classificações clínicas da dengue, a fim de que pudessem orientar os especialistas no tratamento adequado e em

tempo correto de acordo com o quadro clínico e gravidade. Em 1975, (6) foi desenvolvida por um consenso de especialistas com base em estudo sobre crianças tailandesas nas décadas de 1950 e 60, com modificações em 1986 e 1997, (23) que separou as infecções sintomáticas em dois grandes grupos, a dengue (DF), doença febril aguda acompanhada de sintomas constitucionais (clássica) e a Febre Hemorrágica do Dengue (DHF), caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e hemostasia alterada que pode progredir para choque hipovolêmico, Síndrome do Choque do Dengue (DSS). (6,23) Essa classificação sofreu diversas críticas de especialistas, uma vez que alguns casos graves não se enquadravam na classificação de DHF devido a exigência de critérios específicos e não eram tratados de forma adequada. Assim, em 2009, a OMS (Organização Mundial da Saúde), com base nas opiniões de especialistas, revisões e em grande estudo multicêntrico realizado no Sudeste Asiático e na América Latina, revisou a classificação de dengue e formulou uma nova diretriz. A nova diretriz classifica os pacientes com dengue sintomática em três grupos, sendo eles dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alarme e dengue grave. (23)

A identificação de sinais de alarme tornou-se imprescindível para que os pacientes sejam manejados de forma e em tempo hábil. Assim, destaca-se dentre os sinais de alarme, vômitos persistentes, que se baseiam na frequência, duração e impacto do sintoma; dor ou sensibilidade abdominal intensa e contínua; letargia ou inquietação, que compreende em alteração da consciência e/ou pontuação de Glasgow <15, sonolência e/ou irritabilidade; acúmulo clínico de fluidos, incluindo o derrame pleural e a ascite, além de

espessamento da vesícula biliar, edema (face e extremidades) e fluidos livres ao redor da bexiga urinária; Aumento do hematócrito em mais de 20% em relação à linha de base ou aumento de hematócrito maior que 48%, alguns estudos diferenciam entre os gêneros, maior que 45% para homens e maior que 41% para mulheres, (23,24) associado a diminuição rápida das plaquetas, considerada como queda na contagem de plaquetas em $10.000/\text{mm}^3$ em 24 horas em relação à medição anterior; hepatomegalia dolorosa; sangramento de mucosas, incluindo sangramento gengival, sangramento gastrointestinal (hematoquezia, melena), sangramento vaginal (menorragia, metrorragia), trato respiratório (hemoptise), sangramento do trato urinária (hematúria), sangramento da pele (petéquia, púrpura, equimoses, hematomas), sangramento ocular(conjuntivo, subconjuntival, retiniano). (23)

Quanto às manifestações clínicas classificadas como dengue grave, estão o extravasamento de plasma, sangramento severo e disfunções orgânicas. O extravasamento de plasma, causa um choque circulatório, que consiste na pressão de pulso estreita (menor que 20 mmHg), hipotensão (pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg), taquicardia (pulso maior que 100 batimentos por minuto), hipoperfusão, pulso indetectável ou não registrável; além do desconforto respiratório devido ao acúmulo de líquido no terceiro espaço, perceptível através da frequência respiratória aumentada, relação $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ menor que 200, nível de saturação de oxigênio menor que 92%, necessidade de oxigenoterapia, e acidose respiratória. (23)

Sangramento severo é considerado quando há sangramento de trato gastrointestinal com necessidade de transfusão sanguínea, instabilidade hemodinâmica, sangramentos que necessitam de intervenção cirúrgica para controle. Dentre os órgãos acometidos, as alterações cardíacas manifestam-se como miocardite, insuficiência cardíaca e cardiomiopatia. O acometimento do sistema nervoso central, como encefalite e/ ou encefalopatia, com alteração do nível de consciência sem outras anormalidades metabólicas vinculadas ou outra explicação aparente, na presença de pleocitose no líquido cefalorraquidiano, sinais neurológicos focais e convulsões. Acometimento renal, com injúria renal aguda. Hepático, com elevação de transaminases (valores acima de 1000 UI/L), configurando hepatite. (23)

4- Patogênese e resposta imune das formas graves

A patogênese da infecção pelo vírus da dengue levando a manifestações graves ainda é muito complexa e não completamente compreendida. Sabe-se que o extravasamento plasmático e alteração da hemostasia é a principal alteração que ocorre na dengue grave como já exemplificado acima. Vários fatores tanto do hospedeiro quanto virais podem estar implicados nessas manifestações, podemos citar o antígeno viral não estrutural da proteína 1 (NS1), variação genômica DENV, fenômeno conhecido como “Antibody Dependent Enhancement (ADE), reação cruzada de células T de memória, anticorpos anti-DENV NS1 e autoimunidade do hospedeiro. Além disso, evidências atuais sugerem que, além de fatores virais, idade, sexo, status social, histórico genético, anemia falciforme, uremia, asma brônquica, alergias, hipertensão, insuficiência renal crônica e também DM podem

influenciar negativamente a apresentação clínica de uma infecção.(25) O efeito sinérgico desses diversos fatores mencionados está implicado na patogênese do dengue grave. (26) Abaixo, os principais mecanismos implicados na patogênese de gravidade do dengue.

4.1 Papel do NS1

Durante a fase aguda da doença, os níveis de NS1 são particularmente altos, o que se correlaciona com a gravidade da doença. Isso ocorre porque o antígeno DENV NS1 tem uma ação direta no endotélio vascular, causando interrupção da integridade da monocamada das células endoteliais, provocando a produção de citocinas inflamatórias através da ativação de macrófagos e células mononucleares do sangue periférico. Além disso, o NS1 também induz a ruptura da camada de glicocálice, ativa o sistema complemento que é um mecanismo de defesa do hospedeiro contra a infecção, ajudando na opsonização de partículas virais. O resultado da ativação do complemento é a lise das células-alvo através da montagem do complexo de ataque de membrana (MAC), que é composto de proteínas do complemento C5b-C9. O complexo C5b-C9 por sua vez, estimula a expressão de citocinas inflamatórias. Todos estes fatores contribuíram para o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático, evoluindo para síndrome do choque do dengue. (9,26)

4.2“Antibody Dependent Enhancement (ADE)

Os anticorpos desempenham uma ampla gama de funções, dentre elas, impedem a ligação viral aos receptores da superfície celular ou impedem a

entrada do vírus após a ligação com o receptor celular. Agem principalmente através da proteína do envelope (E) e são direcionados contra quase todos os epítomos. Tanto os monócitos quanto os macrófagos expressam os receptores de imunoglobulina (Fcγ). (8,9) Através deste conhecimento, é possível entender o fenômeno do ADE (“Antibody Dependent Enhancement”), que ocorre durante uma infecção secundária pelo DENV. Isso porque, durante a infecção primária, são produzidos anticorpos contra um determinado sorotipo de DENV, que quando em contato com outro sorotipo, durante a infecção secundária, não são eficientes em neutralizar o vírus, formando um imunocomplexo anticorpo-vírus, que se liga ao receptor Fcγ presente nos monócitos circulantes, aumentando a replicação viral, aumento de citocinas e maior risco de dengue grave. Este mecanismo é considerado imunopatogênico. (8)

4.3 Variação do Genoma DENV e RNA Subgenômico

A doença grave da dengue tem sido associada a todos os quatro sorotipos DENV. No entanto, devido às diferenças genéticas entre vários genótipos DENV, cada genótipo tem uma diferença na virulência, bem como, no potencial epidêmico. Isso contribui para o desenvolvimento de doenças clínicas graves por poucos genótipos e cepas. O genótipo DENV-2 do Sudeste Asiático é mais virulento e se replica em um título mais alto do que o genótipo DENV-2 indígena americano, levando assim a uma doença grave. Isso ocorre pela replicação mais eficiente nas células-alvo primárias, ou seja, as células dendríticas imaturas que residem na epiderme, proporcionando uma vantagem seletiva sobre vírus de menor potencial patogênico.

A variação no genoma do DENV não é o único fator que contribui para a patogênese da dengue grave, mas o RNA subgenômico do flavivírus (sfRNA) também tem um papel importante a desempenhar na replicação do DENV em células hospedeiras humanas. O sfRNA é gerado quando o genoma do RNA do DENV é incompletamente dividido em pequeno RNA pela exoribonuclease hospedeira, durante a replicação. Este sfRNA acumula e suprime as respostas imunes antivirais do hospedeiro, particularmente a sinalização IFN tipo 1. Também pode causar evasão imunológica e levar à dengue grave, alterando a estabilidade do mRNA do hospedeiro.(26)

4.4 Infecção prévia pelo vírus Zika

Vários estudos mostram resultados conflitantes sobre como infecções prévias pelo vírus da dengue afetam a infecção subsequente pelo vírus Zika. Alguns estudos sugerem que a imunidade pré-existente à dengue pode proteger contra o Zika, enquanto outros não encontraram essa relação. Além disso, a influência da infecção anterior pelo Zika na dengue também é incerta, com alguns estudos indicando um aumento da gravidade da dengue após infecção prévia pelo Zika e outros não. Essa complexa interação entre os dois vírus e as respostas imunológicas ainda não está completamente compreendida. Katzelnick e colaboradores (27) descobriram que crianças nicaraguenses com histórico de infecção pelo vírus Zika tiveram uma probabilidade de 12,1% de infecção sintomática pelo vírus da dengue-2 em 2019/2020, enquanto aquelas com histórico de infecção pelo vírus da dengue tiveram uma probabilidade de 9,2%, e aquelas com pelo menos duas infecções pelo vírus da dengue, 2,9%, em comparação com uma probabilidade de 3,5%

em crianças não expostas a flavivírus. Também foi observado que níveis intermediários de anticorpos anti-vírus Zika estavam associados às infecções graves e sintomáticas pelo vírus da dengue, e que a infecção prévia pelo vírus Zika modulou o curso da doença da dengue de maneira semelhante à infecção prévia pelo vírus da dengue. Estudos usando modelos animais sugeriram que a infecção prévia pelo vírus Zika resultou em aumento da carga viral do vírus da dengue (28,29), mas também melhorou a resposta imunológica em termos de expressão de citocinas pró-inflamatórias. (28) No entanto, outro grupo descobriu que a infecção prévia pelo vírus Zika não afetou a viremia ou o status pró-inflamatório do vírus da dengue em macacos rhesus. (30) Chestnut e colaboradores (31) demonstraram em um modelo de pele ex vivo que a infecção prévia pelo vírus Zika seguida pela infecção pelo vírus da dengue-2 resultou em maior densidade de células infectadas pelo vírus da dengue-2 e menor quantidade de vírus necessária para a infecção de células mieloides. Da mesma forma, a infecção prévia pelo vírus Zika também foi associada a uma maior gravidade da infecção pelo vírus da dengue em um modelo de camundongo. (32,33)

5- Diabetes mellitus

Atualmente, aproximadamente 537 milhões de indivíduos em todo o mundo são afetados pela diabetes, com uma maioria significativa de quase 80% (equivalente a 425 milhões) concentrada em regiões específicas: América do Sul e Central, África, Oriente Médio e Norte de África, Sudeste Asiático e o Pacífico Ocidental. (34) Curiosamente, estas mesmas regiões também suportam um peso substancial da dengue, conforme indicado pelos resultados

do Estudo da Carga Global de Doenças, em 2017.(35) Então, existe uma sobreposição significativa entre regiões sobrecarregadas com alta prevalência de diabetes e aquelas que apresentam circulação endêmica de dengue. O diabetes é uma condição clínica multifacetada, sendo que o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) constitui aproximadamente 95% dos casos globais.(36) Esta forma é intrinsecamente vista como um distúrbio endotelial causado por hiperglicemia e levando a um comprometimento panvascular.(21)

As complicações diabéticas podem ser classificadas de acordo com o envolvimento de cardiopatia e encefalopatia, nefropatia, retinopatia e vasculopatia periférica. Vários aspectos da imunidade estão alterados em pacientes com diabetes. A função leucocitária dos polimorfonucleares está deprimida, particularmente quando a acidose também está presente. Aderência leucocitária, quimiotaxia e fagocitose podem ser afetadas. Embora esses achados in vitro ainda não tenham sido totalmente confirmados em estudos clínicos, há evidências de que a melhora do controle glicêmico em pacientes melhora a função imunológica. (15)

O papel do diabetes na patogênese das doenças cardiovasculares (DCV) foi descoberto no final da década de 1970, quando dados do Framingham Heart Study demonstraram uma ligação clara entre as duas condições. (37) Uma porcentagem maior de pacientes com diabetes, em comparação com aqueles sem a doença, apresenta comorbidades cardiovasculares (por exemplo, hipertensão, dislipidemia) e complicações (por exemplo, doenças cardíacas e vasculares). (37) A DCV continua sendo a

causa mais comum de morte e complicações tanto no diabetes tipo 1 quanto no diabetes tipo 2. (38) O estado diabético devido a níveis elevados de glicose ao longo do tempo desempenha um papel independente no desenvolvimento de DCV; acelera a maioria das patologias cardíacas devido a anormalidades na inflamação vascular sistêmica e local, lesão endotelial e microvascular, trombose alterada, disfunção autônoma de terminações nervosas e disfunção do endotélio. (39)

O endotélio dos vasos sanguíneos não só fornece uma cobertura mecânica, mas também é uma camada interna biologicamente ativa do vaso sanguíneo, desempenhando diversas funções. O endotélio normal evita o acúmulo de leucócitos e a ocorrência de trombose em sua superfície. Além disso, promove a fibrinólise de possíveis trombos que possam se formar através da secreção do fator ativador de plasminogênio (tPA), formando a plasmina, que leva a degradação da fibrina. Na inflamação, é secretada uma proteína que inibe o tPA, um anti-fibrinolítico, também aumentado na DM tipo 2, devido ao estado pró-inflamatório da doença. As variadas funções descritas são mediadas por proteínas específicas ou outros agentes como prostaglandinas e óxido nítrico (NO) secretados pelo endotélio. Assim, a ação pró-fibrinolítica do endotélio é convertido em atividade antifibrinolítica pela inflamação. A função endotelial deteriora-se com a idade e na presença de vários outros fatores que incluem hiperglicemia (diabetes), obesidade, hipercolesterolemia, hipertensão, menopausa e tabagismo. Sendo assim, a disfunção endotelial está associada a um estado pró-constritor dos vasos

sanguíneos, pró-agregador plaquetário, pró-inflamatório, pró- trombótico e antifibrinolítico. (37; 39)

O diabetes tipo 2 é uma condição inflamatória caracterizada por elevação concentrações de reagentes inflamatórios de fase aguda em no plasma, o ácido siálico e a citocina pró-inflamatória, IL-6. (39,40) O conceito de inflamação em relação a condições metabólicas como obesidade e resistência à insulina consiste no estudo de adipócitos, que expressam constitutivamente a citocina pró-inflamatória, fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$).

6- Dengue x Diabetes mellitus

Tanto a dengue quanto o diabetes são endêmicos com períodos epidêmicos em países de baixa e média renda. Estudos observacionais em diversos países têm demonstrado correlação entre diabetes e formas graves de dengue. Embora o mecanismo patogênico ainda não esteja claro, destacam-se aspectos inflamatórios mediados através de moléculas inflamatórias em pacientes diabéticos, como $TNF-\alpha$, IL-6, IFN- γ , IL-2, óxido nítrico (NO) e células T-helper tipo 1, células endoteliais, epiteliais e integridade do citoesqueleto. (36)

As células T auxiliares desempenham um papel importante na inflamação e na resposta imune adaptativa. Existem dois tipos principais de células T-helper, que são Th1 e Th2. As células Th1 produzem interleucina (IL)-2 e interferon (IFN)- γ enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Th1 funciona como células efetoras para ativar macrófagos através da

secreção de IFN- γ . Esses macrófagos ativados, também conhecidos como macrófagos M1, atraem linfócitos, células natural killer e neutrófilos, resultando em respostas pró-inflamatórias. No estágio inicial de diferenciação de Th1, IL-12 e IFN- γ são produzidos por células apresentadoras de antígeno e células natural killer que levam ao início da resposta Th1. Por sua vez, a presença de IFN- γ inibe a expressão de IL-4 que impede a transformação de Th2. A produção de IL-4 e IL-10 de Th2 é bem conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias. IL4 e IL-13 liberadas de Th2 também estão associadas à cicatrização tecidual e ao bloqueio da produção de proteína associada a Th2, resultando em cicatrização tardia da ferida in vivo. Um desequilíbrio das citocinas Th1 e Th2 pode resultar em um resultado clínico ruim. IFN- γ e TNF- α são citocinas inflamatórias produzidas pelo Th1, responsáveis por várias atividades envolvendo a vasculatura e o dano endotelial. Vários estudos mostraram que altos níveis de IFN- γ e TNF- α estão associados à gravidade da Dengue. Esta combinação resulta em dano endotelial in vitro, que é mediado pela via do óxido nítrico. Mecanismos extracelulares induzidos por neutrófilos podem aumentar a permeabilidade vascular nas células endoteliais e induzir a ativação endotelial, o que eventualmente aumenta a inflamação, causando extravasamento vascular entre pacientes com Dengue. No diabetes, ocorre um desequilíbrio de Th1/Th2, a resposta imune está desregulada, tanto humoral quanto celular, e uma mudança para Th1 favorece a via patogênica. A IL-2 e o IFN- γ induzem a destruição de células β , facilitando a localização de células T autorreativas para células pancreáticas e causando sua destruição. Enquanto, a resposta Th2, particularmente IL-10, acelera a destruição, aumentando a

infiltração dessas células autorreativas. No entanto, a mecânica de como esses 2 tipos de células auxiliares causam o dano é distinta e, portanto, as células Th1 e Th2 e seus respectivos mediadores participam e cooperam na indução e destruição de células β das ilhotas pancreáticas. (36)

3- MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo transversal baseado em dados obtidos de prontuários médicos informatizados e fichas de notificação de doenças de pacientes com dengue confirmados e inscritos em uma coorte hospitalar de casos febris agudos entre dezembro de 2018 e novembro de 2019, em São José do Rio Preto, SP, Brasil.

1- Considerações éticas

O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes da Declaração de Helsinque e realizado em amostras retrospectivas com dispensa do termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (CAAE 14262619.0.0000.5415 de 13 de agosto de 2019). A confidencialidade foi garantida por meio do anonimato de todas as amostras antes da entrada e análise dos dados (Anexo I).

2- Área de estudo

São José do Rio Preto, localizada no estado de São Paulo, é uma área caracterizada por transmissão hiperendêmica da dengue. (41) Em 2019, durante a recirculação do DENV-2 no país, a cidade registrou números recordes da doença: 33.120 casos confirmados; sendo 528 casos de dengue com sinais de alerta; 29 casos de dengue grave e 19 mortes.

3- Elegibilidade da amostra para inclusão

Este estudo foi realizado com amostras de pacientes confirmados por dengue com idade igual ou superior a 15 anos, classificados de acordo com as diretrizes da OMS 2009 (42) e Ministério da Saúde Brasileiro (22). Amostras de pacientes menores de 15 anos não foram incluídas por não serem atendidas em nossa instituição de saúde. Após o atendimento inicial, os casos suspeitos foram notificados no Sinan (Sistema de Notificação Federal). As amostras de sangue coletadas foram armazenadas a -80oC até serem reaproveitadas para testes relevantes para este estudo. A seleção para testes adicionais também incluiu amostras de casos suspeitos de DENV até 7 dias do início dos sintomas. Essas amostras foram então testadas usando DENV RT-PCR. As amostras positivas permaneceram no grupo elegível, enquanto as amostras negativas foram avaliadas se tivessem sido testadas na admissão ao antígeno DENV-NS1 e quando positivas foram incluídas. Amostras de casos suspeitos de DEN com RT-PCR negativo e dosagem do antígeno NS1 negativo foram excluídas das análises subsequentes. A detecção de anticorpos IgM

antidengue (ELISA ou teste imunocromatográfico) não foi considerada confirmação diagnóstica, dada a possibilidade existente de reação cruzada com outros flavivírus.(19,43). Figura 4.

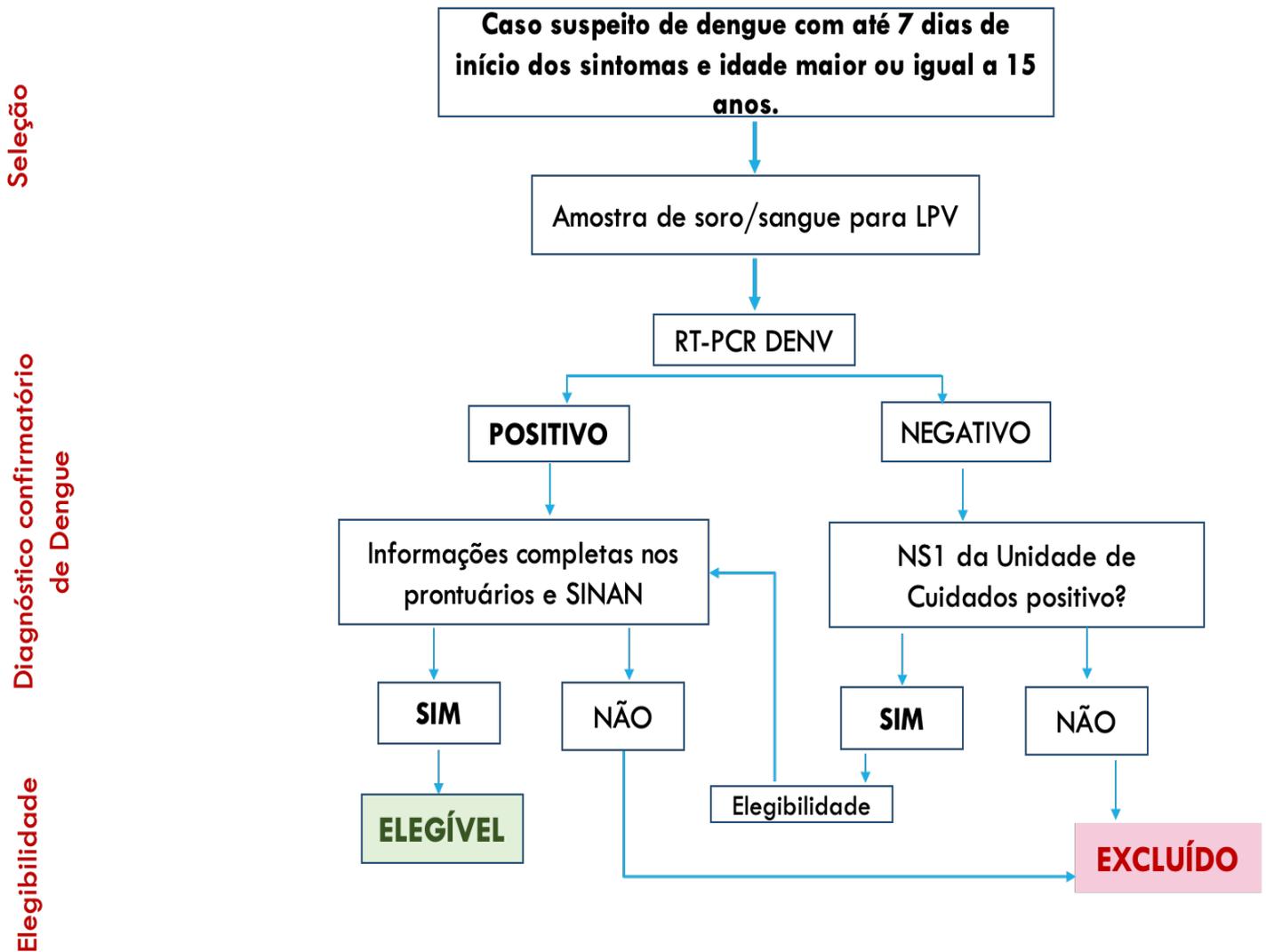


Figura 4 – Fluxograma para inclusão de pacientes no estudo

4- Métodos moleculares para investigação da dengue

Para investigar a infecção aguda por dengue, o RNA viral foi extraído de cada amostra clínica usando o kit QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. O RNA viral foi analisado quanto à presença do material genômico do DENV, de acordo com o protocolo descrito por Johnson et al (2005). (44) A reação multiplex DENV one-step foi realizada com 10 µl de vRNA, 0,12 µl de cada primer (DENV-1 e 3 a 50 µM e DENV-2 e 4 a 25 µM), 0,2 µl de cada sonda a 9 µM, 0,3 µL de mistura enzimática Superscript III RT/Platinum Taq (SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System) e 6,25 de 2X PCR Master Mix aplicados em uma placa de 96 poços utilizando o QuantStudio Dx nas seguintes condições: 45°C por 15 segundos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. A concentração de RNA viral foi estimada em amostras duplicadas pela quantificação de DNA complementar usando o ensaio de qRT-PCR de etapa única. (19) As amostras controle de DENV utilizadas para a construção da curva padrão foram previamente cultivadas em células Vero e tituladas por ensaio de placa, e quatro pontos foram estabelecidos na curva padrão a partir da concentração inicial de 10³ a 10⁰. Os resultados foram interpretados como positivos quando os valores de Ct foram menores ou iguais a 37.

5- Investigação de infecção prévia por dengue ou Zika

Amostras de pacientes com infecção confirmada por dengue foram avaliadas quanto à história pregressa de infecção por dengue e Zika usando

um ensaio imunoenzimático (ELISA). Eles foram triados usando o kit anti-Dengue IgG-ABCAM (Abcam plc, Cambridge, Reino Unido, ab108728), EUROIMMUN human anti-ZIKV IgG ELISA kit (EUROIMMUN, EURO-AG, Luebeck, Alemanha, EI 2668-9601 G). Todos os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando-se os controles positivo e negativo correspondentes. As placas de ELISA foram lidas utilizando-se um leitor de ELISA Spectramax Plus a 450 nm (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, EUA). Os resultados foram expressos em Unidades Padrão (UP) e interpretados como <0,8 negativos, >0,8 e <1,1 equívocos e >1,1 positivos. Para as análises estatísticas foram definidos quatro grupos de amostras: I) DV (dengue)-/ZV(Zika)- (grupo controle); II) DV-/ZV+; III) DV+/ZV-; IV) DV+/ZV+. Este último grupo foi excluído das análises posteriores por representar um viés de interpretação quanto ao agente que poderia estar representando o fator de risco (dengue ou Zika).

6- Características demográficas e clínicas

Dados demográficos e clínicos, como sexo, idade, comorbidades e achados clínicos para classificar a gravidade da dengue, foram obtidos do prontuário eletrônico ou da ficha de notificação do Sinan dos participantes. Com base neles, a dengue foi classificada em: (I) dengue sem sinais de alerta (DsSA), (II) dengue com sinais de alerta (DSA), ou (III) doença grave da dengue (DG), de acordo com as diretrizes da OMS de 2009 (42) e Ministério da Saúde. (22)

7- Análise estatística

Primeiramente, os dados foram analisados de forma descritiva, envolvendo as 769 amostras elegíveis. Análises secundárias foram realizadas no grupo naive para evitar o viés relacionado a infecções prévias por dengue ou Zika. Estatisticamente, a diferença entre as frequências entre os grupos foi testada pelo teste do qui-quadrado de aderência. Os dados foram analisados quanto à distribuição de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. ANOVA com o teste post-hoc de Bonferroni foi utilizada para avaliar a significância das diferenças entre cada grupo nos dados com distribuição normal. Quando a normalidade não foi atingida; o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar se havia diferença entre as médias dos grupos. O teste do qui-quadrado de Pearson foi utilizado para determinar se a frequência esperada nos grupos foi atingida. Por fim, foi realizada regressão logística binária para verificar os preditores das formas graves (dengue com sinal de alerta ou dengue grave) após o preenchimento do pré-requisito de não apresentar multicolinearidade, com valor de tolerância $> 0,1$ e fator de inflação da variância (VIF) < 10 . Para a seleção das variáveis que comporiam o modelo final, foi realizada uma análise discriminante com $p < 0,1$, estimado pelo teste de escore de Rao. As variáveis que obedeceram aos critérios pré-definidos foram submetidas à análise multivariada, com significância definida em $p < 0,05$. O nível de significância de 0,05 (5%) foi adotado para todos os testes, e todos os dados foram tabulados e analisados com o software SPSS para IOS (versão 28, SPSS, Inc; Chicago, IL, EUA).

4- RESULTADOS

1- Características gerais da população de estudo

Entre dezembro de 2018 e novembro de 2019, foram obtidas 2.990 amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue, das quais 1.490 foram confirmadas laboratorialmente por RT-PCR específico para DENV ou testes de antígeno NS1 para dengue. Destes, 769 foram elegíveis com base na disponibilidade de prontuários médicos para classificar a gravidade do quadro clínico. Entre as 769 amostras incluídas, a maioria era do sexo feminino (54,09%; 416/769; $p < 0,23$), adulta (82,96%; 633/763; $p < 0,001$) e classificada como dengue sem sinais de alerta (86,21%; 663/769; $p < 0,001$). De acordo com o status sorológico prévio baseado na presença de anti-dengue ou Zika IgG, as amostras foram classificadas em quatro grupos: (1) virgens de DENV e ZIKV (DV-/ZV-; controle), $n=96$ (14,65%); (2) DV-/ZV+, $n=17$ (2,59%); (3)

DV+/ZV-, n=433 (66,10%); e (4) DV+/ZV+, n=109 (16,64%) ($p < 0,001$) (figura).

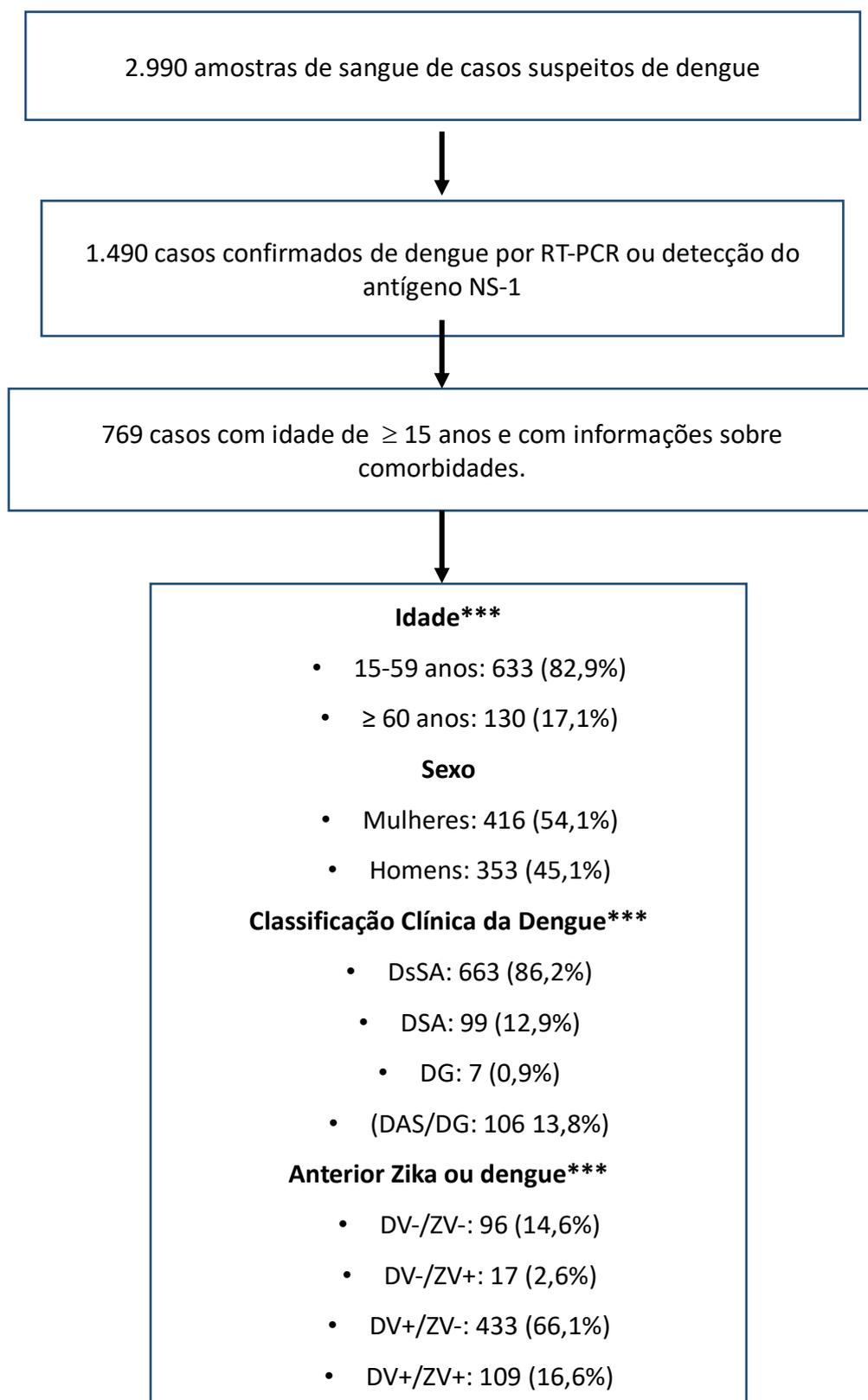


Figura 5. Fluxograma dos critérios de elegibilidade e características gerais das amostras de pacientes inscritos. DsSA: dengue sem sinais de alerta; DSA: dengue com sinais de alerta; DG: dengue grave; DV: vírus dengue; ZV: vírus Zika. $p < 0,001$ no teste qui-quadrado de aderência.

2- Associação de características demográficas, comorbidades e gravidade da dengue

Para avaliar a relação entre fatores demográficos, sorológicos e de comorbidade com a gravidade da evolução da dengue, associaram-se os casos de dengue com sinais de alerta e dengue grave, dado o baixo número destes últimos, constituindo, assim, dois grupos: DsSA e DG. Quando comparados estes grupos, observou-se maior prevalência de idosos com formas graves da doença ($p < 0,001$), sem correlação com sexo ($p = 0,069$). Observou-se também maior frequência de casos graves em relação ao esperado entre os indivíduos DV-/ZV- ($p < 0,001$; análises post-hoc do teste do qui-quadrado). Dentre as comorbidades analisadas, observou-se maior frequência de indivíduos com SPD/SD com diabetes ($p < 0,003$), hipertensão arterial ($p < 0,017$) e doença péptica ($p < 0,009$) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Características demográficas, sorológicas e comorbidades de acordo com a gravidade da dengue

	DsSA			DSA/DG		Valor p ¹	
	N resposta	N positivo	% resposta	N positivo	%		
Faixa etária							
Adulto (até 60 anos)	657	557	84,78%	106	76	71,70%	0.001
Idosos (≥ 60 anos de idade)	657	100	15,22%	106	30	28,30%	
Sexo							
Feminino	663	350	52,79%	106	66	62,26%	0.069
Masculino	663	313	47,21%	106	40	37,74%	
Comorbidades							
Diabetes	663	53	7,99%	106	18	16,98%	0.003
Doença hematológica	387	2	0,52%	97	3	3,09%	0.057
Doença hepática	663	5	0,75%	106	0	0,00%	1
Hipertensão arterial sistêmica	663	101	15,23%	106	26	24,53%	0.017
Doença péptica	655	3	0,46%	106	4	3,77%	0.009
Doença autoimune	663	5	0,75%	106	1	0,94%	0.591
Doença renal	663	1	0,15%	106	3	2,83%	0.051

Infecção prévia#						
DV-/ZV-	625	83	13,28%	30	13	43,33% <0,001
DV-/ZV+	625	13	2,08%	30	4	13,33%
DV+/ZV-	625	421	67,36%	30	12	40,00%
DV+/ZV+	625	108	17,28%	30	1	3,33%

Teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher, valor significativo: < 0,05, intervalo de confiança de 95%. # Valor alfa corrigido para residual ajustado = 0,00625; Z crítico bicaudal = -2,73

DsSA: dengue sem sinais de alerta; DSA: dengue com sinais de alerta; DG: dengue grave; VD: vírus dengue; ZV: vírus Zika.

A análise univariada mostrou que indivíduos com mais de 59 anos apresentaram risco de 2,199 para evoluir para formas graves quando comparados a indivíduos com 59 anos ou menos (OR 2,199; 95% IC 1,370-3,529; $p = 0,001$). Em relação às comorbidades e sua associação com a gravidade da dengue a presença de diabetes associou-se a um risco de 2,354 (IC 95% 1,319-4,209; $p = 0,004$); pressão arterial elevada de 1,808 (IC 95% 1,107-2,954; $p = 0,018$); doença péptica de 8,523 (IC 95% 1,880-38,636; $p = 0,005$); e doença renal de 12,731 (IC 95% 1,144-141,651; $p = 0,038$). A presença de anticorpos antidengue IgG não se relacionou com as formas graves. De fato, observou-se efeito protetor (DV+/ZV-: OR 0,182; 95% IC 0,080-0,413; $p < 0,001$; DV+/ZV+: OR 0,059; IC 95% 0,008-0,461; $p = 0,007$)

(Tabela 2).

Tabela 2. Risco de formas graves de dengue, segundo características dos indivíduos incluídos

	Análise univariada ¹			
	Valor de p	OR	LI	LS
Faixa etária				
Adulto (até 60 anos)	-	1	-	-
Idosos (≥ 60 anos de idade)	0.001	2.199	1.370	3.529
Gênero				
Feminino	-	1	-	-
Masculino	0.070	0.678	0.445	1.033
Comorbidades				
Diabetes	0.004	2.354	1.319	4.203
Doença hematológica	0.048	6.144	1.012	37.291
Doença hepática	0.999	NA	NA	NA
Hipertensão arterial sistêmica	0.018	1.808	1.107	2.954
Doença péptica	0.005	8.523	1.880	38.636
Doença autoimune	0.837	1.253	0.145	10.834
Doença renal	0.038	12.731	1.144	141.651
Infecção prévia				
DV-/ZV-	-	1	-	-
DV-/ZV+	0.295	1.964	0.555	6.953
DV+/ZV-	< 0,001	0.182	0.080	0.413
DV+/ZV+	0.007	0.059	0.008	0.461

1. Regressão logística binária

anos: anos; DsSA: dengue sem sinais de alerta; DSA: dengue com sinais de alerta; DG: dengue grave; DV: vírus dengue; ZV: vírus Zika; OR: odds ratio; LI: limite inferior; LS: limite superior.

Para mitigar possíveis vieses que poderiam surgir da presença de anticorpos anti-dengue ou anti-zika, uma análise adicional foi conduzida apenas em amostras de indivíduos DV-/ZV-. A análise univariada revelou risco de 6,844 (IC 95% 1,550-30,220; p = 0,011) para as formas graves de dengue

em indivíduos acima de 59 anos e risco de 24,6 (IC 95% 2,331-259,61; p = 0,008) nos diabéticos. O sexo masculino apresentou efeito protetor (OR 0,252; 95% IC 0,071-0,887; p = 0,032). Quando todas as variáveis foram analisadas concomitantemente por meio de análise multivariada, apenas o diabetes mostrou-se fator de risco, com OR de 24,3 (IC 95% 2,302-256,48; p = 0,008) (Tabela 3).

Tabela 3. Análise uni e multivariada avaliando o risco de formas graves de dengue segundo características dos indivíduos.

Análise univariada em grupo naive (DV-/ZV-)¹				
	Valor de p	OR	LI	LS
Faixa etária				
Adulto (até 60 anos)	-	1	-	-
Idosos (≥ 60 anos de idade)	0.011	6.844	1.550	30.220
Gênero				
Feminino	-	1	-	-
Masculino	0.032	0.252	0.071	0.887
Comorbidades				
Diabetes	0.008	24.600	2.331	259.619
Doença hematológica	NA	NA	NA	NA
Doença hepática	NA	NA	NA	NA
Hipertensão arterial sistêmica	0.124	3.257	0.723	14.665
Doença péptica	NA	NA	NA	NA
Doença autoimune	NA	NA	NA	NA
Doença renal	1	NA	NA	NA
Análise multivariada em grupos naive (DV-/ZV-)¹				
Diabetes	0.008	24.300	2.302	256.48

1. Regressão logística binária

anos: anos; DsSA: dengue sem sinais de alerta; DSA: dengue com sinais de alerta; DG: dengue grave; DV: vírus dengue; ZV: vírus Zika; OR: odds ratio; LI: limite inferior; LS: limite superior.

5- DISCUSSÃO

Os dados analisados permitiram observar a influência do diabetes como fator de risco independente para formas graves e potencialmente graves de dengue em indivíduos naive de infecções por dengue ou Zika durante um surto de DENV-2 em 2019. Esse achado tornou-se preocupante, visto a alta prevalência de diabetes na população mundial e o conceito histórico da ocorrência de formas graves em indivíduos com dengue prévia devido aos mecanismos de ADE (*antibody enhancement activity*).

A OMS, em seu relatório anual de 2023 da World Health Statistic, destacou o impacto alarmante na epidemia de doenças não transmissíveis (DNTs), que causou 74% das mortes globais e 63% dos anos de vida ajustados por incapacidade (DALY) globais em 2019. Entre as principais causas de morte, quatro se destacam: doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias crônicas e diabetes, que mataram cerca de 33,3 milhões de pessoas em 2019.(45) O diabetes, que causou dois milhões [1,4-2,7 milhões] destas mortes, merece destaque, pois tem elevada associação com distúrbios cardiovasculares (46), englobando coração (doença arterial coronariana, angina pectoris, insuficiência cardíaca), cérebro (acidente vascular cerebral, encefalopatia), rim (doença renal diabética) e olhos (retinopatia). (35)

Os últimos dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF) também ressaltam o impacto impressionante do diabetes, revelando que 537 milhões de pessoas foram afetadas em 2021. As projeções preveem um aumento de 12,2%, com a população diabética global aumentando para 783 milhões até 2045. Esse ônus é desproporcionalmente suportado por países de renda média e baixa, predominantemente entre aqueles com idade entre 40 e 69 anos e residentes em área urbana. (34) Entre as amostras coletadas, diabetes foi a comorbidade predominante documentada, seguida de perto pela hipertensão. Estas duas condições são componentes de uma síndrome significativa conhecida como síndrome metabólica, cujas consequências finais podem abranger doenças cardiovasculares e potencial fatalidade se não forem gerenciadas de forma eficaz. O Brasil é o primeiro país da América do Sul em número de pessoas com diabetes em indivíduos entre 20 e 79 anos, contabilizando 15,7 milhões de casos, em 2021. (34)

As formas graves e potencialmente graves da dengue, do ponto de vista fisiopatológico, podem ser vistas como uma resposta imune exuberante que afeta a estabilidade hemodinâmica do organismo, resultando em extravasamento de fluidos intravasculares, hemoconcentração, acúmulo de fluidos no espaço extravascular, além de potencial sangramento e envolvimento de órgãos vitais, incluindo fígado, sistema respiratório, e sistema nervoso central. Assim, o alvo primário envolvido é o sistema vascular. No contexto da dengue, a presença de comorbidades é suficiente para que as autoridades de saúde recomendem maior atenção ao paciente, incluindo a

realização de hemograma completo, mesmo sem sinais de alarme, e um monitoramento mais rigoroso de seu aparecimento. (22)(42)

Ter mais de 60 anos já é considerado um fator de risco para formas graves de dengue. Além disso, essa faixa etária está associada a uma maior frequência de comorbidades, incluindo condições de sobreposição. Em uma revisão sistemática abrangente e meta-análise realizada entre 2008 e 2020, que incluiu mais de 80% dos estudos da Ásia e América Latina; Sangkaew et al., destacaram diabetes [OR 4,38 (2,58-7,43)], hipertensão [OR 2,19 (1,36-3,53)], doença renal [OR 4,67 (2,21-9,88)] e doença cardiovascular [OR 2,79 (1,04-7,50)] como condições preexistentes associadas à dengue grave. Em um estudo caso-controle retrospectivo realizado entre 2005 e 2008 em Cingapura, a presença de duas ou mais comorbidades foi associada a um maior risco de dengue grave em pacientes com mais de 60 anos. Quando o diabetes coexistia com um distúrbio cardíaco, o risco era quatro vezes maior [8,02; 1,40-45,92] em comparação ao diabetes isolado [2,21; 1,10-5,52]. O risco também foi aumentado quando diabetes coexistia com hipertensão [2,68; 1,07-6,68], hiperlipidemia [4,25; 1,34-13,52] ou distúrbios cardíacos com hiperlipidemia [5,79; 1,03-32,64]. Assim, além de servir como um fator de risco significativo para o desenvolvimento de formas graves de dengue por si só, o diabetes também pode estar associado a outros fatores de risco, particularmente devido à co-ocorrência de morbidades. (36) (26) (21)

O diabetes é classificado pela OMS como um distúrbio metabólico persistente marcado pelo aumento dos níveis de glicose na corrente sanguínea. O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) constitui aproximadamente 95%

dos casos globais de diabetes. Como outras formas da doença, está ligada a um espectro de complicações, como episódios de hiperglicemia, coma diabético e doença cardiovascular. (42,47) A ocorrência de hiperglicemia decorre de tecidos com sensibilidade reduzida à insulina, o que desencadeia uma liberação aumentada das células beta pancreáticas. Esta secreção contínua acaba culminando em fadiga pancreática e comprometimento irreversível. (48) A ação e a secreção interrompidas da insulina, que dão origem ao aumento dos níveis de glicose no sangue, podem perturbar o equilíbrio entre o óxido nítrico e as espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais. O papel crucial do óxido nítrico na manutenção do equilíbrio vascular e na promoção da dilatação é significativo. (39)

O estresse oxidativo e as espécies reativas de oxigênio têm o potencial de tornar o óxido nítrico inativo devido à produção de endotelina-1, culminando em vasoconstrição e agregação plaquetária. (49) Além disso, esses elementos podem desencadear vias associadas à inflamação, marcadas pelo aumento da expressão de proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), selectinas, molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e molécula de adesão celular intracelular-1 (ICAM-1). Esta sequência envolve adesão de monócitos ao endotélio, ativação de macrófagos e secreção aumentada de interleucina-1 (IL-1) e TNF-alfa, amplificando a resposta inflamatória. (50) Os agentes vasoconstritores são adicionalmente produzidos através da via da ciclooxigenase-2 (COX-2), caracterizada por níveis elevados de tromboxano A2 e redução da produção de prostaciclina. Isso aumenta ainda mais a ruptura do controle vascular e o comprometimento da função endotelial. (50) Esta

intrincada cascata forma a base para os eventos vasculares prevalentes observados em pacientes diabéticos. Como a disfunção endotelial é induzida por fatores pró-inflamatórios que promovem vasoconstrição e um estado pró-trombótico, torna-se plausível predizer o aparecimento de eventos vasculares. Assim, o DM2 pode ser conceituado como um distúrbio endotelial, dando origem a uma condição vascular abrangente que, em última análise, leva a um amplo espectro de complicações micro e macrovasculares que afetam órgãos vitais como coração, cérebro, rins e olhos. (35) O mecanismo pelo qual a doença cardíaca leva à disfunção de órgãos e formas mais graves de dengue não é bem compreendido. A hipótese é que a doença cardíaca que resulta em débito cardíaco reduzido, diante da demanda causada pela infecção viral, pode levar a fluxo sanguíneo renal insuficiente, que é altamente regulado pelos níveis de oxigênio. O resultado seria isquemia, lesão tóxica dos rins e efeitos sistêmicos subsequentes. (51) Ademais, a redução da depuração de citocinas inflamatórias devido à lesão renal crônica ou aguda seria um mecanismo potencial que contribuiria para a gravidade da dengue.

Embora, a presença do diabetes tenha sido reconhecida como potencializadora das formas graves da dengue, uma tendência emergente na literatura destaca uma ocorrência cada vez mais relatada: os casos de descompensação do diabetes, particularmente na forma de cetoacidose diabética, quando coexistem com a dengue. Embora esses relatos sejam predominantemente restritos a estudos de caso, eles ressaltam preocupações substanciais relativas ao manejo do diabetes no contexto da infecção, que é o principal fator precipitante de complicações como a cetoacidose. (52,53)

Quanto à associação observada inicialmente entre os sorogrupos e evolução para formas mais graves da doença; o papel dos anticorpos do Zika e da evolução da dengue permanece não esclarecida. Notavelmente, a investigação recente envolvendo uma coorte pediátrica na Nicarágua revelou que o risco de apresentar a forma sintomática ou grave de dengue foi elevado em crianças que já haviam sido infectadas com Zika ou dengue uma vez, mas curiosamente, esse risco aumentado não foi observado em crianças que haviam sido expostas à infecções múltiplas por dengue. (27) Isso sugere que a infecção prévia por Zika pode influenciar os desfechos clínicos da dengue sintomática e grave. É importante enfatizar que, geralmente, o grupo DV+/ZV- foi presumido como um modelo para o Antibody-Dependent Enhancement (ADE) em relação à expressão de citocinas. No entanto, em nosso estudo, o grupo DV+/ZV- não foi composto exclusivamente por casos secundários de dengue, mas sim por relatos de infecções prévias por dengue. Esta observação sugere que o grupo DV+/ZV- compreende indivíduos com múltiplas infecções por DENV e não as infecções secundárias comumente associadas à ADE. Isso está de acordo com a natureza hiperendêmica da circulação da dengue em São José do Rio Preto, onde mais de 70% da população da cidade já foi infectada pela dengue (41), confirmando o risco reduzido de doença observado em infecções múltiplas por DENV observadas em outras localizações. (54,55)

6- CONCLUSÃO

O desenvolvimento da doença grave da dengue (DDS) é um processo complexo e multifacetado, observado principalmente em casos de infecções

secundárias heterólogas pelo vírus da dengue (DENV). Tais infecções podem levar a vários desfechos, incluindo uma resposta inflamatória aumentada que resulta em níveis virais elevados e ativação imunológica intensificada. (4) No entanto, observações de formas graves ocorrendo em indivíduos sem infecções prévias por dengue destacam uma complexidade ainda maior no entendimento da patogênese dessas formas de doença. O diabetes, uma doença pan-endotelial, pró-inflamatória e com alta prevalência na população, representa um desafio no enfrentamento da dengue, especialmente, devido à sobreposição espacial das duas condições. O reconhecimento de potenciais fatores de risco, como demonstrado neste estudo, é o primeiro passo na conformação de estratégias terapêuticas para reduzir a potencial morbidade e mortalidade associadas à coexistência destas doenças.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Nanaware N, Banerjee A, Mullick Bagchi S, Bagchi P, Mukherjee A. Dengue Virus Infection: A Tale of Viral Exploitations and Host Responses. *Viruses*. 30 de setembro de 2021;13(10):1967.
2. Soo KM, Khalid B, Ching SM, Chee HY. Meta-Analysis of Dengue Severity during Infection by Different Dengue Virus Serotypes in Primary and Secondary Infections. Huy NT, organizador. *PLOS ONE*. 23 de maio de 2016;11(5):e0154760.
3. Weltgesundheitsorganisation, organizador. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2. ed. Geneva: World Health

Organization; 1997. 84 p.

4. Halstead SB, Shotwell H, Casals J. Studies on the Pathogenesis of Dengue Infection in Monkeys. II. Clinical Laboratory Responses to Heterologous Infection. *J Infect Dis.* 1º de julho de 1973;128(1):15–22.
5. Horstick O, Jaenisch T, Martinez E, Kroeger A, See LLC, Farrar J, et al. Comparing the Usefulness of the 1997 and 2009 WHO Dengue Case Classification: A Systematic Literature Review. *Am J Trop Med Hyg.* 3 de setembro de 2014;91(3):621–34.
6. Alexander N, Balmaseda A, Coelho ICB, Dimaano E, Hien TT, Hung NT, et al. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries: Multicentre prospective study on dengue classification. *Trop Med Int Health.* agosto de 2011;16(8):936–48.
7. Whitehorn J, Simmons CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine.* setembro de 2011;29(42):7221–8.
8. Khanam A, Gutiérrez-Barbosa H, Lyke KE, Chua JV. Immune-Mediated Pathogenesis in Dengue Virus Infection. *Viruses.* 21 de novembro de 2022;14(11):2575.
9. Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. *Clin Microbiol Rev.* outubro de 2009;22(4):564–81.
10. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol.* julho de 2013;158(7):1445–59.
11. Abd-Jamil J, Azizan N, Che-Mat-Seri N, Yaacob C, Samsudin N,

Mahfodz N, et al. Detection and confirmation of dengue pre- and postintroduction of dengue NS1-antigen test at the University Malaya Medical Centre: An observational study. *J Med Virol.* agosto de 2021;93(8):4714–9.

12. Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* agosto de 2012;10(8):895–907.

13. Salles TS, Da Encarnação Sá-Guimarães T, De Alvarenga ESL, Guimarães-Ribeiro V, De Meneses MDF, De Castro-Salles PF, et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. *Parasit Vectors.* dezembro de 2018;11(1):264.

14. Yang X, Quam MBM, Zhang T, Sang S. Global burden for dengue and the evolving pattern in the past 30 years. *J Travel Med.* 29 de dezembro de 2021;28(8):taab146.

15. Barreto ML, Teixeira MG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estud Av.* dezembro de 2008;22(64):53–72.

16. Mata VE, Passos SRL, Hökerberg YHM, Berardinelli GM, Dos Santos MAB, Fukuoka LVB, et al. Accuracy and reliability of an NS1 rapid immunochromatographic test for DENV-1 diagnosis at point of care and in the laboratory. *BMC Infect Dis.* dezembro de 2017;17(1):594.

17. Muller DA, Depelsenair ACI, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis.* 1º de março de 2017;215(suppl_2):S89–95.

18. Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, et al. Evaluation of Commercially Available Anti–Dengue Virus Immunoglobulin

M Tests. *Emerg Infect Dis.* março de 2009;15(3):436–40.

19. Dutra N, De Paula M, De Oliveira M, De Oliveira L, De Paula S. The laboratorial diagnosis of dengue: Applications and implications. *J Glob Infect Dis.* 2009;1(1):38.

20. Huber RG, Lim XN, Ng WC, Sim AYL, Poh HX, Shen Y, et al. Structure mapping of dengue and Zika viruses reveals functional long-range interactions. *Nat Commun.* 29 de março de 2019;10(1):1408.

21. Tsheten T, Clements ACA, Gray DJ, Adhikary RK, Furuya-Kanamori L, Wangdi K. Clinical predictors of severe dengue: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty.* dezembro de 2021;10(1):123.

22. Dengue : diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança.

23. Morra ME, Altibi AMA, Iqtadar S, Minh LHN, Elawady SS, Hallab A, et al. Definitions for warning signs and signs of severe dengue according to the WHO 2009 classification: Systematic review of literature. *Rev Med Virol.* julho de 2018;28(4):e1979.

24. Michels M, Alisjahbana B, De Groot PG, Indrati AR, Fijnheer R, Puspita M, et al. Platelet function alterations in dengue are associated with plasma leakage. *Thromb Haemost.* 2014;112(08):352–62.

25. Htun NSN, Odermatt P, Eze IC, Boillat-Blanco N, D’Acremont V, Probst-Hensch N. Is Diabetes a Risk Factor for a Severe Clinical Presentation of Dengue? - Review and Meta-analysis. Halstead SB, organizador. *PLoS Negl Trop Dis.* 24 de abril de 2015;9(4):e0003741.

26. Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Curr Microbiol.* janeiro de

2021;78(1):17–32.

27. Katzelnick LC, Narvaez C, Arguello S, Lopez Mercado B, Collado D, Ampie O, et al. Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science*. 28 de agosto de 2020;369(6507):1123–8.

28. George J, Valiant WG, Mattapallil MJ, Walker M, Huang YJS, Vanlandingham DL, et al. Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. *Sci Rep*. 5 de setembro de 2017;7(1):10498.

29. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 19 de agosto de 2016;353(6301):823–6.

30. Pérez-Guzmán EX, Pantoja P, Serrano-Collazo C, Hassert MA, Ortiz-Rosa A, Rodríguez IV, et al. Time elapsed between Zika and dengue virus infections affects antibody and T cell responses. *Nat Commun*. 20 de setembro de 2019;10(1):4316.

31. Castanha PMS, Erdos G, Watkins SC, Falo LD, Marques ETA, Barratt-Boyes SM. Reciprocal immune enhancement of dengue and Zika virus infection in human skin. *JCI Insight*. 13 de fevereiro de 2020;5(3):e133653.

32. Watanabe S, Tan NWW, Chan KWK, Vasudevan SG. Dengue Virus and Zika Virus Serological Cross-reactivity and Their Impact on Pathogenesis in Mice. *J Infect Dis*. 7 de janeiro de 2019;219(2):223–33.

33. Fowler AM, Tang WW, Young MP, Mamidi A, Viramontes KM, McCauley MD, et al. Maternally Acquired Zika Antibodies Enhance Dengue Disease Severity in Mice. *Cell Host Microbe*. novembro de 2018;24(5):743-750.e5.

34. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* janeiro de 2022;183:109119.
35. Li Y, Liu Y, Liu S, Gao M, Wang W, Chen K, et al. Diabetic vascular diseases: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Signal Transduct Target Ther.* 10 de abril de 2023;8(1):152.
36. Sekaran SD, Liew ZM, Yam HC, Raju CS. The association between diabetes and obesity with Dengue infections. *Diabetol Metab Syndr.* dezembro de 2022;14(1):101.
37. Higgins MW. The Framingham Heart Study: review of epidemiological design and data, limitations and prospects. *Prog Clin Biol Res.* 1984;147:51–64.
38. Haas AV, McDonnell ME. Pathogenesis of Cardiovascular Disease in Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* março de 2018;47(1):51–63.
39. Meza CA, La Favor JD, Kim DH, Hickner RC. Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS? *Int J Mol Sci.* 2 de agosto de 2019;20(15):3775.
40. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia.* novembro de 1997;40(11):1286–92.
41. Chiaravalloti-Neto F, Da Silva RA, Zini N, Da Silva GCD, Da Silva NS, Parra MCP, et al. Seroprevalence for dengue virus in a hyperendemic area and associated socioeconomic and demographic factors using a cross-sectional

design and a geostatistical approach, state of São Paulo, Brazil. BMC Infect Dis. dezembro de 2019;19(1):441.

42. World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. 2009 [citado 26 de setembro de 2023];(WHO/HTM/NTD/DEN/2009.1). Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/44188>

43. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. J Gen Virol. 1º de janeiro de 1989;70(1):37–43.

44. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. J Clin Microbiol. outubro de 2005;43(10):4977–83.

45. World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals.

46. The Emerging Risk Factors Collaboration. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. The Lancet. junho de 2010;375(9733):2215–22.

47. Farmaki P, Damaskos C, Garmpis N, Garmpi A, Savvanis S, Diamantis E. Complications of the Type 2 Diabetes Mellitus. Curr Cardiol Rev. julho de 2021;16(4):249–51.

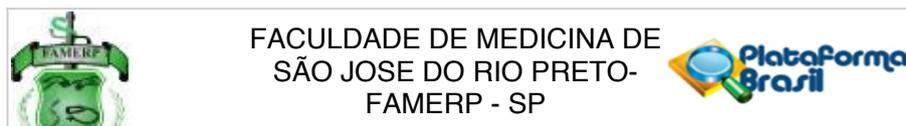
48. Solis-Herrera C, Triplitt C, Cersosimo E, DeFronzo RA. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. Em: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce

- A, Chrousos G, Corpas E, et al., organizadores. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [citado 2 de outubro de 2023]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279115/>
49. Gerald P, King GL. Activation of Protein Kinase C Isoforms and Its Impact on Diabetic Complications. *Circ Res.* 30 de abril de 2010;106(8):1319–31.
50. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J.* 14 de agosto de 2013;34(31):2436–43.
51. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol.* agosto de 2011;11(8):532–43.
52. Lertdetkajorn K, Sriphrapadang C. Management of Diabetic Ketoacidosis with Dengue Hemorrhagic Fever. *Cureus* [Internet]. 19 de setembro de 2018 [citado 2 de outubro de 2023]; Disponível em: <https://www.cureus.com/articles/13041-management-of-diabetic-ketoacidosis-with-dengue-hemorrhagic-fever>
53. Umpierrez GE, Kitabchi AE. Diabetic Ketoacidosis: Risk Factors and Management Strategies. *Treat Endocrinol.* 2003;2(2):95–108.
54. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 1º de abril de 2004;113(7):946–51.
55. McCracken MK, Gromowski GD, Friberg HL, Lin X, Abbink P, De La Barrera R, et al. Impact of prior flavivirus immunity on Zika virus infection in rhesus macaques. Heise MT, organizador. *PLOS Pathog.* 3 de agosto de 2017;13(8):e1006487.

ANEXOS

Anexo I

Parecer do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto da Exposição prévia ao vírus Zika na infecção aguda por dengue: Aspectos epidemiológicos, clínicos, imunológicos e virológicos

Pesquisador: CASSIA FERNANDA ESTOFOLETE

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 14262619.0.0000.5415

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto- FAMERP - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.503.656

Apresentação do Projeto:

ESTUDO RETROSPECTIVO BASEADO EM DADOS DE PRONTUÁRIO E ESPÉCIMES CLÍNICOS OBTIDOS APÓS SURTO DE DENGUE OCORRIDO EM SAO JOSE DO RIO PRETO ENTRE 2018 ATÉ MAIO/2019, ATRAVÉS DA INVESTIGAÇÃO DE INFECÇÃO POR ARBOVIRUS(DENGUE), COM REALIZAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS ESPECÍFICOS, MARCADORES INFLAMATÓRIOS E CORRELAÇÃO COM DADOS DEMOGRÁFICOS E ACHADOS CLÍNICOS, A FIM DE AVALIAR SE EXPOSIÇÃO PREVIA AO ZIKA VÍRUS, OCORRIDA DURANTE EMERGÊNCIA DO VIRUS EM SAO JOSE DO RIO PRETO EM 2016, PODERIA TER INFLUENCIADO NA EVOLUÇÃO DE EPISÓDIOS SUBSEQUENTES DE DENGUE (ANTIBODY-DEPENDENT ENHANCEMENT) OCORRIDOS.

Objetivo da Pesquisa:

Este estudo tem como objetivo abordar a influência de exposição prévia a ZIKV no perfil clínico e inflamatório de infecção subsequente por DENV, bem como estabelecer uma correlação entre perfil clínico e expressão imune dentre os casos de dengue com sinais de alarme e dengue grave, a fim de fornecer uma visão multifatorial de possíveis fatores de riscos e predisponentes para evolução desfavorável em pacientes atendidos no Hospital de Base de São José do Rio Preto- SP durante epidemia de dengue em 2019

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos aos pacientes, pois os testes deste estudo serão realizados em espécimes clínicos já

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 3.503.656

descartados pelo laboratório de análise clínicas, em caráter retrospectivo após inclusive conclusão do atendimento do paciente. Não haverá coletas adicionais para este estudo.

Benefícios:

Estudos que analisam o efeito de infecção previa por Zika vírus na evolução de atual episódio de dengue são escassos na literatura. Estudos nesse modelo permitirão desenvolvimento de conhecimento científico, compreensão de mecanismos relacionados a infecções graves pelo vírus dengue, na tentativa de propor medidas de manejo clínico e redução de morbimortalidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem descrita e delineada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de consentimento não serão obtidos uma vez que as amostras encaminhadas ao LPV não serão coletadas com intuito único de pesquisa, mas sim como investigação epidemiológica, num contexto retrospectivo, de pacientes que já tiveram desfecho clínico, tendo inclusive recebido alta hospitalar. Além disso, por se tratar de uma instituição referencia para uma população de mais de 2.000.000 habitantes, é inviável a tentativa de contato com os potenciais participantes, por irregularidades de cadastros, ausência de informações ou mesmo logística de deslocamento para obtenção de termos de consentimento por residirem em municípios além daquele da instituição hospitalar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1356764.pdf	18/07/2019 21:06:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Impacto_exposicao_previa_virus_zika_na_infeccao_aguda_por_dengue.asp	18/07/2019 21:06:46	CASSIA FERNANDA ESTOFOLETE	Aceito

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416

Bairro: VILA SAO PEDRO

CEP: 15.090-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3201-5813

Fax: (17)3201-5813

E-mail: cepfamerp@famerp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
SÃO JOSE DO RIO PRETO-
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 3.503.656

Investigador	ectos_epidemiologicos_clinicos_imunologicos_virologicos_versao18jul2019.docx	18/07/2019 21:06:46	CASSIA FERNANDA ESTOFOLETE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	18/05/2019 11:28:46	CASSIA FERNANDA ESTOFOLETE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_CEP.jpeg	18/05/2019 11:27:28	CASSIA FERNANDA ESTOFOLETE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO JOSE DO RIO PRETO, 13 de Agosto de 2019

Assinado por:

**Beatriz Barco Tavares Jontaz Irigoyen
(Coordenador(a))**

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br