



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**BÁRBARA RAYSSA CORREIA DOS SANTOS**

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *IL6* T15A (rs13306435) E *iNOS* -1173 C>T  
(rs9282799) COM A SUSCEPTIBILIDADE A INFECÇÃO E PROGRESSÃO DA  
DENGUE**

MACEIÓ  
2021

BÁRBARA RAYSSA CORREIA DOS SANTOS

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *IL6* T15A (rs13306435) E *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) COM A SUSCEPTIBILIDADE A INFECÇÃO E PROGRESSÃO DA DENGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, na linha de pesquisa: Epidemiologia e Etiopatogenia das Doenças Humanas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo

MACEIÓ  
2021

**Catálogo na Fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237a Santos, Bárbara Rayssa Correia dos.  
Associação dos polimorfismos da *IL6* T15A (rs13306435) e *iNOS* -1173 C>T (rs9282799) com a susceptibilidade a infecção e progressão da dengue / Bárbara Rayssa Correia dos Santos. – 2021.  
83 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientadora: Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo.  
Dissertação (Mestrado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 55-79.  
Anexos: f. 80-83.

1. Polimorfismo genético. 2. Infecções por arbovírus. 3. Genética. I. Título.

CDU: 578.833.1/.2



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, S/N  
Cidade Universitária – Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: [ppgsa@gmail.com](mailto:ppgsa@gmail.com)  
Fone: 82 3214 1850

## Folha de Aprovação

BARBARA RAYSSA CORREIA DOS SANTOS

Associação dos polimorfismos IL6 T15A (rs13306435) e INOS -1173C>T (rs9282799) com a susceptibilidade a infecção e progressão da dengue

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 24 de agosto de 2021.

### Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente



Elaine Virginia Martins de Souza Figueiredo  
Data: 09/08/2021 13:31:09 -0300  
Verifique em <https://verificador.br.br>

Prof.ª Dr.ª ELAINE VIRGINIA MARTINS DE SOUZA FIGUEIREDO  
(ORIENTADORA)

*Carolinne de Sales Marques*

Prof.ª Dr.ª CAROLINNE DE SALES MARQUES - (UFAL)

*Aline Cristine Pereira e Silva*

Prof.ª Dr.ª ALINE CRISTINE PEREIRA E SILVA

Dedico este trabalho a minha família e a todos que acreditaram em mim.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, porque tudo que eu consegui não foi por meu mérito, mas sim por sua infinita bondade que permitiu que tudo se realizasse;

À minha família que permanece ao meu lado em todos os momentos da minha vida;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo que me orienta desde a graduação. Obrigada por seus conselhos, por sua paciência e ensinamentos;

À Prof<sup>a</sup> Msc<sup>a</sup> Ana Caroline Melo dos Santos, por sua amizade e por me ensinar um monte de coisas e aguentar meus dramas;

A todos os membros do LABMEG, que me ajudaram desde a graduação até o mestrado. Um agradecimento especial a Ithallo Sathio por me ajudar nos experimentos;

Aos professores da Universidade Federal de Alagoas, pelo conhecimento transmitido e por contribuírem na minha formação acadêmica.

Aos meus amigos, Alexandre Wendell, Bruna Brandão, Dhayane Magalhães, Francyanne Adielle e Leandro Douglas pelos incontáveis dias no laboratório, as risadas e o aprendizado compartilhado ao longo do caminho;

Aos meus amigos [insira seu nome aqui] que me acompanham nessa jornada, obrigada pelo apoio! E um agradecimento especial a Elys Rayanne e Gleycy Angelo;

À Ellyda Fernanda e Lucia Vanessa por disponibilizaram sua casa para que eu pudesse dormir quando necessário. Abel Neto, Edilson Leite, Eloiza Lira, Ithallo Sathio e Renise Farias pelas caronas para Maceió, a viagem se tornava menos cansativa com a companhia de vocês!

Aos seguranças da Universidade Federal de Alagoas, Sr. Aladson e Sr. Eduardo, por salvarem minha pele nos dias que precisei das chaves dos laboratórios (MELHORES SEGURANÇAS DA UFAL!);

Aos pacientes, por terem concordado em participar da pesquisa;

Ao antigo Laboratório Municipal de Arapiraca e Hospital Regional, por disponibilizarem amostras que foram fundamentais para a pesquisa;

Agradeço a CAPES, pela concessão da bolsa que foi de fundamental importância para o desenvolvimento desta dissertação.

“nosso trabalho deve preparar  
a próxima geração de mulheres  
para nos superar em todas as áreas  
esse é o legado que vamos deixar”

**(Rupi Kaur)**

## RESUMO

A dengue é um problema de saúde pública com milhões de casos reportados anualmente em todo mundo. A infecção pelo vírus da dengue possui uma variedade de sinais e sintomas abrangendo casos assintomáticos e sintomáticos. O sistema imune está envolvido na resposta do hospedeiro a infecções como também na patogênese de doenças, entre elas, a dengue. As citocinas e o óxido nítrico são componentes do sistema imune. A interleucina 6 (IL6) é uma citocina que possui uma importante função ligando a resposta imune inata à resposta imune adquirida. A óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é uma enzima responsável pela inibição da replicação viral através da produção de óxido nítrico. Polimorfismos genéticos podem influenciar na regulação do gene e na estrutura e função de proteínas. O objetivo do estudo foi investigar a relação dos polimorfismos nos genes da *iNOS* (-1173 C/T) e da *IL6* (T15A) com a infecção pelo vírus da dengue e progressão da doença. Tratou-se de um estudo do tipo caso controle com pacientes infectados pelo vírus da dengue e controles saudáveis da população. A identificação dos genótipos dos genes da *iNOS* (-1173 C/T) e da citocina *IL6* (T15A) foi determinada pela técnica de reação de cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), através do método de discriminação alélica. As análises das correlações entre as frequências genotípicas e alélicas em relação a susceptibilidade à infecção foi realizada pelo *software* BioEstat 5.3. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. O estudo foi composto por um total de 179 indivíduos, sendo 27 pertencentes ao grupo febre da dengue, 33 ao grupo febre hemorrágica da dengue e 119 compondo o grupo controle. Para o polimorfismo T15A do gene da *IL6*, não foi encontrada associação na distribuição alélica e genotípica entre os grupos estudados. Para o polimorfismo -1173 do gene da *iNOS* não foi encontrada associação na distribuição alélica e genotípica entre os grupos estudados. Não houve associação entre os polimorfismos *IL6* T15A e *iNOS* -1173C/T com a infecção pelo vírus da dengue.

**Palavras-chave:** Polimorfismo. Arbovirose. Genética.



## ABSTRACT

Dengue is a public health problem with millions of cases reported worldwide. The infection with dengue virus has a variety of signs and symptoms including asymptomatic and symptomatic cases. The immune system is involved in the host's response to infections as well as in the pathogenesis of diseases, including dengue. Cytokines and nitric oxide are components of the immune system. Interleukin 6 (IL6) is a cytokine that plays an important role in linking the innate immune response to the acquired immune response. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is an enzyme responsible for inhibiting viral replication through the production of nitric oxide. Genetic polymorphisms may influence gene regulation and protein structure and function. The study aimed to investigate the relationship of polymorphisms in *iNOS* (-1173 C / T) and *IL6* (T15A) genes with dengue infection and disease progression. It was a case-control study with patients infected with dengue virus and healthy controls of the population. The genotypes of the *iNOS* (-1173 C / T) and *IL6* (T15A) genes were determined by the real-time polymerase chain reaction (qPCR), using the allelic discrimination method. The analyzes of the correlations between genotypic and allele frequencies concerning susceptibility to infection were obtained using the *BioEstat 5.3 software*. *p-value* less than 0.05 were considered statistically significant. The study was composed of 179 individuals, 27 of the dengue fever group, 33 of the dengue hemorrhagic fever group, and 119 of the control group. The T15A polymorphism of the *IL6* gene, showed no association in the allelic and genotypic distribution between the groups. The -1173 polymorphism of the *iNOS* gene, showed no association in the allelic and genotypic distribution between the groups. No association was found between the polymorphism of *IL6* T15A and *iNOS* -1173C/T with dengue infection.

**Keywords:** Polymorphism. Arbovirus. Genetic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Número de sorotipos do DENV circulantes nos territórios e países da América .....	20
Figura 2 – Reinfestação do mosquito <i>Aedes aegypti</i> na América Latina e Caribe .....	21
Figura 3 – Municípios segundo índice de infestação predial (Zona Urbana) .....	23
Figura 4 – Estrutura do genoma do vírus da dengue.....	25
Figura 5 – Mosquito <i>Aedes (Stegomyia) aegypti</i> .....	26
Figura 6 – Ciclo de transmissão da dengue .....	27
Figura 7 – Modelo da replicação viral através da facilitação dependente de anticorpos .....	34
Figura 8 – Diagrama esquemático dos primeiros 2500 pares de base (pb) do promotor <i>iNOS</i> ...	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição das frequências genóticas do polimorfismo T15A (rs13306435) do gene da <i>IL6</i> na população estudada .....	46
Tabela 2 – Associação alélica e genotípica do polimorfismo T15A (rs13306435) do gene da <i>IL6</i> na população estudada .....	47
Tabela 3 – Distribuição das frequências genóticas do polimorfismo -1173 (rs9282799) do gene da <i>iNOS</i> na população estudada .....	48
Tabela 4 – Associação alélica e genotípica do polimorfismo -1173 (rs9282799) do gene da <i>iNOS</i> na população estudada.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i> ou facilitação dependente de anticorpos
CD	Célula dendrítica
COVID-19	Coronavírus 19
d.C	Depois de Cristo
DC-SIGN	<i>Dendritic Cellspecific Intercellular Adhesion Molecule 3 Grabbing Nonintegrin</i>
DENV	<i>Dengue virus</i> ou vírus da dengue
DENV-1	Vírus da Dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus da Dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus da Dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus da Dengue sorotipo 4
DENV-5	Vírus da Dengue sorotipo 5
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ou ácido desoxirribonucleico
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i> ou fator de relaxamento dependente do endotélio
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i> ou Enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial
Fc	Fragmentos cristalizados
Fc $\gamma$	Fragmentos cristalizados gama
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IH	Inibição da hemaglutinação
IL-2	Interleucina 2
IL6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
iNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase induzível
IPP	Índice de Infestação Predial
LPS	Lipopolissacarídeo
NASBA	Nucleic acid sequence based amplification
nNOS	Enzima Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NOS1	Enzima Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NOS2	Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível
NOS3	Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial
NS1	<i>Non structural protein 1</i> ou proteína não estrutural 1
NS1Ag	Antígeno NS1
NS2A	<i>Non structural protein 2A</i> ou proteína não estrutural 2A
NS2B	<i>Non structural protein 2B</i> ou proteína não estrutural 2B
NS3	<i>Non structural protein 3</i> ou proteína não estrutural 3
NS4A	<i>Non structural protein 4A</i> ou proteína não estrutural 4A
NS4B	<i>Non structural protein 4B</i> ou proteína não estrutural 4B

NS5	<i>Non structural protein 5</i> ou proteína não estrutural 5
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDC	Parceria para Controle de Dengue
qPCR	Real time Polymerase Chain Reaction
RE	Retículo endoplasmático
RM	Receptor de manose
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ou ácido ribonucléico
RT PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction ou Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SCD	Síndrome do choque da dengue
SNP	Single nucleotide polymorphism
SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
$\chi^2$	Qui-quadrado

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	18
2.1 Aspectos históricos da dengue.....	18
2.1.1 Dengue nas Américas .....	19
2.1.2 Dengue no Brasil .....	21
2.1.3 Dengue em Alagoas.....	23
2.2 Aspectos epidemiológicos .....	23
2.3 Agente etiológico.....	24
2.4 Agente transmissor .....	25
2.5 Replicação Viral .....	27
2.6 Manifestações clínicas.....	28
2.6.1 Infecção Assintomática.....	30
2.7 Diagnóstico laboratorial .....	30
2.7.1 Isolamento viral .....	30
2.7.2 Amplificação de ácidos nucleicos .....	30
2.7.3 Diagnósticos sorológicos (sorologia) .....	31
2.7.4 Inibição da hemaglutinação (IH) .....	31
2.7.5 ELISA .....	31
2.7.6 Antígeno NS1 .....	32
2.8 Prevenção.....	32
2.9 Imunopatogenia .....	33
2.10 Resposta Imune a Dengue .....	35
2.11 Citocinas .....	36
2.12 Interleucina 6 .....	37
2.13 Óxido Nítrico.....	38
2.14 Polimorfismos.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 Geral: .....	42
3.2 Específicos:.....	42
4. METODOLOGIA .....	43
4.1 Aspectos éticos e desenho do estudo.....	43
4.2 População e local de estudo.....	43
4.3 Extração .....	44

4.4 Eletroforese.....	44
4.5 Genotipagem.....	45
4.6 Análise estatística .....	45
5. RESULTADOS .....	46
5.1 Frequência genotípica e alélica do <i>SNP</i> do gene <i>IL6</i> .....	46
5.2 Frequência genotípica e alélica do <i>SNP</i> do gene <i>iNOS</i> . .....	47
6. DISCUSSÃO.....	49
6.1 <i>IL6</i> +15 T>A (rs13306435) .....	49
6.2 <i>iNOS</i> -1173 C>T (rs9282799) .....	51
7. CONCLUSÃO .....	53
REFERÊNCIAS .....	55
ANEXO .....	80

## 1. INTRODUÇÃO

A dengue é a arbovirose mais importante que afeta o homem, sendo transmitida pelo mosquito *Aedes aegypti*. Diversos fatores contribuem para o aumento no número de casos, entre eles, as condições ambientais e socioeconômicas, os níveis de população de mosquitos, sorotipo circulante e medidas de prevenção. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se 100-400 milhões de infecções anualmente, tornando quase metade da população mundial em risco de ser infectado (OMS, 2020).

A infecção pelo vírus da dengue possui um espectro amplo de sinais e sintomas abrangendo casos assintomáticos e sintomáticos, este último podendo progredir para um quadro mais grave e até mesmo chegar a óbito. Em 1997 a OMS criou um guia que classificava os casos de dengue em febre da dengue (FD), febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD). No entanto, por problemas na categorização dos pacientes, em 2009 foi criado um novo guia dividindo os casos em dengue sem sinais de alarme (DSSA), dengue com sinais de alarme (DCSA) e dengue severa (DS) (OMS, 1997, 2009).

Estudos têm demonstrado o envolvimento do sistema imune na resposta do hospedeiro e a patogênese da doença (COSTA et al., 2013; GUABIRABA; RYFFEL, 2014). As citocinas participam do sistema imune através da regulação das respostas inflamatórias e imunes (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; VAN DER MEIDE; SCHELLEKENS, 1996). Já o óxido nítrico apresenta um importante papel no controle e patogênese de doenças infecciosas como também na defesa do hospedeiro (BOGDAN, 2001; WINK et al., 2011).

O sistema imunológico possui um papel crucial na patogênese da dengue, sugerindo que mudanças nas respostas imunes podem estar envolvidas na severidade da doença (COSTA, 2013). Por esse motivo diversos elementos do sistema imune têm sido estudados para compreender a sua influência na progressão da dengue. O fenômeno *cytokine storm* (do inglês tempestade de citocinas) tem sido implicado na imunopatologia da dengue, visto que, a manifestação de sintomas graves coincidem com uma alta liberação de citocinas (CEDILLO-BARRÓN et al., 2014; CULSHAW; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2017; DONG et al., 2007). Assim, diversos mediadores inflamatórios parecem estar elevados durante um quadro de dengue, entre eles, as citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10 (SEHRAWAT, 2018; SENARATNE, 2016; DE LA CRUZ HERNANDEZ, 2016; DE MELO IANI, 2016). Além disso, os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão elevados antes e depois do extravasamento de plasma em pacientes com FHD (ROTHMAN, 2011).



A variação na resposta imunológica pode ser resultante de polimorfismos sendo caracterizado por pequenas mudanças na sequência do DNA. Os polimorfismos mais presentes no gene são os *SNPs* (*single nucleotide polymorphisms*) que apresentam a mudança de pelo menos um nucleotídeo na sequência gênica (ISMAIL; ESSAWI, 2012; OLLIER, 2004). Neste contexto, diversas pesquisas têm demonstrado que polimorfismos em genes relacionados ao sistema imune podem estar envolvidos na complicação de quadros de dengue (VARGAS-CASTILLO, 2018; ALAGARASU, 2015; FANG, 2012). Alguns polimorfismos em genes de citocinas foram associados com a dengue, entre eles, o gene *IL6* (AVENDAÑO-TAMAYO et al., 2017); o gene *IL10* (SANTOS et al., 2017) e *TNFA* (PEREZ et al., 2010). Assim também como o mensageiro intercelular, óxido nítrico (DOS SANTOS et al., 2019).

A investigação de *SNPs* em genes de citocinas e do óxido nítrico que estão envolvidos na resposta imune poderá contribuir para o entendimento da fisiopatologia da infecção pela dengue. Assim, a identificação de biomarcadores genéticos envolvidos na patogênese da doença permitirá a discussão e compreensão dos processos biológicos que podem determinar a susceptibilidade para infecção e progressão para um quadro mais grave. Portanto, considerando a hipótese de que polimorfismos genéticos presentes no sistema imune produzem diferentes respostas à infecção e estão associados com a susceptibilidade ao risco ou proteção para a gravidade da doença, a presente pesquisa teve como objetivo investigar polimorfismos genéticos nos genes da citocina *IL6* e da *iNOS* em indivíduos infectados pelo vírus da dengue e em pessoas saudáveis do município de Arapiraca.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos históricos da dengue

O advento da navegação contribuiu para a distribuição generalizada do mosquito *Aedes aegypti* no Novo Mundo durante os séculos XVII, XVIII e XIX, tornando-se uma espécie altamente adaptada aos seres humanos (GUBLER, 2006).

Os primeiros relatos sobre uma doença com sintomas parecidos com a dengue são datados de 265-420 d.C. e foram retirados de uma enciclopédia chinesa sobre sintomas e remédios. A doença foi chamada de veneno da água e acreditava-se que estava relacionada com insetos voadores (GUBLER, 1998, 2006).

As primeiras epidemias registradas datam de 1779 em Jacarta e no Cairo (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994). David Bylon, observou uma doença febril de caráter epidêmico em Batavia no ano de 1779, sendo às vezes creditada como a primeira descrição publicada da dengue. Entretanto, Hirsch, em 1779, relatou uma epidemia no Cairo com descrições similares as de Bylon (CAREY DONALD. E., 1971). Em 1780, a primeira descrição clínica foi feita por Benjamin Rush, durante uma epidemia na Filadélfia e era chamada de “*break bone fever*” (em português “febre quebra ossos” (RUSH, 1951).

Christie, 1872, 1882 sugere que a origem da palavra dengue tenha sido na língua suaíli falada em alguns países do continente africano. O uso da palavra “dengue” para descrever uma doença foi visto pela primeira vez na Espanha em 1801 e sua utilização foi introduzida na literatura médica inglesa durante a epidemia que ocorreu no Caribe de exantema com artralgia durante os anos de 1827-1828 (GUBLER, 2006; HALSTEAD, 1980).

Os primeiros estudos para a identificação do agente causador da dengue ocorreram durante a Segunda Guerra Mundial sendo realizados por pesquisadores japoneses e americanos. Kimura em 1943 e Hotta em 1944 isolaram pela primeira vez o vírus (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Em 1952, Sabin conseguiu mostrar que algumas cepas de vírus de três localizações geográficas diferentes (Havaí, Nova Guiné e Índia) eram antigenicamente semelhantes (SABIN, 1952). Os vírus do Havaí e Índia foram denominados DENV-1 (vírus da dengue 1) e o da Nova Guiné DENV-2 (vírus da dengue 2) (GUBLER, 2006). Em 1953/54 nas Filipinas ocorreu a primeira epidemia de febre hemorrágica da dengue (FHD) e no ano de 1956 em Manila foi isolado mais dois sorotipos que foram denominados DENV-3 (vírus da dengue 3) e DENV-4 (vírus da dengue 4) (GUBLER, 2006; HAMMON; RUDNICK; SATHER, 1960). Em 1958 na cidade de Bangkok, na Tailândia ocorreu outra epidemia de febre hemorrágica da dengue (HALSTEAD; YAMARAT, 1965; HAMMON; RUDNICK; SATHER, 1960). A partir

destes casos, houve uma expansão pelo sudeste asiático (HENCHAL; PUTNAK, 1990) e em 1969 foi relatado um surto no Panamá com sintomas característicos aos da dengue (MCSHERRY, 1982), mas sem comprovações laboratoriais.

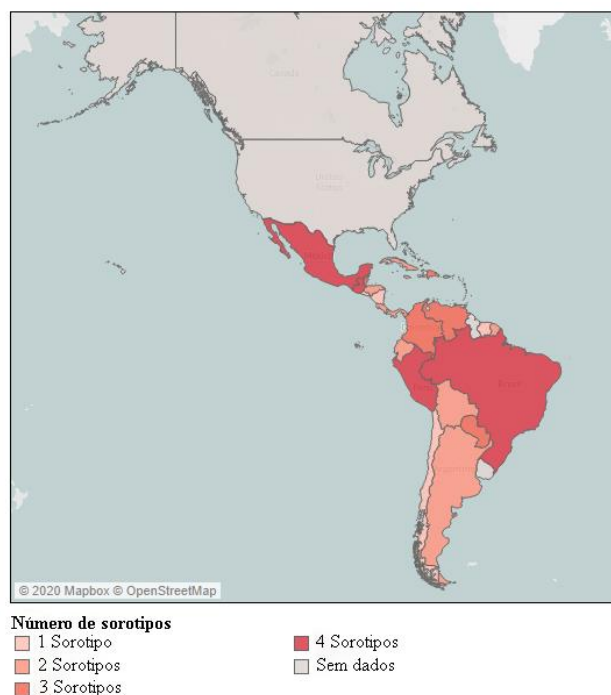
### 2.1.1 Dengue nas Américas

A dengue ou uma doença semelhante foi relatada desde o século XVII. Em 1780 foi descrito um surto de dengue na Filadélfia, sendo a descrição clínica mais segura já associada à Dengue na América (RUSH, 1951).

Em 1818, o surto de uma doença parecida com a dengue foi registrado no Peru com aproximadamente 50.000 mil casos reportados (SCHNEIDER; DROLL, 2001). Durante 1827 e 1828, outro surto envolvendo o Golfo do México e Caribe foi registrado. Esse surto iniciou-se nas Ilhas Virgens e se estendeu até Jamaica, Colômbia, Cuba, Venezuela e algumas cidades portuárias no sul dos Estados Unidos da América e no México (DICK et al., 2012; EHRENKRANZ et al., 1971). Em 1844 – 1849, um quadro clínico parecido ao da dengue foi relatado em vários países na América, como Brasil e Estados Unidos (Nova Orleans) (EHRENKRANZ et al., 1971; SCHNEIDER; DROLL, 2001). Quatro sorotipos diferentes de DENV são conhecidos e causam a dengue desde sua primeira identificação em 1943 (CUCUNAWANGSIH; LUGITO, 2017).

O primeiro sorotipo reportado nas Américas foi o DENV-2 em 1953 em Trinidad e Tobago, porém seu registro continuado no continente só ocorreu no fim dos anos de 1960 e no início dos anos de 1970. Já em 1963 foi detectada a ressurgência do DENV-2 associado a casos de febre da dengue. O DENV-1 não havia sido reportado na América até 1977, quando foi encontrado no Paraguai, Porto Rico e Barbados (ANDERSON; DOWNS, 1956; BARRETO; TEIXEIRA, 2008; MESSINA et al., 2014). O DENV-3 foi reportado em 1963 em Porto Rico (MESSER et al., 2003; NEFF et al., 1967) e o DENV-4 não tinha sido reportado até o ano de 1981 quando foi identificado no Brasil, Cuba, Dominica, Porto Rico e Ilhas Virgens (MESSINA et al., 2014). Atualmente os quatro sorotipos circulam nas Américas (OPAS, 2020) (Figura 1).

**Figura 1 – Número de sorotipos do DENV circulantes nos territórios e países da América.**



Fonte: Adaptado de Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), 2020.

A primeira epidemia de febre hemorrágica da dengue ocorreu em Cuba no ano de 1981 com um total de 344.203 casos, sendo 10.312 casos severos e 158 mortes (KOURÍ; GUZMÁN; BRAVO, 1986). Contudo, a grande ascensão da doença no continente americano se deu a partir dos anos 1980, nesse período 25 países registraram a circulação do vírus. Em 2002, observou-se uma grande pandemia continental atingindo 69 países, onde foi registrado um total de mais de um milhão de casos de febre da dengue (FD) (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

A partir de 1998 até 2012, aproximadamente 80% dos casos de febre da dengue relatados na América do Sul foram adquiridos nos países do Cone Sul, região que compreende os países Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, sendo o Brasil responsável por 97,5%, com 565.000 casos em 2012 (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2013).

No período de 2011-2017 houve um aumento do número de casos de dengue quando comparado com o período de 2001-2010, com 10.851.043 e 7.641.334, respectivamente (SALLES et al., 2018). Em 2019 foram reportados 3.167.542 casos de dengue, enquanto em 2020 foram reportados 2.300.558 casos nas Américas (OPAS, 2021).

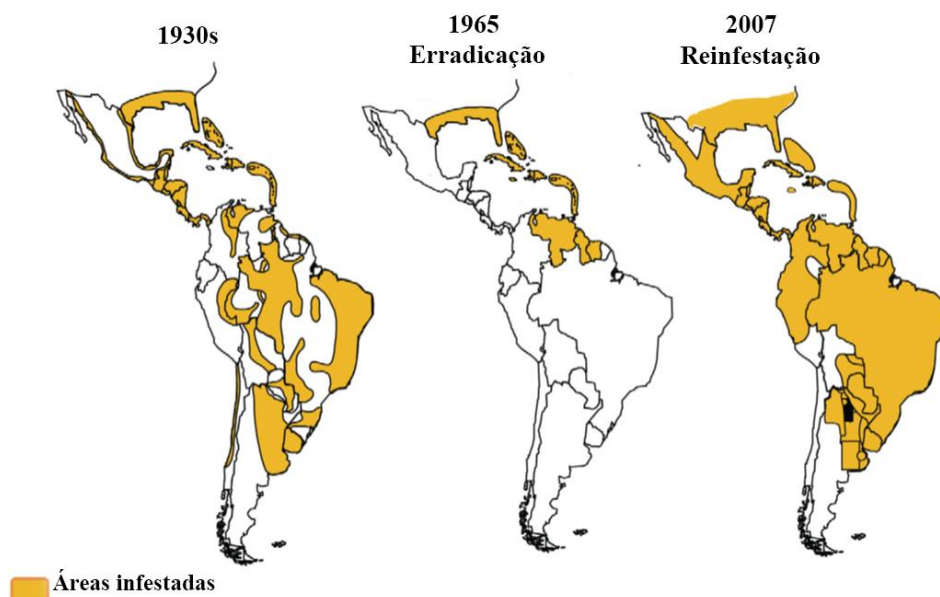
O Programa Regional da Dengue da OPAS/OMS, com base nos dados obtidos até a 24ª semana epidemiológica, registrou 675.321 mil casos prováveis da doença, sendo 269.141 mil casos confirmados laboratorialmente, 823 casos de dengue severa e 157 óbitos na Região das Américas (OPAS, 2021).

### 2.1.2 Dengue no Brasil

Antes da epidemia de Boa Vista, Roraima, em 1981/1982, há registro da ocorrência de dengue na cidade de Niterói no Rio de Janeiro, em 1923, porém sem diagnóstico laboratorial (BRASIL, 2020).

Com o programa de erradicação do mosquito *Aedes aegypti* promovido por Oswaldo Cruz em 1904 para acabar com a febre amarela, houve um período de ausência de casos de dengue entre 1923 até 1981 (FIGUEIREDO, 2000). Com esse programa, nas décadas de 1950 e 1960, o Brasil conseguiu eliminar de seu território o vetor da dengue (SALLES et al., 2018; TAUIL, 2002) (Figura 2).

**Figura 2 – Reinfestação do mosquito *Aedes aegypti* na América Latina e Caribe.**



Fonte: Adaptado de TAPIA-CONYER; MÉNDEZ-GALVÁN; GALLARDO-RINCÓN, 2009.

No Brasil, o *Aedes aegypti* foi reencontrado em 1975 na Bahia (NOGUEIRA et al., 1988) e em 1977 no Rio de Janeiro. O vetor da dengue havia sido declarado erradicado no Brasil em 1973 (SOUZA, 2008). Desde a década de 80 têm-se registrado a circulação simultânea de diferentes sorotipos da dengue, principalmente o DENV-1 e DENV-2 (MONTENEGRO et al., 2006) e várias epidemias ocorreram no Brasil causando milhões de infecções (FIGUEIREDO et al., 1998).

A primeira epidemia de febre da dengue ocorreu no estado de Roraima no ano de 1981, com 7.000 casos e foram identificados os sorotipos DENV-1 e DENV-4, com isolamento viral

(BASTOS et al., 2012; OSANAI et al., 1983; SALLES et al., 2018). Em 1986, o sorotipo DENV-1 foi encontrado no estado do Rio de Janeiro e disseminado para o resto do país (NOGUEIRA; MIAGOSTOVICH; SCHATZMAYR, 2000). Desde então, sucessivas epidemias vem ocorrendo e assim transformando a doença em um problema de saúde pública (NOGUEIRA et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2009). No final de abril de 1990 foi relatado o isolamento do sorotipo DENV-2 (NOGUEIRA et al., 1990).

No final do ano 2000, a detecção de um novo sorotipo, o DENV-3, no Rio de Janeiro, colocava o Brasil sob risco de uma nova epidemia (SALLES et al., 2018). Em janeiro de 2002 um aumento no número de casos de dengue foi observado, pois a população havia apenas tido contato com os sorotipos DENV-1 e DENV-2 (RIBEIRO NOGUEIRA et al., 2005). O DENV-3 se espalhou rapidamente na maioria do território brasileiro afastando os sorotipos DENV-1 e DENV-2 de vários estados do Brasil nos anos subsequentes (TEIXEIRA et al., 2005).

Os primeiros casos de FHD e fatais foram confirmados em 1990, depois da introdução do sorotipo DENV-2. Durante a década seguinte, ocorreram 893 casos de febre hemorrágica da dengue com 44 óbitos, sendo a maioria dessas mortes ocorridas no estado do Rio de Janeiro (NOGUEIRA; ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007; SIQUEIRA et al., 2005).

Entre 1987 e 2010, apenas três sorotipos (DENV 1, 2 e 3) estavam em circulação no Brasil e desta forma a febre da dengue tornou-se uma doença endêmica (AMÂNCIO et al., 2014; CODEÇO et al., 2009). O DENV-4 reemergiu no estado de Roraima, em julho de 2010. Esse sorotipo não tinha sido detectado no país por 30 anos, sendo confirmados menos de 20 casos de infecção pelo vírus (NOGUEIRA; EPPINGHAUS, 2011).

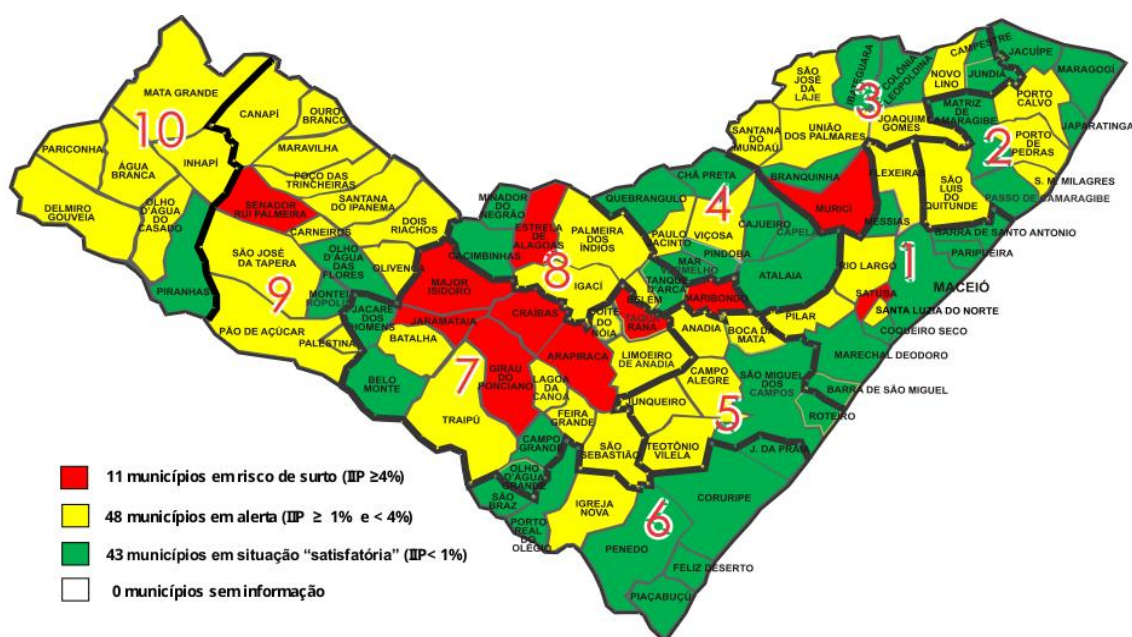
Em 2019, foram reportados aproximadamente 2.3 milhões de casos de dengue. O número de casos de dengue aumentou quase 19%, passando de 79.131 entre 29 de dezembro e 01 de fevereiro de 2019 para 94.149 no mesmo período no ano de 2020 (LORENZ; AZEVEDO; CHIARAVALLI NETO, 2020). No entanto, a partir do mês de março de 2020 houve uma redução de notificações quando comparado ao ano de 2019 (LEANDRO et al., 2020).

Até a 23ª semana epidemiológica (SE) que corresponde a 03/01/2021 até 12/06/2021, o país registrou 379.150 mil casos prováveis de dengue, 2.251 casos de dengue com sinais de alarme, 179 casos de dengue grave e 116 óbitos (BRASIL, 2021a). Devido a pandemia de Coronavírus 19 (COVID-19) observou-se uma redução de 69,5% de casos comparando com o ano de 2020 (BRASIL, 2021b), essa diminuição pode ser consequência da subnotificação de casos ou atraso de notificações devido ao impacto da pandemia nos serviços de saúde.

### 2.1.3 Dengue em Alagoas

O estado de Alagoas está localizado na região Nordeste, possuindo 102 municípios e uma população de aproximadamente 3.351.543 habitantes, com uma extensão de 27.843.295 km<sup>2</sup>. O clima predominante no estado é semiárido e tropical úmido (IBGE, 2020). Até a 23ª semana epidemiológica (SE) que corresponde a 03/01/2021 até 12/06/2021 Alagoas registrou 546 casos prováveis de dengue, nenhum caso de dengue com sinais de alarme, dengue grave ou óbito (BRASIL, 2021a). Quando avaliada a infestação do vetor transmissor da dengue através do Índice de Infestação Predial (IIP), percebe-se que 11 municípios estão em situação de risco de surto (IIP ≥ 4%), 48 em situação de alerta (1% ≥ IIP < 4%) e 43 em situação satisfatória (IIP < 1%) (ESTADO DE ALAGOAS, 2018) (Figura 3).

**Figura 3 - Municípios segundo índice de infestação predial (Zona Urbana).**



Fonte: SES-AL/ESTADO DE ALAGOAS, 2018.

Nota: Os números de 1 a 10 correspondem as Regiões de Saúde do estado de Alagoas.

## 2.2 Aspectos epidemiológicos

A incidência de dengue tem crescido ao redor do mundo nas recentes décadas. Aproximadamente metade da população mundial está em risco de ser infectada pelo vírus. Antes de 1970, apenas nove países tinham experimentado epidemias de dengue, agora a doença é endêmica em mais de 100 países estando presente na África, América, no leste do Mediterrâneo, sudeste da Ásia e no oeste do Pacífico, sendo as regiões mais afetadas o sudeste

da Ásia e o oeste do Pacífico (BRAGA et al., 2010; CHAWLA; YADAV; CHAWLA, 2014, OMS, 2019).

Nos últimos 50 anos a incidência de dengue cresceu quase 30 vezes (GYAWALI; BRADBURY; TAYLOR-ROBINSON, 2016). Estima-se que 390 milhões casos de dengue possam ocorrer anualmente, dos quais 96 milhões são da forma sintomática (BHATT et al., 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde, depois de uma diminuição do número de casos nos anos de 2017-2018, um aumento foi observado em 2019, afetando as regiões Africana, Pacífico Ocidental e América (OMS, 2020).

Muitos fatores são responsáveis pela ressurgência de epidemias de dengue nos últimos anos tais como mudanças sociodemográficas, crescimento populacional, processo de urbanização, aumento de viagens, mudanças climáticas e programa de controle de vetores insuficientes e evolução viral (BARBOSA et al., 2012; CHOI et al., 2016; HINO et al., 2010; KATZELNICK; COLOMA; HARRIS, 2017; MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013; SABA et al., 2014).

Diante da capacidade de se adaptar às mudanças climáticas e situações urbanas, e o grande número de casos anualmente, a dengue torna-se um problema de saúde pública.

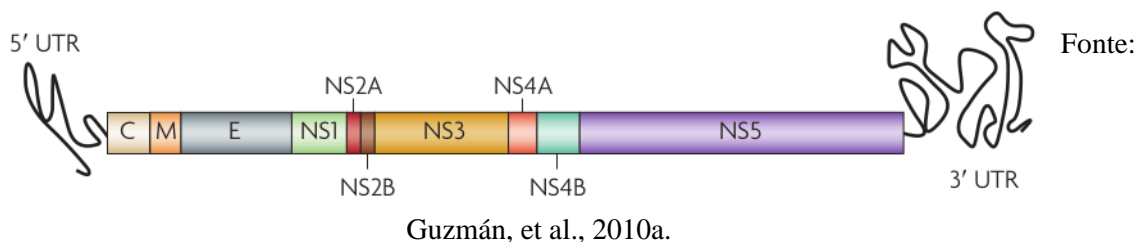
### **2.3 Agente etiológico**

O vírus da dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, que possui o nome derivado da palavra latina *Flavus*, que significa amarelo, característica da icterícia causada pela febre amarela (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005) e da família *Flaviviridae* (SHUM et al., 2010). O vírus da dengue apresenta uma partícula esférica medindo 40-50 nm de diâmetro envolvido por um envelope lipídico, uma fita simples de RNA com polaridade positiva (GUZMAN et al., 2010a; LEITMEYER et al., 1999). Seu material codifica três proteínas estruturais, o capsídeo (C), a pré-membrana (prM) e o envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS), NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (CULSHAW; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2017; GUZMAN et al., 2010a; WILDER-SMITH et al., 2019). As proteínas estruturais possuem importante papel na conformação da partícula viral, a proteína C encapsula o genoma que é então envolvido por uma camada bilipídica, nas quais as proteínas E e M estão imersas (GUZMAN; VAZQUEZ, 2010; WILDER-SMITH et al., 2019). A proteína E se liga aos receptores celulares para assim permitir a entrada do vírus em células predispostas e as proteínas não estruturais formam o complexo de replicação que amplifica o genoma viral (WILDER-SMITH et al., 2019). Tanto a extremidade 5' como a 3' de região não



traduzidas carregam elementos de RNA que são essenciais para a tradução e replicação do genoma que interagem entre si formando estruturas essenciais para a replicação do RNA viral (BARTENSCHLAGER; MILLER, 2008; CHIU; KINNEY; DREHER, 2005; MELINO; PACI, 2007) (Figura 4).

**Figura 4 - Estrutura do genoma do vírus da dengue.**



Nota: A única fase de leitura aberta codifica três proteínas estruturais (as glicoproteínas do capsídeo (C), da membrana (M) e do envelope (E)) e sete proteínas não estruturais (NS) (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

Há quatro sorotipos que são geneticamente relacionados entre si, porém são antígenicamente distintos, por possuírem cerca de 70% de sequências homólogas, as manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos infectados são semelhantes (GREEN; ROTHMAN, 2006; ROTHMAN, 2004, 2011). No entanto, os sorotipos DENV-1 e 2 já foram associados com a gravidade da doença (KATZELNICK et al., 2020; ROCHA et al., 2017; VICENTE et al., 2016; YUNG et al., 2015).

Um possível quinto sorotipo (DENV-5) foi identificado na Malásia em 2007 a partir de uma amostra de soro de paciente, acreditava-se que o novo vírus poderia ser uma variante do DENV-4, porém depois de experimentos ficou comprovado que se tratava de um novo sorotipo, porém este ainda não foi reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (DENNIS NORMILE, 2013; MUSTAFA et al., 2015).

## 2.4 Agente transmissor

A primeira confirmação de que a transmissão da dengue é feita através de mosquitos foi documentada de 1906, onde Bancroft concluiu através de observações que o mosquito era o transmissor e só em 1916, Clelland, Bradley e McDonald comprovaram que o *Aedes aegypti* era o vetor da dengue (CHRISTOPHERS, 1960). O *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* é a principal espécie transmissora do DENV em seres humanos como também é responsável por ciclos

epidêmicos e endêmicos (BARRETO; TEIXEIRA, 2008; GUBLER, 1998). Apesar do seu nome estar relacionado com a transmissão da febre amarela, o *Aedes aegypti* tornou-se um problema de saúde pública por ser o vetor da dengue (POWELL; TABACHNICK, 2013) (Figura 5).

O *Aedes aegypti* é um mosquito que possivelmente possui ascendências na África (BRAGA; VALLE, 2007; POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018). Possivelmente este vetor foi introduzido no território das Américas através das excursões europeias ao Novo Mundo (América do Norte e Sul) (POWELL; TABACHNICK, 2013). Brasil e Argentina são candidatos aos países que o mosquito foi introduzido primeiro (POWELL; GLORIA-SORIA; KOTSAKIOZI, 2018).

O habitat do *Aedes aegypti* é encontrado principalmente em áreas urbanas e peri-urbanas e que estão ligadas a locais de reprodução e alimentação (BESERRA et al., 2009; CUSTÓDIO et al., 2019). Observa-se que esta espécie possui uma alta capacidade de adaptação às condições ambientais favorecendo assim a sua permanência na sociedade (DE CASTRO et al., 2013; JANSEN; BEEBE, 2010). O mosquito possui hábito diurno com atividade hematofágica e frequentemente se alimenta de múltiplos hospedeiros durante um único ciclo (JANSEN; BEEBE, 2010; TAUILL, 2002).

**Figura 5 – Mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti*.**

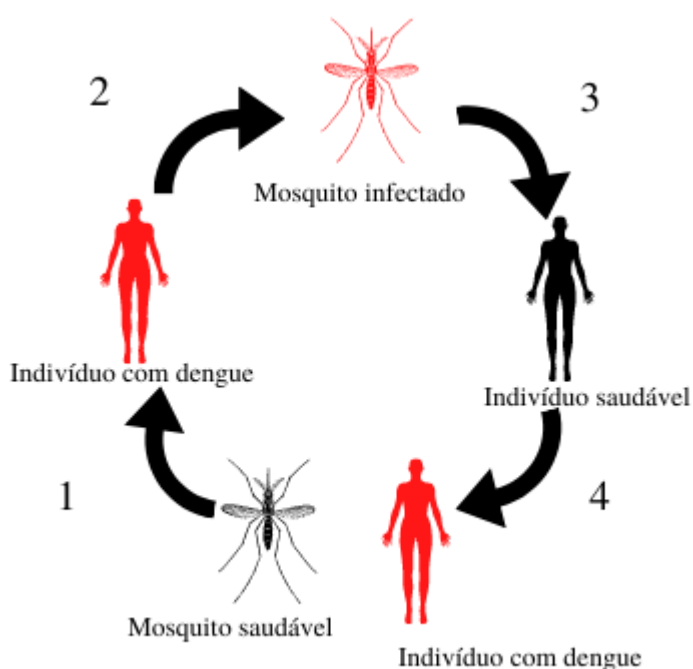


Fonte: James Gathany/CDC.

O *Aedes albopictus* é outro mosquito capaz de transmitir a dengue, diferentemente do *Ae. aegypti*, este prefere seu habitat natural na floresta (BRAGA; VALLE, 2007). O *Aedes albopictus* foi identificado pela primeira vez no Brasil no ano de 1986 (FORATTINI, 1986). E a primeira notícia desta espécie infectada com o vírus da dengue na América deu-se durante um surto no México em 1995 onde 10 mosquitos machos estavam infectados com os sorotipos DENV-2 e DENV-3 (IBÁÑEZ-BERNAL et al., 1997).

Após o homem ser infectado, o vírus passa por um período de incubação de 3-10 dias quando podem surgir os primeiros sintomas inespecíficos e febre (GUBLER, 1998). O vírus cresce no intestino do mosquito e migra para as glândulas salivares (HIDARI; SUZUKI, 2011). O ciclo de transmissão da dengue inicia-se quando o mosquito se alimenta de um indivíduo infectado pelo vírus da dengue (OMS, 2021).

**Figura 6 – Ciclo de transmissão da dengue.**



Fonte: Autor da pesquisa.

Nota: Um mosquito saudável pica um indivíduo com dengue, o vírus se multiplica no mosquito, tornando-o infectado, depois o mosquito pica um indivíduo saudável e esse indivíduo fica doente.

## 2.5 Replicação Viral

Monócitos, macrófagos, células dendríticas, células linfoides e linfócitos são os principais alvos da replicação viral em humanos (CHAWLA et al., 2013; JESSIE et al., 2004; SCHMID; DIAMOND; HARRIS, 2014). A variedade de células que o vírus infecta pode indicar a ligação a uma molécula onipresente da superfície celular ou exploração de múltiplos receptores para mediar a infecção (RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010).

A pele é o primeiro sítio de infecção da dengue, nela está presente uma variedade de células que estão envolvidas no sistema imunológico (IVORY; BIRCHALL; PIGUET, 2015).

Após a picada pelo mosquito, o vírus da dengue infecta inicialmente as células de Langerhans que são células dendríticas presentes na pele (WU et al., 2000).

Na infecção primária por DENV, o vírus entra nas células alvo após a proteína E se aderir aos receptores da superfície celular. A captação viral ocorre por endocitose mediada pelo receptor da célula alvo (HIDARI; SUZUKI, 2011; ROSS, 2010; SHUM et al., 2010). Os receptores são essenciais para o processo de infecção, pois são responsáveis pelo processo de desbloqueio, seja ativando alterações moleculares que levam a penetração ou guiando os vírions para locais celulares específicos que irão desencadear a penetração e conseqüentemente a infecção (GROVE; MARSH, 2011). Na dengue, a interação do vírus com o receptor da célula hospedeira é crucial para a propagação do vírus e a progressão da doença. Um dos mais conhecidos receptores é o *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin* (DCSIGN), a entrada mediada por esse receptor faz com que o DENV se propague nas células dendríticas (CD) (HIDARI; SUZUKI, 2011). Além disso, outros receptores são apontados, como por exemplo, o receptor de manose (RM) dos macrófagos e o lipopolissacarídeo (LPS), receptor CD14 (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015).

A acidificação endossomal induz mudanças conformacionais no vírion, resultando na fusão das membranas virais e endossômicas e na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma, onde ocorre a replicação (HEINZ, 1994; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; SHUM et al., 2010). O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases celulares e virais e as proteínas não estruturais replicam o RNA do genoma e a montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (RE) (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016; SCREATON et al., 2015; TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013). Esse processo ocorre no retículo endoplasmático, uma vez que, possui um complexo de replicação que contém membranas, RNA viral, gotículas lipídicas e proteínas virais e do hospedeiro (BOLDESCU et al., 2017). Partículas imaturas de vírus são transportadas pela via secretora e no ambiente ácido do complexo de Golgi ocorre a clivagem mediada pela furina levando à maturação do vírus, assim o vírus maduro é liberado da célula (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016; TUISKUNEN BÄCK; LUNDKVIST, 2013).

## **2.6 Manifestações clínicas**

A infecção pelo vírus da dengue pode apresentar um espectro amplo de manifestações clínicas e uma evolução imprevisível. As manifestações podem variar desde uma febre branda até extravasamento de plasma e quadros hemorrágicos.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a infecção sintomática pode ser classificada como febre da dengue que corresponde a uma doença febril em que o período de incubação varia entre 2-7 dias, a temperatura corporal pode alcançar 38 °C. Pode ainda haver rubor facial, eritema cutâneo, dor no corpo, mialgia, dor de cabeça e artralgia. Ademais, alguns pacientes podem apresentar tosse, fadiga, dor de cabeça, anorexia, náuseas e vômitos (OMS, 1997; TANTAWICHIEEN, 2012).

Febre hemorrágica da dengue é caracterizada por febre alta (39 °C), tendência hemorrágica (prova do laço positiva, petéquias, gengivorragia, epistaxe, sangramentos de mucosas do trato gastrointestinal e etc), e muitas vezes, aumento do fígado e problemas circulatórios, plaquetopenia ( $<100.000/\text{mm}^3$ ), hemoconcentração com aumento de 20% do hematócrito ou queda em 20% após o tratamento, derrames cavitário (pleural, pericárdico e ascítico). A principal diferença que determina a severidade da doença é o extravasamento plasmático causado pelo aumento do hematócrito. A FHD é classificada em 4 graus de severidade, sendo I e II os que distinguem da FD e os graus III e IV são considerados síndrome do choque da dengue (SCD) que é caracterizado por pulso fraco e rápido, pressão de pulso imperceptível, hipotensão, com a presença de pele fria e úmida e inquietação.

A classificação de 1997 possuía limitações, já que ela havia sido baseada nas manifestações clínicas apresentadas por crianças tailandesas e dessa forma, não representava a universalidade da doença e era difícil de definir em adultos. Além disso, descrições clínicas e indicadores de gravidade ainda precisavam ser estabelecidas para adultos (BINH et al., 2009; HADINEGORO, 2012).

Por problemas na aplicabilidade, adequação dos casos e tratamento eficaz, em 2009 a Organização Mundial da Saúde reformulou a classificação da doença (LIMA et al., 2013; OMS, 2009). E estratificou em três grupos, sendo:

1. Dengue sem sinais de alarme que é caracterizado por apresentar além de febre, até dois outros sintomas, como náusea, vômito, erupção cutânea, leucopenia e teste do torniquete positivo.
2. Dengue com sinais de alarme que inclui dor abdominal, vômito persistente, acúmulo de fluidos, sangramento de mucosas, inquietação, letargia, aumento do fígado, diminuição do número de plaquetas.
3. Dengue severa caracterizada por grave extravasamento de plasma, podendo evoluir para choque, hemorragia intensa e falência de órgãos (OMS, 2009).

### 2.6.1 Infecção Assintomática

A infecção assintomática é definida como uma infecção pelo vírus da dengue sem a apresentação de manifestações clínicas ou possuir um quadro leve que pode ser caracterizado por uma febre indiferenciada (ENDY et al., 2011). Estima-se que três quartos de 390 milhões de infecções pelo vírus da dengue a cada ano são assintomáticas, assim o indivíduo infectado contribui significativamente no ciclo de transmissão (DUONG et al., 2015).

## 2.7 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de dengue é realizado laboratorialmente, sendo esta a forma mais confiável, uma vez que o diagnóstico feito através dos sintomas podem levar a confusão com outras doenças. Diversas técnicas são utilizadas atualmente para o diagnóstico de infecção pelo DENV, entre elas, podemos citar: isolamento viral, amplificação de ácidos nucleicos e diagnósticos sorológicos.

Após o início da doença, o vírus pode ser detectado no plasma, soro, células sanguíneas e outros tecidos por 4-5 dias. Durante os estágios iniciais para o diagnóstico da infecção são utilizados o isolamento viral, detecção de ácido nucleico ou antígeno. Já no final da fase aguda da doença o método sorológico é o mais indicado para diagnóstico (OMS, 2009).

### 2.7.1 Isolamento viral

O isolamento viral é considerado o padrão-ouro para a identificação da infecção pelo DENV (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017; PARKASH; SHUEB, 2015; SHU; HUANG, 2004). Pode ser realizado através da inoculação de amostras em mosquitos, culturas de células em *in vitro* e em cérebro de camundongo (PARKASH; SHUEB, 2015). A linha de mosquito mais utilizada para o isolamento viral é C6/36 (*Ae. albopictus*) (BHAT et al., 2015; MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017; WRIGHT; PRITT, 2012). Entretanto, esta técnica não é geralmente utilizada por possuir um alto custo (BHAT et al., 2015).

### 2.7.2 Amplificação de ácidos nucleicos

O diagnóstico realizado pelo método molecular de RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase em tempo real) tem sido bem sucedido (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). O diagnóstico feito através da PCR pode fornecer um

diagnóstico no mesmo ou no dia seguinte durante a fase aguda doença, além disso, ele é mais sensível e tem a vantagem de processar um grande número de amostras e ser usado tanto na forma qualitativa (presença ou ausência) como quantitativa (determinação carga viral) (CORDEIRO, 2012; MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017; YAP; SIL; NG, 2011). Outras técnicas de PCR têm sido descritas como métodos de identificação viral: PCR convencional, Nested RT-PCR, RT-PCR multiplex e amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos (NASBA) (SHU; HUANG, 2004; WRIGHT; PRITT, 2012).

Embora os métodos baseados em PCR sejam rápidos e precisos, eles requerem um laboratório com equipamento especializado e treinamento pessoal para realizar a análise (BHAT et al., 2015; MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). Além disso, é um método que apresenta um custo elevado para a realidade do Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil.

### 2.7.3 Diagnósticos sorológicos (sorologia)

Os testes sorológicos são os mais utilizados para o diagnóstico de infecção pelo vírus da dengue, visto que são mais fáceis de manusear e o custo é relativamente baixo. Estes testes incluem a inibição da hemaglutinação (IH); antígeno NS1; ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) utilizado para a detecção da imunoglobulina M (IgM) e anticorpos de imunoglobulina G (IgG) (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017; PARKASH; SHUEB, 2015).

### 2.7.4 Inibição da hemaglutinação (IH)

Esse teste descrito por Clarke e Casals (1957) costumava ser popular e atuava como um padrão-ouro para o diagnóstico de infecção pelo DENV (CHATCHEN; SABCHAREON; SIRIVICHAYAKUL, 2017; MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017; PARKASH; SHUEB, 2015). O princípio dessa técnica é baseado na capacidade do envelope do vírus aglutinar as células vermelhas do sangue. Os anticorpos anti-dengue presentes nos soros de pacientes infectados inibem essa aglutinação e a extensão dessa inibição é medida no teste IH (OMS, 2009; PARKASH; SHUEB, 2015).

### 2.7.5 ELISA

O teste ELISA de captura de IgM depende da resposta imune da pessoa infectada e o tempo que leva para a produção de anticorpos IgM contra antígenos do vírus da dengue. Na

maioria dos casos, o IgM torna-se detectável apenas entre os dias 4-5 da doença (BHAT et al., 2015). O uso do IgM é aplicado na vigilância epidemiológica (GUZMÁN et al., 2004; GUZMAN et al., 2010b).

O teste de captura de IgG pode ser usado para identificar uma infecção primária e secundária por dengue nos soros dos pacientes (PARKASH; SHUEB, 2015). Além disso, o IgG não aparece durante a fase aguda (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017), sendo o melhor método de diagnóstico após 10 dias de infecção (MAHAPATRA et al., 2014).

Uma das limitações dos testes IgM e IgG é que os níveis dessas imunoglobulinas são muito baixos na fase inicial da infecção (0-3 dias), não podendo ser utilizado para detectar a infecção durante esse período (BHAT et al., 2015). Além disso, o ELISA também é incapaz de diferenciar sorotipos de dengue (CHATCHEN; SABCHAREON; SIRIVICHAYAKUL, 2017).

#### 2.7.6 Antígeno NS1

O teste NS1Ag (antígeno NS1) é o método mais eficaz para o diagnóstico de infecção pelo DENV quando comparado com ELISA, pois a proteína viral NS1 é secretada pelas células infectadas e encontrada em altos níveis no sangue de indivíduos infectados e pode ser detectada desde o início dos sintomas até 9 dias ou mais após o início da doença, pelo menos em infecções primárias (SHU HUANG, 2004; MULLER 2017, MAHAPATRA et al., 2014).

A incapacidade de detectar a infecção nas amostras coletadas na fase tardia da dengue, torna-se uma das principais limitações dessa técnica, pois há uma diminuição da quantidade de antígeno NS1 presente no soro (BHAT et al., 2015).

## 2.8 Prevenção

Em consequência da falta de terapias antivirais específicas e de vacinas para conter o aumento de infecções pelo DENV, o controle da transmissão é feito pelo manejo dos vetores, sendo esta a estratégia disponível para a diminuição das taxas de mortalidade e morbidade que são causadas pela Dengue. No entanto, essa estratégia não tem sido satisfatória para a redução da transmissão (FARES et al., 2015; GHOSH; DAR, 2015; KOTSAKIOZI et al., 2017; PEPIN et al., 2013), torna-se necessário que as ações de controle dos vetores tenham o foco principalmente voltado para a prevenção, pois quando se concentram apenas em uma situação de emergência, o resultado é a resistência aos inseticidas mostrado pelos vetores (AGUIRRE-OBANDO et al., 2016). A principal abordagem para o controle tem sido a supressão do principal vetor de mosquitos, *Ae. aegypti*, através de programas de redução baseados em



inseticidas (SCHMIDT et al., 2017). Outra forma de prevenção é o uso de repelentes, porém o mais importante é a identificação e eliminação de criadouros de mosquitos (BHAT et al., 2015).

Uma fundação sem fins lucrativos chamada Parceria para Controle de Dengue (PDC) desenvolveu uma lista de estratégias que podem ser utilizadas para a eliminação da doença (1) reduzir a população global de mosquitos, (2) mudar a estrutura etária da população de mosquitos femininos, (3) manipular o comportamento do mosquito fêmea, (4) substituir mosquitos de tipo selvagem com estirpes/genótipos que não transmite o DENV, ou (5) alguma combinação das estratégias citadas (ACHEE et al., 2015). Surtos de Dengue, Chikungunya e Zika, levantam preocupações sobre os riscos de novas epidemias e evidenciam a necessidade de uma vigilância entomológica eficaz e o desenvolvimento de novas medidas de controle para o mosquito (MAITRA et al., 2019).

Um método de prevenção promissor é a utilização da bactéria *Wolbachia* que vive dentro das células de insetos e que pode atuar como um supressor na transmissão de vírus para novos hospedeiros. A bactéria age causando incompatibilidade citoplasmática que leva a um fenômeno pelo qual os embriões que são provenientes do cruzamento de fêmeas não infectadas com machos infectados não eclodam (HOFFMANN et al., 2011; SCHMIDT et al., 2017). Nesse contexto, a implementação de uma vacina eficaz e de baixo custo torna-se uma medida de alta prioridade para a saúde pública (GHOSH; DAR, 2015).

## 2.9 Imunopatogenia

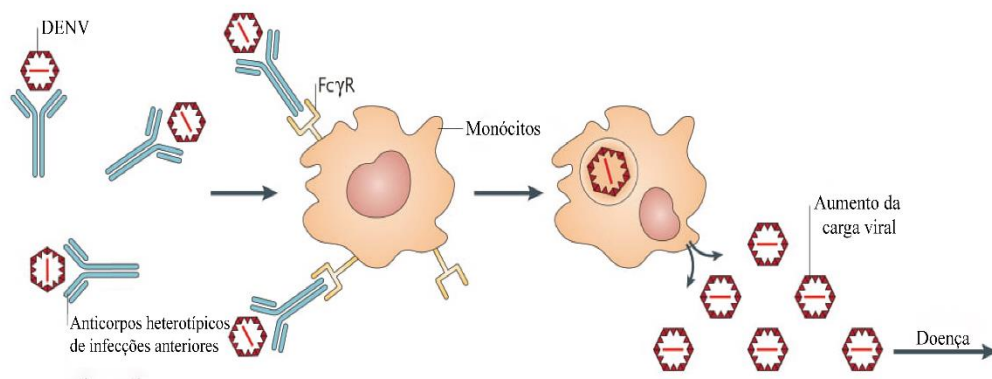
A alta variedade nas manifestações clínicas sugere que existem diversos fatores que atuam em conjunto podendo levar à gravidade da doença. Como por exemplo, os genótipos e sorotipos virais, infecções sequenciais, fatores genéticos do hospedeiro, idade e comorbidades (YACOUB; MONGKOLSAPAYA; SCREATION, 2013).

A Teoria da Virulência afirma que o potencial patogênico pode variar em diferentes cepas dos quatro sorotipos (ROSEN, 1977).

Enquanto que a Teoria Integral (1987) formula que o desenvolvimento de febre hemorrágica da dengue e síndrome do choque da dengue estava associado a três fatores de risco: o primeiro seria fatores epidemiológicos, como a densidade de mosquitos *Aedes aegypti* e a circulação de sorotipos, o segundo fator inclui o vírus, sua virulência e o sorotipo infectante, por fim, os fatores que envolvem as particularidades de cada indivíduo, como por exemplo, a idade, sexo, raça, doenças crônicas e a preexistência de anticorpos para dengue (BRAVO; GUZMÁN; KOURI, 1987).

A Teoria Sequencial surgiu no começo da década de 70, onde a febre hemorrágica da dengue e, principalmente, a síndrome do choque da dengue, era produzida por um mecanismo imunopatológico desencadeado por uma segunda infecção por um sorotipo diferente, durante um certo período crítico de tempo após uma infecção inicial por dengue (HALSTEAD, 1970, 2003). Halstead e colaboradores (1988), trazem o fenômeno *ADE* (em inglês *antibody-dependent enhancement*) ou facilitação dependente de anticorpos, para tentar explicar os mecanismos imunológicos que levam a progressão para a FHD/SCD. Segundo essa teoria, em uma infecção secundária por sorotipos diferentes, a presença de anticorpos específicos para o sorotipo primário se liga ao sorotipo secundário, mas não podem neutralizá-lo ou sua capacidade de neutralização seja diminuída, por não possuírem avides ou títulos suficientes para essa neutralização. Os vírus formam um complexo (vírus + anticorpo) e utilizam a porção Fc (reconhedores de fragmentos cristalizados de anticorpos) dos anticorpos que está ligada ao envelope para assim se ligar a outra porção Fc presente na membrana dos macrófagos. Dessa maneira, os macrófagos internalizam os vírus não neutralizados e são infectados, aumentando assim a infecção (Figura 7) (GUZMÁN et al., 2002; HALSTEAD, 1979, 1988; HALSTEAD; O'ROURKE, 1977a, 1977b; LY et al., 2018; MONGKOLSAPAYA et al., 2006; MORENS, 1994; NGONO; SHRESTA, 2018; WHITEHEAD et al., 2007).

**Figura 7 – Modelo da replicação viral através da facilitação dependente de anticorpos.**



Fonte: Adaptado de Whitehead, 2007.

Nota: O aumento da replicação do vírus ocorre quando um anticorpo heterotípico não neutralizante presente no hospedeiro proveniente de uma infecção primária pelo DENV se liga a uma partícula infectante de DENV durante uma infecção secundária heterotípica, mas não consegue neutralizar o vírus. Em vez disso, o complexo anticorpo+vírus liga-se aos receptores Fcγ (FcγR) nos monócitos circulantes, facilitando a entrada do vírus na célula. O resultado é um aumento na replicação do vírus, levando a doença mais grave.

A fisiopatologia da severidade da dengue é multifatorial e consiste no equilíbrio entre o sistema imune do hospedeiro e seus aspectos genéticos e dos fatores virais o que poderá contribuir para o desfecho da doença. Os possíveis mecanismos que podem levar a patogênese incluem anticorpos preexistentes que podem mediar o *ADE*; ativação do sistema complemento, células T e B, ativação das células do sistema imune inato durante o curso da infecção e por fim, a produção de auto-anticorpos (GUZMAN; HARRIS, 2015). Pessoas que experienciam uma segunda infecção por um sorotipo diferente da primeira infecção possuem maior risco de desenvolver FHD, sugerindo que uma imunidade preexistente pode fazer com que haja uma resposta exacerbada ao vírus (WAHALA; DE SILVA, 2011).

## 2.10 Resposta Imune a Dengue

Em resposta a diferentes tipos de infecções são liberadas citocinas com respostas  $T_h1$  e  $T_h2$  por células  $CD4^+$ . A resposta  $T_h1$  (celular ou tipo 1) produz interferon- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$ , sendo responsável pelas reações inflamatórias. Por outro lado, a resposta  $T_h2$  (humoral ou tipo 2) secreta IL-4, IL-5, IL6, IL-10 e IL-13, ajudando na produção de anticorpos pelas células B e diminuindo a inflamação, porque possuem atividade anti-inflamatória. Em ambas, pode-se observar a produção de IL-3 e TNF- $\alpha$  (CHATURVEDI et al., 1999a, 2000; KUMAR et al., 2012; MOSMANN et al., 1986; MOSMANN; SAD, 1996; MUNDER et al., 1999). A regulação cruzada da resposta  $T_h1$  e  $T_h2$  é necessária para manter a homeostase no organismo, quando há uma expressão descontrolada de citocinas na resposta imune pode resultar na progressão de doenças (MANEEKAN et al., 2013).

Na infecção pelo vírus da dengue, os infectados podem desenvolver diferentes expressões da resposta  $T_h1$  e  $T_h2$  influenciando no desfecho da doença. A IL6 promove uma resposta  $T_h2$  e inibe uma resposta  $T_h1$  (DIEHL; RINCÓN, 2002). No estudo de Chaturvedi e colaboradores (1999b) foi observado a presença da resposta  $T_h1$  em pacientes com febre da dengue e  $T_h2$  em casos de dengue hemorrágica grau IV. Também foi visto que a resposta  $T_h1$  estava presente durante os três primeiros dias e a partir do quarto dia houve predominância da resposta  $T_h2$  e os níveis de IL6 estavam altos no grupo de febre hemorrágica. O aumento na transcrição (*upregulation*) de citocinas  $T_h2$  está associado com a progressão de casos de dengue (HALSEY et al., 2016).

No entanto, alguns estudos não encontraram associação do tipo  $T_h2$  com a gravidade da doença, mas sim um papel protetor contra o desenvolvimento da dengue com complicações e

uma resposta exacerbada do tipo  $T_{h1}$  pode estar envolvida na progressão da dengue (KADHIRAVAN et al., 2010; MABALIRAJAN et al., 2005).

O óxido nítrico, por sua vez, inibe a produção de citocinas de resposta  $T_{h1}$ , como IL-2 e IFN- $\gamma$ , enquanto favorece a resposta  $T_{h2}$  com a secreção de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL6, IL-10 e TNF- $\alpha$  (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003; MUKHOPADHYAY; NAIR; HASNAIN, 2008; SHRESHTHA et al., 2018). Um estudo observou que houve uma maior produção de óxido nítrico em células  $T_{h1}$  do que  $T_{h2}$  (TAYLOR-ROBINSON et al., 1994). Semelhante resultado foi visto no estudo de Munder e colaboradores (1999) que relataram que as células e citocinas  $T_{h1}$  induzem a iNOS, enquanto  $T_{h2}$  suprime iNOS. Tanto o papel do óxido nítrico como da interleucina 6 nas respostas  $T_{h1}$  e  $T_{h2}$  ainda não está claro, sendo necessário mais estudos para compreender os seus comportamentos no sistema imune.

## 2.11 Citocinas

As citocinas possuem um papel importante durante a infecção por dengue, pois são liberadas por diferentes células como consequência da ativação do sistema imune. As citocinas são um grupo diverso de pequenas proteínas que são secretadas por células que tem por finalidade promover a sinalização e comunicação intercelular. Possuem atividades parácrinas, autócrinas e endócrinas, através de ligação a receptores, podendo assim induzir uma diversidade de respostas dependendo da célula alvo e da citocina. Dentre as muitas funções que as citocinas apresentam pode-se citar: o controle da proliferação e diferenciação celular e atuação nas respostas do sistema imune e no processo inflamatório (FANG et al., 2012; TISONCIK et al., 2012).

Citocinas são produzidas por diferentes tipos celulares e mostram atividades sobrepostas, como por exemplo, regulação da proliferação ou diferenciação, dependendo do tipo e do estado de desenvolvimento das células-alvo (SCHELLER et al., 2011). São induzidas por estímulos específicos, como por exemplo, produtos bacterianos e são responsáveis pela estimulação e diferenciação de vários tipos de células e também pelo controle de produção de outras citocinas (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997).

A mudança repentina da produção de citocinas está presente em pacientes com febre hemorrágica da dengue/síndrome do choque da dengue (GUZMAN; HARRIS, 2015). Níveis séricos elevados de citocinas como a IL-2, IL6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  têm sido correlacionados com o desenvolvimento e agravamento do quadro clínico de dengue (BUTTHEP et al., 2012; HALSTEAD, 2012; MANGIONE et al., 2014;

SRIKIATKHACHORN; GREEN, 2010). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias estão elevados antes e depois do extravasamento de plasma em pacientes com FHD (ROTHMAN, 2011). Esses pacientes possuem uma maior produção de citocinas (ROTHMAN, 2010).

O aumento da transcrição (*upregulation*) das respostas imunes, em especial a ativação de citocinas, é essencial para controlar a replicação viral, no entanto, um excesso de citocinas pode resultar em um aumento da inflamação e progressão da doença. Estudos anteriores mostraram que há um perfil aumentado de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com dengue e febre hemorrágica da dengue ou dengue com sinais de alerta (MASOOD et al., 2018).

Os níveis elevados de citocinas tornam-se bons preditores da gravidade da doença. Uma estimativa dos níveis de citocinas no primeiro contato pode fornecer uma pista sobre a probabilidade do paciente desenvolver manifestações graves de dengue ou não (SEHRAWAT et al., 2018).

## 2.12 Interleucina 6

As interleucinas são uma família diversa de reguladores do sistema imunológico que agem principalmente na diferenciação e ativação de células imunes. Elas podem ser anti ou pró-inflamatórias. A designação de interleucinas foi criada para se referir as citocinas secretadas pelos leucócitos que tem por funcionalidade a comunicação celular, no entanto, sabe-se hoje que as interleucinas são produzidas por vários tipos de células (TISONCIK et al., 2012).

A Interleucina 6 (IL6) é constituída de 212 aminoácidos e seu gene está localizado no cromossomo 7p21 (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014) é secretada por células T, macrófagos, células *Natural killers* e células endoteliais que são ativadas para estimular a resposta imune inata (MANGIONE et al., 2014; TANAKA et al., 2016). Promove a diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> naïve, tendo uma importante função em ligar a resposta imune inata à resposta imune adquirida. Ademais, também contribui para a diferenciação de células B e produção de anticorpos (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; SCHELLER et al., 2011; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). Possui um papel crucial na defesa do hospedeiro, uma vez que, ativa hepatócitos, células imunocompetentes e células hematológicas para produzir respostas de fase aguda, imunológica e hematológica que são essenciais para a eliminação de agentes infecciosos (TANAKA et al., 2016).

Esta citocina não pode ser considerada pró-inflamatória típica, porque além de exibir propriedades pró-inflamatórias, como por exemplo, a maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e ativação de células T, possui também propriedade anti-

inflamatórias visto que inibe a síntese da Interleucina-1 (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) em resposta a vários estímulos (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997; RACHMAN; RINALDI, 2006). Além disso, é um potente mediador da febre e reações agudas na dengue e também está envolvida em casos de coagulopatia (MANGIONE et al., 2014; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009; MASOOD et al., 2018; RACHMAN; RINALDI, 2006).

### 2.13 Óxido Nítrico

Em 1980, um estudo demonstrou que o relaxamento vascular induzido por acetilcolina foi dependente da presença de células do endotélio e evidenciou que este efeito foi mediado por uma substância, a qual ainda não havia sido identificada (FURCHGOTT, 1981; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Mais tarde, esta substância foi chamada de fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF) (CHERRY et al., 1982). Subsequentemente, em 1987, pesquisas mostraram que o EDRF possuía propriedades químicas e biológicas similares ao óxido nítrico (IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Desse modo, o EDRF tornou-se conhecido como óxido nítrico.

Os primeiros indícios que óxido nítrico (ON) tem como precursor a L-arginina surgiram no final dos anos 1980. Em 1988, Schmidt e colaboradores, sugeriram que o precursor do óxido nítrico era a arginina, neste mesmo ano, outro grupo de pesquisadores sugeriram que a L-arginina seria o precursor da síntese de ON nas células endoteliais vasculares (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988).

Em 1989, foi descoberto que ON é dependente de cálcio  $Ca^{2+}$  (MAYER et al., 1989). Porém, outro estudo demonstrou que o óxido nítrico pode ser tanto cálcio dependente (encontrada no cérebro de ratos e porcos) como independente (encontrada em macrófagos da medula óssea) (MÜLSCH; BASSENGE; BUSSE, 1989).

O óxido nítrico é uma molécula bioativa gasosa que pode ser encontrada na atmosfera, possui um radical livre que pode reagir com outros radicais livres, por esse motivo pode se tornar altamente tóxica. Além disso, é um importante mensageiro intercelular (BRUCKDORFER, 2005; FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; PAUTZ et al., 2010; XUE et al., 2018). A produção de óxido nítrico nos mamíferos é sintetizada por uma enzima, a óxido nítrico sintase (NOS) e a reação converte a L-arginina em óxido nítrico e no seu subproduto L-citrulina (BRUCKDORFER, 2005; HIBBS; TAINTOR; VAVRIN, 1987; MINHAS; BANSAL;

BANSAL, 2019; MONCADA; HIGGS, 1991; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1989; PAPAPETROPOULOS; RUDIC; SESSA, 1999).

O óxido nítrico pode atuar no metabolismo e neurotransmissão muscular, regular a contração das células musculares lisas e do tecido vascular. Pode levar à vasodilatação e redução da resistência vascular sistêmica, levando a hipotensão, choque e a morte. Atua também na morte celular e inibe a agregação plaquetária (LEVINE; PUNIHAOLE; LEVINE, 2012; TRAIRATVORAKUL et al., 2005). Possui também um papel ambíguo na resposta imune a patógenos. Por um lado, pode matar microrganismos e tem um efeito protetor, por outro, pode causar danos aos tecidos e células (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; XUE et al., 2018). Em doses ideais, tem ação protetora e reguladora nas células, mas concentrações mais altas têm efeitos tóxicos. Nas infecções virais, pode inibir a replicação viral ou causar mutação viral e no hospedeiro pode causar danos nas células (TRAIRATVORAKUL et al., 2005).

Existem três isoformas da enzima óxido nítrico sintase: neuronal, induzível e endotelial. Possuem aproximadamente 60% de semelhança de seus aminoácidos e similares estruturas primárias. Isso sugere um gene ancestral comum de NOS (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; AÑEZ; VALERO; MOSQUERA, 2007; PAPAPETROPOULOS; RUDIC; SESSA, 1999; XUE et al., 2018). A isoforma neuronal (nNOS, NOS1 ou tipo I) e a endotelial (eNOS, NOS3 ou tipo III) são chamadas de constitutivas, pois são constituintes de células saudáveis, ademais, suas atividades são dependentes dos níveis de cálcio (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; MINHAS; BANSAL; BANSAL, 2019; VALLANCE, 1999). A isoforma tipo I (localizada no cromossomo 12) está presente nos neurônios e células epiteliais e a isoforma III (localizada no cromossomo 7) está presente no endotélio vascular, sendo um potente inibidor de adesão e agregação plaquetária na parede vascular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; PAUTZ et al., 2010; VALLANCE, 1999; XU et al., 1994).

A isoforma induzível (iNOS, NOS2 ou tipo II) está localizada no cromossomo 7q11.2-q12 (PAUTZ et al., 2010; XU et al., 1994) e sua atividade não é dependente dos níveis de cálcio (KLEINERT et al., 2004; RODEBERG et al., 1995). É um componente importante do sistema imune, sendo responsável pela inibição da replicação viral através da produção de ON (RODEBERG et al., 1995; WINK et al., 2011). Pode ser produzida por uma variedade de tipos celulares, principalmente macrófagos, através de estímulos induzidos por lipopolissacarídeos bacterianos, citocinas e outros agentes (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; KLEINERT et al., 2004; MINHAS; BANSAL; BANSAL, 2019; VALLANCE, 1999; XUE et al., 2018). Nas infecções virais, pode ser induzida pela replicação viral ou por citocinas, como por exemplo, o

interferon- $\gamma$  (CHATURVEDI; NAGAR, 2009). Esses estímulos são responsáveis pela transcrição ou expressão da iNOS. Uma vez que iNOS é expressa, pode manter os níveis de ON por um longo tempo (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; WINK et al., 2011). A atividade da isoforma tipo II é regulada primariamente pelo processo de transcrição e tradução (MINHAS; BANSAL; BANSAL, 2019; WEINBERG, 1998). A superprodução de óxido nítrico tem sido relacionado com a regulação positiva de iNOS (MINHAS; BANSAL; BANSAL, 2019; MURPHY, 1999; PAUTZ et al., 2010; VALLANCE, 1999).

## 2.14 Polimorfismos

Polimorfismos genéticos são mudanças que ocorrem na sequência do DNA entre indivíduos, grupos ou populações (ISMAIL; ESSAWI, 2012). Polimorfismo de nucleotídeo único ou *SNP* (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) caracteriza-se como uma variação do genoma, podendo ocorrer em um ou poucos nucleotídeos e que se distingue de outras raras variações por apresentar uma frequência populacional de pelo menos 1%. O interesse na pesquisa sobre polimorfismos pode contribuir para o avanço do entendimento da genética humana (BROOKES, 1999). Os *SNPs* podem ser encontrados em regiões codificantes (éxons) que podem trazer consequências para função e estrutura de proteínas, mas a maioria dos *SNPs* são encontrados em regiões não-codificadoras (íntrons) que podem afetar a regulação do gene ou podem não ter nenhuma consequência biológica (KNIGHT et al., 2003; OLLIER, 2004). *SNPs* em genes de citocinas podem alterar sua função e até mesmo seus níveis de transcrição (KESHAVARZ et al., 2019). Uma única mudança de aminoácido em uma citocina ou seu receptor, por exemplo, pode levar a alterações ou perda de funções (OLLIER, 2004).

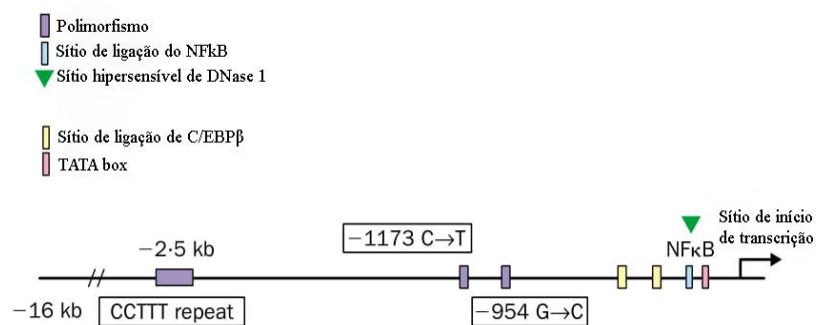
Recentemente, vários estudos tem investigado a associação de polimorfismos em genes de citocinas com a susceptibilidade a infecção pelo vírus da dengue, como por exemplo, a *IL-10* (SANTOS et al., 2017), *TNF- $\alpha$*  (ALAGARASU et al., 2015; CHUANSUMRIT et al., 2013) e *IFN- $\gamma$*  (FEITOSA et al., 2016). Além disso, polimorfismo no gene da enzima óxido nítrico sintase endotelial foi associado com um papel protetor no desenvolvimento de casos graves da doença (DOS SANTOS et al., 2019).

Além disso, diferentes polimorfismos foram descritos na região promotora do gene da *iNOS* e da *IL6* que estão relacionadas com várias doenças (JIMÉNEZ-SOUSA et al., 2017; PAUTZ et al., 2010; SHANG et al., 2017). Os polimorfismos presentes na região promotora podem afetar o nível do produto genético, enquanto na região codificadora pode alterar a atividade do produto. A presença de polimorfismos na região regulatória pode afetar a interação



do fator de transcrição (FT) com o local de ligação ao fator de transcrição que está próximo da região promotora, desse modo, pode influenciar a expressão do gene e, portanto, a suscetibilidade/resistência à diversas doenças (QIDWAI; JAMAL, 2010). O gene *iNOS* possui polimorfismos na região codificadora e reguladora (Figura 8). O estudo de *SNP*'s no gene *iNOS* e *IL6* é uma ferramenta importante para compreender o papel desses genes no desenvolvimento da infecção pelo vírus da dengue e aumentar o conhecimento da fisiopatologia da doença.

**Figura 8 – Diagrama esquemático dos primeiros 2500 pares de base (pb) do promotor *iNOS*.**



Fonte: Adaptado de Hobbs et al., 2002.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral:**

Investigar a relação dos polimorfismos (-1173 C/T) no gene da enzima óxido nítrico sintase induzível e (T15A) no gene da interleucina 6 com a infecção da dengue e progressão da doença.

#### **3.2 Específicos:**

- 1 Identificar as frequências alélicas e genotípicas do SNP do gene da enzima óxido nítrico induzível sintase em pacientes infectados pelo vírus da dengue (FD e FHD) e controles saudáveis;
- 2 Analisar a associação entre o SNP do gene da enzima óxido nítrico sintase induzível com a infecção e progressão da dengue;
- 3 Identificar as frequências alélicas e genotípicas do SNP do gene da interleucina 6 em pacientes infectados pelo vírus da dengue (FD e FHD) e controles saudáveis;
- 4 Analisar a associação entre o SNP do gene da interleucina 6 com a infecção e progressão da dengue.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Aspectos éticos e desenho do estudo

O tipo de estudo utilizado no desenvolvimento desta pesquisa foi de caso-controle. As análises moleculares ocorreram no Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica (LABMEG), vinculado à Universidade Federal de Alagoas - *campus* Arapiraca.

Este estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) sob o parecer número: 1.073.204 (ANEXO A). Todos os indivíduos que participaram do estudo receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e autorizaram sua participação na pesquisa (ANEXO B).

### 4.2 População e local de estudo

O estudo foi realizado no município de Arapiraca, estado de Alagoas, Brasil, onde quatro grupos foram formados para esse estudo: DEN (febre da dengue + febre hemorrágica da dengue), febre da dengue, febre hemorrágica da dengue e controle. O local de coleta de amostras de sangue periférico do grupo febre da dengue ocorreu no Laboratório Municipal de Arapiraca. Os indivíduos com suspeita de dengue que procuraram o atendimento nos centros de saúde eram encaminhados para o Laboratório Municipal de Arapiraca para a confirmação laboratorial de infecção pelo vírus da dengue. A identificação laboratorial foi realizada pelo teste imunológico ELISA (Panbio® Dengue IgM Capture ELISA, Brasil).

Os pacientes que apresentaram algum tipo de complicação e que foram hospitalizados na instituição filantrópica Nossa Senhora do Bom Conselho (Hospital Regional de Arapiraca) durante os anos de 2010 a 2015 foram incluídos no grupo febre hemorrágica da dengue. O recrutamento deu-se com base na análise das fichas de notificação compulsória presentes no Hospital Regional de Arapiraca. Após a identificação e organização dos dados de acordo com as manifestações clínicas e laboratoriais (trombocitopenia  $<80.000$  plaquetas/mm<sup>3</sup>) e confirmação laboratorial de infecção registradas nas fichas foram iniciadas as coletas de material biológico que ocorreram nas residências dos pacientes. A classificação de casos utilizada nas instituições de saúde foi segundo os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde no ano de 1997 (OMS, 1997).

O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis que não relataram sinais clínicos de dengue e/ou hospitalização por dengue e que aceitaram participar da pesquisa. A coleta de amostras de sangue periférico ocorreu na Universidade Federal de Alagoas. Todos os

indivíduos realizaram um teste laboratorial para a presença do vírus da dengue através do teste imunológico ELISA (*Panbio*® *Dengue IgM Capture ELISA*, Brasil) e o teste rápido (*Abon-Bioeasy* Diagnóstica, Brasil). Os testes foram realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas Dr. Edler Lins.

### 4.3 Extração

A extração do DNA genômico foi realizada de duas formas: para os grupos caso e controle foi realizada a extração a partir de sangue periférico coletado em tubos contendo a solução anticoagulante EDTA de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial (*Qiagen FlexiGene*® *DNA Handbook*, Qiagen, Alemanha e *Wizard*® *Genomic DNA*, Brasil).

Para os pacientes pertencentes ao grupo febre hemorrágica da dengue, a extração do material genético foi realizada a partir da coleta de células da mucosa oral, através de esfregaço com escova do tipo *Cytobrush*. A extração de DNA foi obtido através da utilização de NaCl, tampão TES (Tris HCl 10 mM pH 7,6; EDTA 1 mM; SDS 0,6%), etanol (70%), etanol absoluto (100%), TE (Tris HCl 10 mM; EDTA 0,1 mM) e proteinase K diluída, adaptado do protocolo de Abrão *et al.*, 2005. Resultando em 50ng/mL de DNA. A coleta com o swab foi utilizada para facilitar a adesão dos indivíduos à pesquisa.

Todas as amostras foram quantificadas e avaliadas quanto a sua concentração e pureza por meio da técnica de espectrofotometria, no equipamento *BioPhotometer plus* (*Eppendorf*® *AG, Hamburg, Germany*). A razão das absorbâncias foi observada nos comprimentos de onda 260 e 280nm (nanômetro) e as que estiveram compreendidas entre 1,7 e 1,9 apresentaram uma pureza do DNA maior.

### 4.4 Eletroforese

A integridade das amostras de DNA foi avaliada através da técnica eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando tampão TAE (Tris mmoles/L, acetato e EDTA a 1mmol/L com pH 8,0). A migração do material genético na cuba eletroforética foi realizada a 100V, 60mA por 60 minutos em cuba horizontal com fonte LPS 1000V (*Loccus biotecnologia*®, Brasil). Para referência em relação ao tamanho molecular do DNA foi utilizado um marcador de 100 pares de base (pb) (*Invitrogen*® *Corporation, USA*). Após a coloração com brometo de etídio (mg/mL), as bandas de DNA foram visualizadas por luz ultravioleta e documentadas através do sistema de captura de imagem para verificar a integridade do material genético (*Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil*).

#### 4.5 Genotipagem

A identificação dos genótipos dos polimorfismos nos genes da *iNOS* (-1173 C/T; rs8292799) e da citocina *IL6* (T15A; rs13306435) foram determinados pela técnica de reação de cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), aplicando o método de discriminação alélica. As reações foram realizadas utilizando o ensaio com sondas *TaqMan* (*Applied Biosystem*®, Califórnia, USA). As amostras de DNA diluídas foram amplificadas através de uma reação de qPCR com um volume final de 10 µL, contendo 5 µL de solução *TaqMan Genotyping Master Mix* (*Applied Biosystems*®, Califórnia, USA); 0,125 µL de sonda referente ao SNP escolhido e 4,87 µL de cada amostra. As amplificações foram executadas no equipamento *ABI StepOne plus* da *Applied Biosystems*® sob as seguintes condições: 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 92 °C por 15s e 60 °C por 1min. Em todas as reações um controle negativo (reação com apenas reagentes, sem a adição de amostra de DNA) e um controle positivo (amostra de DNA com o polimorfismo identificado) foram utilizados. Os resultados das reações foram fornecidos pelo *software* do equipamento mostrando as curvas de amplificação da discriminação alélica de cada participante do estudo.

#### 4.6 Análise estatística

As frequências genotípicas e alélicas foram organizadas manualmente no *Microsoft*® *Office Excel*. A análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg da população em estudo foi realizada por meio do Teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com valor de *p* pela calculadora do laboratório Court. As análises das correlações entre as frequências alélicas e genotípicas em relação à susceptibilidade à infecção foi realizada pelo programa *BioEstat 5.3*, utilizando o Teste Exato de Fisher. As associações genotípicas e alélicas foram obtidas utilizando os valores de OR (do inglês *Odds Ratio* e em português Razão de Chance (RC)) com Intervalo de Confiança (IC) de 95%, onde  $OR < 1$  indica proteção e  $OR > 1$  indica risco. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. O poder da amostra foi calculado com o uso do *software* gratuito *G\*power 3.1* (ERDFELDER et al., 2009; FAUL et al., 2007). Um valor de no mínimo 80% é o necessário para se ter um bom poder amostral (PATINO; FERREIRA, 2016). Para ilustração dos resultados das frequências alélicas e genotípicas e respectivas associações foi utilizada a classificação tradicional (1997) de casos de dengue (FD, FHD e SCD) formulada pela Organização Mundial da Saúde.

## 5. RESULTADOS

O estudo foi composto por um total de 179 indivíduos, sendo 27 pertencentes ao grupo febre da dengue, 33 ao grupo febre hemorrágica da dengue e 119 compondo o grupo controle. As frequências genotípicas tanto da *IL6* ( $\chi^2 = 0.29, p > 0.58$ ) como da *iNOS* ( $\chi^2 = 0.012, p > 0.90$ ) estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

### 5.1 Frequência genotípica e alélica do SNP do gene *IL6*

A tabela 1 apresenta as frequências genotípicas e alélicas referentes ao polimorfismo da interleucina 6. Na análise da frequência genotípica observou-se que o genótipo T/T apresentou a maior prevalência em todos os grupos em investigação: DEN (90%), FD (88.9%), FHD (91%) e controles (93.3%). Nenhum grupo apresentou o genótipo A/A. Quanto à distribuição alélica do polimorfismo T15A (*rs13306435*), o alelo T foi o mais frequente em todos os grupos.

O poder da amostra para o estudo desse polimorfismo na comparação entre o grupo DEN vs GC foi de 21%; FD vs GC foi de 39%; já entre os grupos FHD vs GC foi de 12%; e por fim, entre os grupos FD vs FHD foi de 9%.

**Tabela 1 – Distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo T15A (*rs13306435*) do gene da Interleucina 6 na população estudada.**

		N (Frequência %)				EHW	
		DEN	FD	FHD	GC	$\chi^2 (p)$	
<i>IL6</i> T15A ( <i>rs13306435</i> )	Genótipo	T/T	54 (90%)	24 (88,9%)	30 (91%)	111 (93,3%)	0,29 (0,58)
		T/A	6 (10%)	3 (11,1%)	3 (9%)	8 (6,7%)	
		A/A	0	0	0	0	
	Alelo	T	114 (95%)	51 (94,4%)	63 (95,5%)	230 (96,6%)	
		A	6 (5%)	3 (5,6%)	3 (4,5%)	8 (3,4%)	

Fonte: Autor da pesquisa, 2021.

Nota: DEN: febre da dengue + febre hemorrágica da dengue; FD: febre da dengue; FHD: febre hemorrágica da dengue; GC: grupo controle; EHW: Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Na tabela 2 estão presentes as associações alélicas e genotípicas do polimorfismo T15A do gene da *IL6*. Não foi encontrada diferença na distribuição alélica e genotípica entre os grupos estudados.

**Tabela 2 – Associação alélica e genotípica do polimorfismo T15A (*rs13306435*) do gene da Interleucina 6 na população estudada.**

	DEN vs GC		FHD vs FD		FD vs GC		FHD vs GC	
	OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>	OR (95% IC)	<i>p</i>
T	1,00	0,64	1,00	0,86	1,00	0,71	1,00	0,93
A	1,51 (0,51-4,46)		0,80 (0,15-4,18)		1,69 (0,43-6,59)		1,36 (0,35-5,31)	
T/T	1,00	0,56	1,00	1,00	1,00	0,43	1,00	0,70
T/A	1,54 (0,51-4,67)		0,80 (0,15-4,33)		1,73 (0,43-7,02)		1,39 (0,35-5,55)	

Fonte: Autor da pesquisa, 2021.

Nota: DEN: febre da dengue + febre hemorrágica da dengue; FD: febre da dengue; FHD: febre hemorrágica da dengue; GC: grupo controle.

## 5.2 Frequência genotípica e alélica do *SNP* do gene *iNOS*.

A tabela 3 apresenta as frequências genotípicas e alélicas referentes ao polimorfismo do gene da enzima óxido nítrico sintase induzível. A análise mostrou que o genótipo C/C apresentou a maior prevalência em todos os grupos em investigação: DEN (98.3%), FD (100%), FHD (93.9%) e controles (99.2%). Nenhum grupo apresentou o genótipo T/T. Quanto à distribuição alélica do polimorfismo -1173 (*rs9282799*), o alelo C foi o mais frequente em todos os grupos.

O poder da amostra para o estudo desse polimorfismo na comparação entre o grupo DEN vs GC foi de 78%; FD vs GC foi de 13%; já entre os grupos FHD vs GC foi de 99%; e por fim, entre os grupos FD vs FHD não foi possível analisar por falta do alelo T na amostra do grupo FD.

**Tabela 3 – Distribuição das frequências genotípicas do polimorfismo -1173 (rs9282799) do gene da iNOS na população estudada.**

		N (Frequência %)				EHW	
		DEN	FD	FHD	GC	$\chi^2$ (p)	
<i>iNOS</i> -1173 (rs9282799)	Genótipo	C/C	58 (96,6%)	27 (100%)	31 (93,9%)	118 (99,2%)	0,012 (0,90)
		C/T	2 (3,4%)	0	2 (6,1%)	1 (0,8%)	
		T/T	0	0	0	0	
	Alelo	C	118 (98,3%)	54 (100%)	64 (97%)	237 (99,6%)	
		T	2 (1,7%)	0	2 (3%)	1 (0,4%)	

Fonte: Autor da pesquisa, 2021.

Nota: DEN: febre da dengue + febre hemorrágica da dengue; FD: febre da dengue; FHD: febre hemorrágica da dengue; GC: grupo controle; EHW: Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

Na tabela 4 estão presentes as associações alélicas e genotípicas do polimorfismo -1173 do gene da *iNOS*. Não foi encontrada diferença na distribuição alélica e genotípica entre os grupos estudados.

**Tabela 4 – Associação alélica e genotípica polimorfismo -1173 (rs9282799) do gene da iNOS na população estudada.**

	DEN vs GC		FHD vs FD		FD vs GC		FHD vs GC	
	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p
C	1,00	0,54	1,00	-*	1,00	0,41	1,00	0,23
T	4,01 (0,36-44,75)		-*		0,00 (-)		7,40 (0,66-82,98)	
C/C	1,00	0,26	1,00	0,49	1,00	1,00	1,00	0,12
C/T	4,07 (0,36-45,80)		NA (0,00-NA)		0,00 (0,00-NA)		7,61 (0,67-86,72)	

Fonte: Autor da pesquisa, 2021.

Nota: DEN: febre da dengue + febre hemorrágica da dengue; FD: febre da dengue; FHD: febre hemorrágica da dengue; GC: grupo controle.

\*: Não foi possível calcular por ausência do alelo T em um dos grupos.



## 6. DISCUSSÃO

O estudo de polimorfismos pode ser considerado uma importante ferramenta no prognóstico para o reconhecimento no panorama genético dos indivíduos que pode levar ao conhecimento da suscetibilidade de certos grupos ou populações a desenvolver determinada doença (KELADA et al., 2003). Além disso, a variação da resposta imunológica pode ser resultante de polimorfismos e estar associada com casos mais graves de dengue. Neste estudo, foi avaliada a associação dos polimorfismos *IL6* T15A (rs13306435) e *iNOS* C-1173T (rs9282799) na suscetibilidade à progressão da dengue.

### 6.1 *IL6* +15 T>A (rs13306435)

A Interleucina 6 possui diversos papéis na dengue, sendo um deles, gene candidato do sistema imune que pode estar envolvido na patogênese e na persistência dos sintomas (DETTOGNI et al., 2015). Alguns estudos mostraram que altos níveis de *IL6* estão presentes no estágio inicial dos sintomas e envolvidos com o desenvolvimento da forma mais grave (BUTTHEP et al., 2012; PRIYADARSHINI et al., 2010; RATHAKRISHNAN et al., 2012). Além disso, altos níveis de *IL6* foram associados com pacientes com FHD e infectados pelo sorotipo DENV-2 (DE LA CRUZ HERNÁNDEZ et al., 2016). Pressupõe-se que altos níveis de *IL6* no início da infecção podem se tornar marcadores prognósticos para progressão para um quadro mais grave e parecem desempenhar um papel na patogênese da doença (PRIYADARSHINI et al., 2010). Além disso, pode ter um papel no desenvolvimento do extravasamento plasmático (EPPY et al., 2016). E o *ADE* pode aumentar a produção dessa citocina (CHAREONSIRISUTHIGUL; KALAYANAROOJ; UBOL, 2007).

Os polimorfismos presentes na região promotora do gene da *IL6* podem resultar em variações na transcrição e expressão. Desse modo, as variações genéticas podem influenciar na suscetibilidade a várias doenças (TERRY; LOUKACI; GREEN, 2000). Um estudo brasileiro que avaliou o polimorfismo na posição -174 G/C no gene da *IL6* não encontrou associação com a infecção pelo vírus da dengue (CANSANÇÃO et al., 2016). No entanto, em outro estudo realizado também na população brasileira foi encontrada uma associação do alelo C no SNP -174 G/C e a persistência de sintomas dermatológicos (prurido, exantema, petéquias, alopecia, sangramento na gengiva) na dengue, porém não houve associação com a persistência dos sintomas (DETTOGNI et al., 2015). A frequência do genótipo G/A na região rs2069843 foi significativamente maior em pacientes com febre hemorrágica da dengue do que naqueles com febre da dengue, quando ajustados para o componente genético ancestral africano e europeu na

população colombiana (AVENDAÑO-TAMAYO et al., 2017). Em um estudo realizado no Brasil envolvendo o polimorfismo localizado na posição -634 C/G não foi encontrada nenhuma associação da frequência dos genótipos e alelos do polimorfismo com a dengue (FEITOSA et al., 2016). Um estudo avaliou o nível de expressão da IL6 em pacientes com dengue e constatou que houve uma maior expressão de IL6 em pacientes com um quadro de dengue hemorrágica (KANWAL et al., 2017).

O polimorfismo T15A está localizado no éxon 5, sua variação muda a tradução da proteína, o códon GAT para asparagina transforma-se para GAA da glutamina (GUAN et al., 2020; NOPONEN-HIETALA et al., 2005). Poucos estudos têm avaliado a possível relação desse polimorfismo do gene da *IL6* na posição T15A em doenças. Em uma meta-análise que avaliava os níveis de expressão gênica e o polimorfismo no gene da *IL6* e *IL10* e a sua relação com degeneração do disco lombar, não encontrou nenhuma relação do T15A com a doença (GUAN et al., 2020).

Um estudo realizado na Coreia do Sul avaliou se polimorfismos presentes em citocinas poderiam influenciar na taxa de transporte de soluto peritoneal em pacientes em diálise peritoneal encontrando um resultado associativo do genótipo T/A com a diminuição dos níveis de creatinina (HWANG et al., 2009). Outro estudo em uma população chinesa avaliou pacientes com níveis de alto e baixo transporte de pequenos solutos através da membrana peritoneal e mostrou que o genótipo T/A estava negativamente associado com o alto transporte peritoneal. O alto transporte peritoneal tem sido associado com uma baixa taxa de sucesso no tratamento de diálise peritoneal (DING et al., 2016). Em ambos os estudos, não houve a presença do genótipo A/A.

Estudos mostram que variações genéticas no gene da *IL6* podem influenciar na susceptibilidade à doença arterial coronariana (DAC). Nesse sentido, uma pesquisa realizada na Rússia investigou o polimorfismo T15A e não encontrou associação do mesmo com a DAC. A distribuição genotípica nessa população mostrou uma predominância do genótipo T/T tanto no grupo DAC como no grupo controle. O genótipo heterozigoto mostrou uma frequência de 3,03%. Não havendo a presença do genótipo A/A (MITROKHIN et al., 2017). Semelhante com o nosso resultado, onde também não houve a presença do genótipo A/A. Na população do continente americano a frequência do alelo T é 92,2% e do alelo A é 7,8% (NCBI, 2021a). A baixa frequência do alelo A pode explicar a ausência do genótipo A/A nessa pesquisa.

Uma meta-análise que visava identificar polimorfismos no gene da *IL6* envolvidos na susceptibilidade ao câncer colorretal não encontrou nenhuma associação do polimorfismo estudado tanto nas comparações entre genótipos como em modelos gênicos (YU et al., 2012).

No presente estudo, nenhum dos genótipos analisados apresentou associação com a infecção por dengue. É importante destacar que não há estudos que envolvam o referido polimorfismo e sua relação com as arboviroses, sendo uma delas, a dengue. São necessárias mais pesquisas com um número amostral maior para compreender o seu papel, uma vez que, o poder estatístico em todos os grupos foi baixo, não representando a população.

## **6.2 *iNOS* -1173 C>T (rs9282799)**

Vários estudos têm mostrado associações entre o óxido nítrico e a dengue. No entanto, resultados diferentes podem ser encontrados. Altos níveis de óxido nítrico foram encontrados em pacientes com febre da dengue, enquanto em pacientes com febre hemorrágica da dengue os níveis foram baixos. Isso sugere que altos níveis de óxido nítrico podem ter um papel protetor para o desenvolvimento das formas mais graves (CARVALHO et al., 2014; VALERO et al., 2002).

Altos níveis de ON podem ser benéficos durante a dengue por causa da sua atividade antiviral, no entanto, pode induzir a um quadro mais grave da doença por poder ser prejudicial às células endoteliais (AÑEZ; VALERO; MOSQUERA, 2007; CARVALHO et al., 2014). Um estudo sugere que o efeito antiviral do óxido nítrico pode prevenir o quadro hemorrágico na febre da dengue ao prevenir danos endoteliais por citocinas de macrófagos/monócitos e a ativação de células T (LEVY et al., 2010). O óxido nítrico inibe a replicação viral do sorotipo 2 e tem um papel protetor na fase aguda da dengue (MALAVIGE; OGG, 2017; TAKHAMPUNYA; PADMANABHAN; UBOL, 2006).

Altos níveis de óxido nítrico foram observados em pacientes venezuelanos com febre da dengue e associados com a febre hemorrágica da dengue (LEVY et al., 2010). O estudo de Matsuura et al., 2012 demonstrou que a produção de ON nas plaquetas estava alta em pacientes acometidos pela FHD e contribuiu para sinais característicos desse quadro. A síntese de óxido nítrico nas plaquetas foi associada com diminuição da agregação plaquetária em pacientes com febre da dengue. Altos níveis da produção de ON estão associadas a inibição da agregação plaquetária, o que pode predispor pacientes com FD para aumento do sangramento (MENDES-RIBEIRO et al., 2008).

O aumento da biodisponibilidade vascular do ON estava associado ao desenvolvimento de FHD (THEIN *et al.*, 2015). Quando comparado os níveis de óxido nítrico entre os diferentes graus de dengue foi visto que pacientes com um quadro de FD e SCD tiveram altos níveis de ON do que FHD I e II (TRAIRATVORAKUL et al., 2005). Além disso, foi visto que altas

concentrações de IL6 foram acompanhadas por altos níveis de ON, sugerindo que a IL6 pode estar envolvida direta ou indiretamente no aumento dos níveis dessa molécula (LEVY et al., 2010).

Neves-Souza *et al.*, 2005 demonstrou pela primeira vez em seu estudo a presença de iNOS em monócitos de pacientes infectados pelo vírus da dengue, porém a expressão de iNOS não pode ser associada com a severidade da doença. No estudo de Fialho *et al.*, 2017 foi visto que a iNOS é ativada nos subconjuntos de monócitos CD16<sup>-</sup> e CD16<sup>+</sup>, podendo exercer efeitos antivirais e modular respostas imunológicas exacerbadas durante a dengue. Além disso, a iNOS tem um importante papel no controle da carga viral na dengue.

A isoforma induzível tem um importante papel no controle da replicação viral. A expressão de NOS2 estava aumentada durante a infecção por dengue e sua expressão é controlada pela produção de interferon- $\gamma$  (FAGUNDES et al., 2011). Além disso, células endoteliais infectadas pela dengue expressam iNOS (YEN et al., 2008).

O polimorfismo -1173 C>T da *iNOS* está presente na região promotora, dessa forma podendo influenciar a expressão do seu gene (BIBERT et al., 2017). A alteração de C para T cria um novo sítio de reconhecimento de sequência para os fatores de transcrição GATA-1 ou GATA-2. A ligação desses fatores a sequências específicas de DNA pode ser responsável por aumentar a transcrição dos promotores na posição -1173 (LEONIDOU et al., 2020). Poucos estudos têm sido encontrados na literatura que abordem o papel do polimorfismo da *iNOS* nesta posição.

Os escassos estudos com esse polimorfismo se concentram principalmente na malária. Essa doença é causada por um protozoário do gênero *Plasmodium*, transmitida pelo mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (GOMES et al., 2011). Três estudos realizados no continente africano (Camarões, Tanzânia e Mali) não encontraram nenhuma associação do referido polimorfismo com a malária (APINJOH et al., 2014; LEVESQUE et al., 2010; TOURE et al., 2012). No entanto, outro estudo realizado na África (Tanzânia e Quênia) mostrou que as chances de desenvolver malária eram 88% menores em indivíduos com o genótipo T/T e C/T do que aqueles com o genótipo C/C. Este polimorfismo estava associado significativamente com proteção contra o desenvolvimento de malária cerebral e anemia grave e com o aumento da produção de óxido nítrico. Além disso, a distribuição genotípica foi 92,7% para C/C, 6,7% C/T e 0,6% T/T (HOBBS et al., 2002). O estudo realizado por Kumar et al., 2018 investigou a influência do polimorfismo -1173C>T na infecção tanto por *Plasmodium falciparum* como por *Plasmodium vivax* em uma população indiana, esse polimorfismo mostrou uma frequência de

25,27% e 23,52% do alelo T, respectivamente. Os genótipos C/T, T/T e a combinação C/T+T/T estavam associados com a malária em ambos os grupos.

Um estudo realizado em Gana mostrou uma associação entre a úlcera de Buruli e o polimorfismo no gene da *iNOS*. Além disso, a distribuição genotípica foi 85% para C/C, 14% C/T e 1% T/T. Indivíduos com o alelo T tinham um maior risco de desenvolver a doença, pois esse alelo está associado com a diminuição da atividade da *iNOS*, assim causando a diminuição da produção de óxido nítrico (BIBERT et al., 2017).

Em uma população chinesa foi analisado a associação do presente polimorfismo com o vitiligo. A frequência dos genótipos para o grupo caso foi 76,6% para C/C; 21,5% para C/T e 1,9% para T/T e não foi encontrada associação com o risco de desenvolver vitiligo (ZHANG et al., 2011).

Uma pesquisa conduzida na Grécia com indivíduos que possuem osteoartrite não encontrou nenhuma associação do polimorfismo estudado e também nenhum genótipo C/T e T/T. Sugerindo que o alelo C é predominante na população grega (LEONIDOU et al., 2020). Semelhante resultado foi encontrado neste estudo, onde o genótipo C/C e o alelo C foram predominantes na população alagoana. Na população do continente americano a frequência do alelo C é 99,6% e do alelo T é 0,4% (NCBI, 2021b), a baixa frequência do alelo T pode explicar a ausência do genótipo T/T nessa pesquisa.

No presente estudo, nenhum dos genótipos analisados apresentou associação com a infecção por dengue. Apesar de estudos mostrarem o envolvimento entre o óxido nítrico e a dengue, principalmente com os níveis dessa molécula, o papel dos polimorfismos ainda não foi elucidado. O poder estatístico foi considerado satisfatório não sendo necessário o aumento do número amostral dessa população para este polimorfismo.

Vale a pena ressaltar que não há estudos dos polimorfismos supracitados e o seu envolvimento com a infecção por dengue, o que torna o presente trabalho uma pesquisa inédita. Embora os resultados não apresentaram associação com a doença, mesmo nos grupos que obtiveram um poder estatístico acima de 80%, mais estudos devem ser realizados para melhor compreender o seu papel na infecção pelo vírus da dengue.

A maior limitação do presente estudo foi o recrutamento de pacientes, por este motivo, obtivemos um pequeno número amostral. Com os resultados desta pesquisa almeja-se contribuir para uma melhor compreensão do papel da *iNOS* e *IL6* na Dengue.

## **7. CONCLUSÃO**

1. O alelo T e o genótipo T/T foram os mais frequentes para o SNP *IL6* T15A;

2. Não houve associação do SNP *IL6* T15A com a infecção pelo vírus da dengue e progressão da doença;
3. O alelo C e o genótipo C/C foram os mais frequentes para o SNP *iNOS* -1173 C/T;
4. Não houve associação do SNP *iNOS* -1173 C/T com a infecção pelo vírus da dengue.

## REFERÊNCIAS

- ABRÃO, M. G. et al. Standardization of DNA extraction with NaCl from oral mucosa cells: application in PROP1 gene study. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 49, n. 6, p. 978–982, 2005.
- ACHEE, N. L. et al. A Critical Assessment of Vector Control for Dengue Prevention. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1–19, 2015.
- AGUIRRE-OBANDO, O. A. et al. Contrasting patterns of insecticide resistance and knockdown resistance (kdr) in *Aedes aegypti* populations from Jacarezinho (Brazil) after a Dengue Outbreak. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 1, p. 94–100, 2016.
- ALAGARASU, K. et al. Association of combinations of interleukin-10 and pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms with dengue hemorrhagic fever. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 130–136, 2015.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593–615, 2001.
- AMÂNCIO, F. F. et al. Dengue virus serotype 4 in a highly susceptible population in Southeast Brazil. **Journal of Infection and Public Health**, v. 7, n. 6, p. 547–552, 2014.
- ANDERSON, C. R.; DOWNS, W. G. Isolation of Dengue Virus from a Human Being in Trinidad Epidemics. **Science**, v. 124, p. 224–225, 1956.
- AÑEZ, G.; VALERO, N.; MOSQUERA, J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of dengue. **Dengue Bulletin**, v. 31, p. 118–123, 2007.
- APINJOH, T. O. et al. Association of candidate gene polymorphisms and TGF-beta/IL-10 levels with malaria in three regions of Cameroon: A case-control study. **Malaria Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2014.
- AVENDAÑO-TAMAYO, E. et al. Variantes en los genes TNFA, IL6 e IFNG asociadas con la severidad del dengue en una muestra de población colombiana. **Biomedica**, v. 37, n. 4, p. 1–42, 2017.
- BARBOSA, I. R. et al. Epidemiologia do dengue no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, 2000 a 2009. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 21, n. 1, p. 149–157, 2012.
- BARRETO, M. L. .; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e

contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53–72, jul. 2008.

BARTENSCHLAGER, R.; MILLER, S. Molecular aspects of Dengue virus replication. **Future Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 155–165, 2008.

BASTOS, M. DE S. et al. Simultaneous circulation of all four dengue serotypes in Manaus, State of Amazonas, Brazil in 2011. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 393–394, 2012.

BESERRA, E. B. et al. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia, Sér. Zool.**, v. 99, n. 3, p. 281–285, 2009.

BHAT, V. G. et al. Challenges in the laboratory diagnosis and management of dengue infections. **Open Microbiology Journal**, v. 9, p. 33–37, 2015.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

BIBERT, S. et al. Susceptibility to *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) is associated with IFNG and iNOS gene polymorphisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–10, 2017.

BINH, P. T. et al. Early clinical and biological features of severe clinical manifestations of dengue in Vietnamese adults. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, n. 4, p. 276–280, 2009.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response - Nature Immunology. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907–916, 2001.

BOLDESCU, V. et al. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: Dengue, Zika and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 8, p. 565–586, 2017.

BRAGA, C. et al. Seroprevalence and risk factors for dengue infection in socio-economically distinct areas of Recife, Brazil. **Acta Tropica**, v. 113, n. 3, p. 234–240, 2010.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. ARTIGO DE REVISÃO *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil\* *Aedes aegypti*: History of Control in Brazil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 16, n. 2, p. 113–118, 2007.

BRASIL, M. DA S. **Descrição da doença**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue/descricao-da-doenca>>. Acesso em: 8 ago. 2020.



BRASIL, M. DA S. **Boletim epidemiológico - 23**. Disponível em:

<[https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/junho/21/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_23.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/junho/21/boletim_epidemiologico_svs_23.pdf)>. Acesso em: 29 jun. 2021a.

BRASIL, M. DA S. **Boletim epidemiológico -14**. Disponível em:

<[https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/maio/14/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_17-5-1.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/maio/14/boletim_epidemiologico_svs_17-5-1.pdf)>. Acesso em: 25 maio. 2021b.

BRAVO, J. R.; GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. P. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? I. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 816–820, 1987.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177–186, 1999.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 1- 2 SPEC. ISS., p. 3–31, 2005.

BUTTHEP, P. et al. Alteration of cytokines and chemokines during febrile episodes associated with endothelial cell damage and plasma leakage in dengue hemorrhagic fever. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 31, n. 12, p. 232–238, 2012.

CANSANÇÃO, I. F. et al. Association of Polymorphisms in IL1b -511C>T, IL1RN 86 bp VNTR, and IL6 -174G>C Genes with Clinical Dengue Signs and Symptoms in Brazilian Dengue Patients. **Viral Immunology**, v. 29, n. 6, p. 372–376, 2016.

CAREY DONALD. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 26, n. 3, p. 243 – 262, 1971.

CARVALHO, D. M. et al. Elevated dengue virus nonstructural protein 1 serum levels and altered toll-like receptor 4 expression, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production in dengue hemorrhagic fever patients. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2014, 2014.

CEDILLO-BARRÓN, L. et al. Antibody response to dengue virus. **Microbes and Infection**, v. 16, n. 9, p. 711–720, 2014.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico: Revisão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.

- 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. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 2, p. 365–375, 2007.
- CHATCHEN, S.; SABCHAREON, A.; SIRIVICHAYAKUL, C. Serodiagnosis of asymptomatic dengue infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 11–14, 2017.
- CHATURVEDI, U. C. et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. **Journal of Medical Virology**, v. 59, n. 3, p. 335–340, 1999a.
- CHATURVEDI, U. C. et al. Shift from a Th1-type response to Th2-type in dengue haemorrhagic fever. **Current Science**, v. 76, n. 1, p. 63–69, 1999b.
- CHATURVEDI, U. C. et al. Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: Implications for pathogenesis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 183–188, 2000.
- CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: Necessity or nuisance? **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 9–24, 2009.
- CHAWLA, P.; YADAV, A.; CHAWLA, V. Clinical implications and treatment of dengue. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 3, p. 169–178, 2014.
- CHAWLA, T. et al. Dengue Virus Neutralization in Cells Expressing Fc Gamma Receptors. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.
- CHERRY, P. D. et al. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 6, p. 2106–2110, 1982.
- CHIU, W.-W.; KINNEY, R. M.; DREHER, T. W. Control of Translation by the 5'- and 3'-Terminal Regions of the Dengue Virus Genome. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8303–8315, 2005.
- CHOI, Y. et al. Effects of weather factors on dengue fever incidence and implications for interventions in Cambodia. **BMC Public Health**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.

CHRISTIE, J. Remarks on -'kidinga pepo": A peculiar form of exan-thematous disease. **British Medical Journal**, v. 1, n. 596, p. 577–579, 1872.

CHRISTIE, J. On epidemics of Dengue fever: their diffusion and etiology. **The Indian Medical Gazette**, p. 27–28, 1882.

CHRISTOPHERS, S. R. **Aedes Aegypti (L.): the yellow fever mosquito**. 1 ed. ed. New York: The Syndics of the Cambridge University Press, 1960.

CHUANSUMRIT, A. et al. Tumour necrosis factor gene polymorphism in dengue infection: association with risk of bleeding. **Paediatrics and International Child Health**, v. 33, n. 2, p. 97–101, 2013.

CLARKE, D. H.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 7, n. 5, p. 561–573, 1957.

CODEÇO, C. T. et al. Seasonal dynamics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in the northernmost state of Brazil: A likely port-of-entry for dengue virus 4. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 614–620, 2009.

CORDEIRO, M. T. Laboratory diagnosis for dengue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 54, n. SUPPL.18, p. 10–12, 2012.

COSTA, V. V. et al. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: Protection versus disease induction. **American Journal of Pathology**, v. 182, n. 6, p. 1950–1961, 2013.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, p. 155–170, 2015.

CUCUNAWANGSIH; LUGITO, N. P. H. Trends of dengue disease epidemiology. **Virology: Research and Treatment**, v. 8, 2017.

CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. R. The immunopathology of dengue and Zika virus infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 48, p. 1–6, 2017.

CURFS, J. H. A. J.; MEIS, J. F. G. M.; HOOBKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–780, 1997.

- CUSTÓDIO, J. M. DE O. et al. Abiotic factors and population dynamic of aedes aegypti and aedes albopictus in an endemic area of dengue in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 61, n. April 2018, p. 1–9, 2019.
- DE CASTRO, F. P. et al. Ciclos de vida comparados de Aedes aegypti (Diptera, Culicidae) do semiárido da Paraíba. **Iheringia - Serie Zoologia**, v. 103, n. 2, p. 118–123, 2013.
- DE LA CRUZ HERNÁNDEZ, S. I. et al. Primary dengue virus infections induce differential cytokine production in Mexican patients. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 3, p. 161–167, 2016.
- DENNIS NORMILE. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. **Science**, n. October, p. 415, 2013.
- DETTOGNI, R. S. et al. Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons. **Human Immunology**, v. 76, n. 10, p. 717–723, 2015.
- DICK, O. B. et al. Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584–593, 2012.
- DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 9, p. 531–536, 2002.
- DING, L. et al. Possible role of IL-6 and TIE2 gene polymorphisms in predicting the initial high transport status in patients with peritoneal dialysis: An observational study. **BMJ Open**, v. 6, n. 10, p. 1–6, 2016.
- DONG, T. et al. High pro-inflammatory cytokine secretion and loss of high avidity cross-reactive cytotoxic T-cells during the course of secondary dengue virus infection. **PLoS ONE**, v. 2, n. 12, p. 1–12, 2007.
- DOS SANTOS, A. C. M. et al. Association of polymorphisms in serotonin and nitric oxide genes with clinical outcome of dengue in Brazilian northeast population. **Acta Tropica**, v. 190, p. 144–148, 2019.
- DUONG, V. et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 47, p. 14688–93, 2015.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–12, 2014.

EHRENKRANZ, N. J. et al. Pandemic dengue in Caribbean countries and the Southern United States - Past, Present and Potential problems. **The New England Journal of Medicine**, v. 283, n. 26, p. 1460–1469, 1971.

ENDY, T. P. et al. Determinants of inapparent and symptomatic dengue infection in a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, 2011.

EPPY et al. The Differences Between Interleukin-6 and C-reactive Protein Levels Among Adult Patients of Dengue Infection with and without Plasma Leakage. **Acta medica Indonesiana**, v. 48, n. 1, p. 3–9, 2016.

ERDFELDER, E. et al. Statistical power analyses using G\*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. **Behavior Research Methods**, v. 41, n. 4, p. 1149–1160, 2009.

ESTADO DE ALAGOAS, S. DE E. DA S. DE A. **Cenário Epidemiológico das Arboviroses em Alagoas, 2018**. Disponível em: <[www.saude.al.gov.br/wp-content/uploads/2019/02/Cenário-Epidemiológico-das-Arboviroses-em-Alagoas-nº-01-SE-01-a-52.20181.pdf](http://www.saude.al.gov.br/wp-content/uploads/2019/02/Cenário-Epidemiológico-das-Arboviroses-em-Alagoas-nº-01-SE-01-a-52.20181.pdf)>. Acesso em: 8 ago. 2020.

FAGUNDES, C. T. et al. IFN- $\gamma$  production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, 2011.

FANG, X. et al. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 134–146, 2012.

FARES, R. C. G. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

FAUL, F. et al. G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior Research Methods**, v. 39, n. 2, p. 175–191, 2007.

FEITOSA, R. N. M. et al. Gene Polymorphisms and Serum Levels of Pro- and Anti-Inflammatory Markers in Dengue Viral Infections. **Viral Immunology**, v. 29, n. 7, p. 379–

388, 2016.

FIALHO, L. G. et al. Induced nitric oxide synthase (iNOS) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) detection in circulating monocyte subsets from Brazilian patients with Dengue-4 virus. **Virology Reports**, v. 7, p. 9–19, 2017.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Identification of Brazilian flaviviruses by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using Flavivirus universal primers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 357–362, 1998.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian flaviviruses. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 13, p. 1643–1649, 2000.

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000.

FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 7, p. 1369–1376, 1998.

FORATTINI, O. P. Identification of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) in Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 20, n. 3, p. 244–245, 1986.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

FURCHGOTT, R. F. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 2, n. C, p. 173–176, 1981.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

GHOSH, A.; DAR, L. Dengue vaccines: Challenges, development, current status and prospects. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 3–15, 2015.

GOMES, A. P. et al. Malária grave por *Plasmodium falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 3, p. 358–369, set. 2011.

- GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, p. 429–436, 2006.
- GROVE, J.; MARSH, M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. **Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 7, p. 1071–1082, 2011.
- GUABIRABA, R.; RYFFEL, B. Dengue virus infection: Current concepts in immune mechanisms and lessons from murine models. **Immunology**, v. 141, n. 2, p. 143–156, 2014.
- GUAN, Y. et al. Gene polymorphisms and expression levels of interleukin-6 and interleukin-10 in lumbar disc disease: A meta-analysis and immunohistochemical study. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2020.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480–496, 1998.
- GUBLER, D. J. Dengue / dengue haemorrhagic fever : history and current status. **New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases: Novartis Foundation Symposium.**, v. 277, p. 3–22, 2006.
- GUZIK, T. J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 469–487, 2003.
- GUZMÁN, M. et al. Dengue, one of the great emerging health challenges of the 21st century. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, n. 5, p. 511–520, 2004.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue : a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 0, p. s7-16, 2010a.
- GUZMAN, M. G. et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. 2–11, 2010b.
- GUZMÁN, M. G. et al. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, n. 4, p. 223–227, 2002.
- GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453–465, jan. 2015.
- GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S. The complexity of antibody-dependent enhancement of

dengue virus infection. **Viruses**, v. 2, n. 12, p. 2649–2662, 2010.

GYAWALI, N.; BRADBURY, R. S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. The epidemiology of dengue infection: Harnessing past experience and current knowledge to support implementation of future control strategies. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 53, n. 4, p. 293–304, 2016.

HADINEGORO, S. R. S. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? **Paediatrics and International Child Health**, v. 32, n. sup1, p. 33–38, 2012.

HALSEY, E. S. et al. Symptoms and Immune Markers in Plasmodium/Dengue Virus Co-infection Compared with Mono-infection with Either in Peru. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2016.

HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 350–362, 1970.

HALSTEAD, S. B. In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. **Journal of Infectious Diseases**, v. 140, n. 4, p. 527–533, 1979.

HALSTEAD, S. B. Dengue haemorrhagic fever: a public health problem and a field for research. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 1, p. 1–21, 1980.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476–481, 1988.

HALSTEAD, S. B. Neutralization and Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Viruses. **Advances in Virus Research**, v. 60, p. 421–467, 2003.

HALSTEAD, S. B. Controversies in dengue pathogenesis. **Paediatrics and International Child Health**, v. 32, n. SUPP1, p. 5–9, 2012.

HALSTEAD, S. B.; O’ROURKE, E. . Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. **Nature**, v. 265, p. 739–741, 1977a.

HALSTEAD, S. B.; O’ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes: I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody\*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 1, p. 201–217, 1977b.



- HALSTEAD, S. B.; YAMARAT, C. Recent Epidemics of Hemorrhagic Fever in Thailand. Observations Related To Pathogenesis of a “New” Dengue Disease. **American journal of public health and the nation’s health**, v. 55, n. 9, p. 1386–1395, 1965.
- HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. . Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 131, n. 5, p. 1102–1103, 1960.
- HARAPAN, H. et al. Non-HLA gene polymorphisms and their implications on dengue virus infection. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 14, n. 1, p. 1–11, 2013.
- HEINZ. Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. **Virology**, v. 198, p. 109–117, 1994.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376–396, 1990.
- HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 473–476, 1987.
- HIDARI, K. I. P. J.; SUZUKI, T. Dengue virus receptor. **Tropical Medicine and Health**, v. 39, n. 4 SUPPL., p. 37–43, 2011.
- HINO, P. et al. Evolução temporal da dengue no município de Ribeirão Preto, São Paulo, 1994 a 2003. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 15, n. 1, p. 233–238, 2010.
- HOBBS, M. R. et al. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. **Lancet**, v. 360, n. 9344, p. 1468–1475, 2002.
- HOFFMANN, A. A. et al. Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, n. 7361, p. 454–459, 2011.
- HWANG, Y. H. et al. Effects of interleukin-6 T15A single nucleotide polymorphism on baseline peritoneal solute transport rate in incident peritoneal dialysis patients. **Peritoneal Dialysis International**, v. 29, n. 1, p. 81–88, 2009.
- IBÁÑEZ-BERNAL, S. et al. First record in America of Aedes albopictus naturally infected with dengue virus during the 1995 outbreak at Reynosa, Mexico. **Medical and veterinary**

**entomology**, v. 11, p. 305–309, 1997.

IBGE, I. B. DE G. E E. **Alagoas**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/al.html>>. Acesso em: 8 ago. 2020.

IGNARRO, L. J. et al. EDRF produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Medical Sciences**, v. 84, n. December, p. 9265–9269, 1987.

ISMAIL, S.; ESSAWI, M. Genetic polymorphism studies in humans. **Middle East Journal of Medical Genetics**, v. 1, n. 2, p. 57–63, 2012.

IVORY, M. O.; BIRCHALL, J. C.; PIGUET, V. Early dengue virus infection in human skin: A cycle of inflammation and infectivity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1711–1712, 2015.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and infection**, v. 12, n. 4, p. 272–9, 2010.

JESSIE, K. et al. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 8, p. 1411–1418, 2004.

JIMÉNEZ-SOUSA, M. A. et al. IL-6 rs1800795 polymorphism is associated with septic shock-related death in patients who underwent major surgery: a preliminary retrospective study. **Annals of Intensive Care**, v. 7, n. 1, 2017.

KADHIRAVAN, T. et al. Association of Intracellular T<sub>H</sub> 1-T<sub>H</sub> 2 Balance in CD4<sup>+</sup> T-cells and MIP-1 $\alpha$  in CD8<sup>+</sup> T-cells with Disease Severity in Adults with Dengue. **Immune Network**, v. 10, n. 5, p. 164, 2010.

KANWAL, F. et al. Interleukin-6: A promising disease severity index for dengue virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 7, n. 5, p. 266–269, 2017.

KATZELNICK, L. C. et al. Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. **Science**, v. 369, n. 6507, p. 1123–1128, 2020.

KATZELNICK, L. C.; COLOMA, J.; HARRIS, E. Dengue: Knowledge gaps, unmet needs and research priorities. **Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 139–148, 2017.

KELADA, S. N. et al. The role of genetic polymorphisms in environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 8, p. 1055–1064, 2003.

- KESHAVARZ, M. et al. Association of polymorphisms in inflammatory cytokines encoding genes with severe cases of influenza A/H1N1 and B in an Iranian population. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2019.
- KLEINERT, H. et al. Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 255–266, 2004.
- KNIGHT, J. C. et al. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. **Nature Genetics**, v. 33, n. 4, p. 469–475, 2003.
- KOTSAKIOZI, P. et al. Tracking the return of *Aedes aegypti* to Brazil, the major vector of the dengue, chikungunya and Zika viruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.
- KOURÍ, G.; GUZMÁN, M. G. .; BRAVO, J. HEMORRHAGIC dengue in Cuba: AN EPIDEMIC. **PAHO Bulletin**, v. 20, n. 1, p. 24–30, 1986.
- KUMAR, A. et al. iNOS polymorphism modulates iNOS/NO expression via impaired antioxidant and ROS content in *P. vivax* and *P. falciparum* infection. **Redox Biology**, v. 15, n. November 2017, p. 192–206, 2018.
- KUMAR, Y. et al. Serum Proteome and Cytokine Analysis in a Longitudinal Cohort of Adults with Primary Dengue Infection Reveals Predictive Markers of DHF. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, 2012.
- LEANDRO, C. DOS S. et al. Redução da incidência de dengue no Brasil em 2020: controle ou subnotificação de casos por COVID-19? **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. e76891110442, 2020.
- LEITMEYER, K. C. et al. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 73, n. 6, p. 4738–4747, 1999.
- LEONIDOU, A. et al. Association of Polymorphisms in the Promoter Region of NOS2A Gene with Primary Knee Osteoarthritis in the Greek Population. **Cureus**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2020.
- LEVESQUE, M. C. et al. Malaria severity and human nitric oxide synthase type 2 (NOS2) promoter haplotypes. **Human Genetics**, v. 127, n. 2, p. 163–182, 27 fev. 2010.
- LEVINE, A. B.; PUNIHAOLE, D.; LEVINE, T. B. Characterization of the role of nitric oxide

and its clinical applications. **Cardiology (Switzerland)**, v. 122, n. 1, p. 55–68, 2012.

LEVY, A. et al. 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**, v. 104, n. 1, p. 16–23, 2010.

LIMA, F. et al. Evaluation of the traditional and revised world health organization classifications of dengue cases in Brazil. **Clinics**, v. 68, n. 10, p. 1299–1304, 2013.

LORENZ, C.; AZEVEDO, T. S.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. COVID-19 and dengue fever: A dangerous combination for the health system in Brazil. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 35, n. 35, p. 101659, maio 2020.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. et al. *Aedes aegypti* from temperate regions of South America are highly competent to transmit dengue virus. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1–8, 2013.

LY, M. H. P. et al. Dengue virus infection-enhancement activity in neutralizing antibodies of healthy adults before dengue season as determined by using FcγR-expressing cells. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2018.

MABALIRAJAN, U. et al. Short report: TH2 immune response in patients with dengue during defervescence: Preliminary evidence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 6, p. 783–785, 2005.

MAHAPATRA, D. et al. NS1 antigen capture ELISA an effective method for diagnosis of early dengue infection - Report of an outbreak at Angul district, Odisha, India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 8, p. 8–10, 2014.

MAITRA, A. et al. Exploring deeper genetic structures: *Aedes aegypti* in Brazil. **Acta Tropica**, v. 195, n. April, p. 68–77, 2019.

MALAVIGE, G. N.; OGG, G. S. Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. **Immunology**, v. 151, n. 3, p. 261–269, 2017.

MANEEKAN, P. et al. T helper (Th) 1 and Th2 cytokine expression profile in dengue and malaria infection using magnetic bead-based bio-plex assay. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 44, n. 1, p. 31–36, 2013.

MANGIONE, J. N. A. et al. The association of cytokines with severe dengue in children.

**Tropical Medicine and Health**, v. 42, n. 4, p. 137–144, 2014.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: An integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564–581, 2009.

MASOOD, K. I. et al. Role of TNF  $\alpha$ , IL-6 and CXCL10 in dengue disease severity. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 202–207, 2018.

MATSUURA, C. et al. Nitric oxide activity in platelets of dengue haemorrhagic fever patients: The apparent paradoxical role of ADMA and l-NMMA. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 3, p. 174–179, 2012.

MAYER, B. et al. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: A cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells  $\text{Ca}^{2+}$ -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 164, n. 2, p. 678–685, 1989.

MCSHERRY, J. A. Some medical aspects of the darien scheme: Was it dengue? **Scottish Medical Journal**, v. 27, n. 2, p. 183–184, 1982.

MELINO, S.; PACI, M. Progress for dengue virus diseases: Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach. **FEBS Journal**, v. 274, n. 12, p. 2986–3002, 2007.

MENDES-RIBEIRO, A. C. et al. Dengue fever activates the L-arginine-nitric oxide pathway: An explanation for reduced aggregation of human platelets. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 10, p. 1143–1146, 2008.

MESSER, W. B. et al. Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 7, p. 800–809, 2003.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138–146, 2014.

MINHAS, R.; BANSAL, Y.; BANSAL, G. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. **Medicinal Research Reviews**, n. March, p. 1–33, 2019.

MITROKHIN, V. et al. Association between interleukin-6/6R gene polymorphisms and coronary artery disease in Russian population: Influence of interleukin-6/6R gene polymorphisms on inflammatory markers. **Journal of Inflammation Research**, v. 10, p.

151–160, 2017.

MONCADA, S.; HIGGS, E. . Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21, p. 361–374, 1991.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from l-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1709–1715, 1989.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. T Cell Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: Are Cross-Reactive T Cells Suboptimal? **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3821–3829, 2006.

MONTENEGRO, D. et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos da epidemia de dengue no Recife, PE, em 2002. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 9–13, 2006.

MORENS, D. M. Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 500–512, 1994.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v. 136, n. 7, p. 2348–2357, 1986.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 17, n. 3, p. 138–146, 1996.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.

MUKHOPADHYAY, S.; NAIR, S.; HASNAIN, S. Nitric Oxide: Friendly Rivalry in Tuberculosis. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 2, n. 2, p. 121–128, 2008.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C. I.; YOUNG, P. R. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. Suppl 2, p. S89–S95, 2017.

MÜLSCH, A.; BASSENGE, E.; BUSSE, R. Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: Evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 340, n. 6, p. 767–770, 1989.

- MUNDER, M. et al. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 7, p. 3771–7, 1999.
- MURPHY, M. P. Nitric oxide and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1411, n. 2–3, p. 401–414, 1999.
- MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, n. 1, p. 299–309, 2013.
- MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (denv-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67–70, 2015.
- NCBI, N. C. FOR B. I. **Reference SNP (rs13306435) report**. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs13306435?vertical\\_tab=true#frequency\\_tab](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs13306435?vertical_tab=true#frequency_tab)>. Acesso em: 8 ago. 2021a.
- NCBI, N. C. FOR B. I. **Reference SNP (rs9282799) report**. Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs9282799?vertical\\_tab=true#frequency\\_tab](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs9282799?vertical_tab=true#frequency_tab)>. Acesso em: 8 ago. 2021b.
- NEFF, J. M. et al. Throughout 1963 and 1964 , an illness serologically documented as a group B arbovirus infection and clinically resem- demic proportions in the Caribbean area . This epidemic was first recognized in Jamaica in the spring of 1963 and then in Puerto Rico in. v. 88, n. 1, p. 162–184, 1967.
- NEVES-SOUZA, P. C. F. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, p. 1–12, 2005.
- NGONO, A. E.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 1–30, 2018.
- NOGUEIRA, R. M. R. et al. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 2, p. 219–225, 1988.
- NOGUEIRA, R. M. R. et al. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 253, 1990.

- NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue Virus Type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925–926, 2001.
- NOGUEIRA, R. M. R.; ARAÚJO, J. M. G. DE; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 22, n. 5, p. 358–363, 2007.
- NOGUEIRA, R. M. R.; EPPINGHAUS, A. L. F. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: A challenge for epidemiological surveillance and control. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 255–256, 2011.
- NOGUEIRA, R. M. R.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, n. 1, p. 205–211, 2000.
- NOPONEN-HIETALA, N. et al. Genetic variations in IL6 associate with intervertebral disc disease characterized by sciatica. **Pain**, v. 114, n. 1–2, p. 186–194, 2005.
- OLLIER, W. E. R. Cytokine genes and disease susceptibility. **Cytokine**, v. 28, n. 4–5, p. 174–178, 2004.
- OMS, Organização Mundial. Da Saúde. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 1997.
- OMS, Organização Mundial Da Saúde. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. New ed. Geneva: World Health Organization Library, 2009.
- OMS, Organização Mundial Da Saúde. **Dengue and Severe**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 8 ago. 2020.
- OPAS, Organização Pan-Americana Da Saúde. **Dengue serotypes**. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/517-dengue-serotypes-en.html?start=3>>. Acesso em: 8 ago. 2020.
- OPAS, Organização Pan-Americana Da Saúde. **Reported cases of dengue fever in the Americas**. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html?start=1>>. Acesso em: 29 jun. 2021.
- OSANAI, C. H. et al. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota Prévia (\*). **Revista do**



**Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53–54, 1983.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S. .; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 16, p. 664–666, 1988.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.

PAPAPETROPOULOS, A.; RUDIC, R. D.; SESSA, W. C. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 3, p. 509–520, 1999.

PARKASH, O.; SHUEB, R. H. Diagnosis of dengue infection using conventional and biosensor based techniques. **Viruses**, v. 7, n. 10, p. 5410–5427, 2015.

PATINO, C. M.; FERREIRA, J. C. What is the importance of calculating sample size? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n. 2, p. 162–162, abr. 2016.

PAUTZ, A. et al. Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase. **Nitric Oxide**, v. 23, p. 75–93, 2010.

PEPIN, K. M. et al. Cost-effectiveness of novel system of mosquito surveillance and control, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 542–550, 2013.

PEREZ, A. B. et al. Tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor- $\beta$ 1, and interleukin-10 gene polymorphisms: Implication in protection or susceptibility to dengue hemorrhagic fever. **Human Immunology**, v. 71, n. 11, p. 1135–1140, 2010.

PONTES, R. J. .; RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos\*. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 3, p. 218–227, 1994.

POWELL, J. R.; GLORIA-SORIA, A.; KOTSAKIOZI, P. Recent history of *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records. **BioScience**, v. 68, n. 11, p. 854–860, 2018.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. August, p. 11–17, 2013.

PRIYADARSHINI, D. et al. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: A facility-based study. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010.

QIDWAI, T.; JAMAL, F. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene polymorphism and

- disease prevalence. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 72, n. 5, p. 375–387, 2010.
- RACHMAN, A.; RINALDI, I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. **Acta medica Indonesiana**, v. 38, n. 2, p. 105–108, 2006.
- RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2016.
- RATHAKRISHNAN, A. et al. Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–10, 2012.
- RIBEIRO NOGUEIRA, R. M. et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1376–1381, 2005.
- ROCHA, B. A. M. et al. Dengue-specific serotype related to clinical severity during the 2012/2013 epidemic in centre of Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2017.
- RODEBERG, D. A. et al. Nitric oxide: An overview. **The American Journal of Surgery**, v. 170, n. 3, p. 292–303, 1995.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773–2786, 2010.
- ROSEN, L. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 26, n. 3, p. 337–343, 1977.
- ROSS, T. M. Dengue virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 149–160, 2010.
- ROTHMAN, A. L. Dengue: Defining protective versus pathologic immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 946–951, 2004.
- ROTHMAN, A. L. Cellular Immunology of Sequential Dengue Virus Infection and its Role in Disease Pathogenesis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 338, n. 1, p. 83–98, 2010.
- ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: A tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532–543, 2011.
- RUSH, B. An account of the Bilious Remitting Fever, as it appeared in Philadelphia, in the

- summer and autumn of the year 1780. **American Journal of Medicine**, p. 546–550, 1951.
- SABA, H. et al. Spatio-temporal correlation networks of dengue in the state of Bahia. **BMC Public Health**, v. 14, p. 4–9, 2014.
- SABIN, A. B. RESEARCH ON DENGUE DURING WORLD WAR1. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. 1, p. 30–50, 1952.
- SALLES, T. S. et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **Para**, v. 11, p. 1–12, 2018.
- SANTOS, A. C. M. DOS et al. Association of TNFA (–308G/A), IFNG (+874 A/T) and IL-10 (–819 C/T) polymorphisms with protection and susceptibility to dengue in Brazilian population. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1065–1071, 2017.
- SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011.
- SCHMID, M. A.; DIAMOND, M. S.; HARRIS, E. Dendritic cells in dengue virus infection: Targets of virus replication and mediators of immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. DEC, p. 1–10, 2014.
- SCHMIDT, H. H. H. W. et al. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 2, p. 213–216, 1988.
- SCHMIDT, T. L. et al. Local introduction and heterogeneous spatial spread of dengue-suppressing Wolbachia through an urban population of *Aedes aegypti*. **PLoS Biology**, v. 15, n. 5, p. 1–28, 2017.
- SCHNEIDER, J.; DROLL, D. A timeline for dengue in the Americas to december 31, 2000 and noted first occurrences. **Pan American Health Organization (PAHO)**, p. 1–20, 2001.
- SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 12, p. 745–759, 2015.
- SEHRAWAT, P. et al. Role of cytokines as molecular marker of dengue severity. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 2–6, 2018.
- SHANG, Z. et al. Association of IL-6 -634C/G polymorphism and the risk of osteosarcoma in a chinese population. **Biomedical Research (India)**, v. 28, n. 22, p. 9761–9763, 2017.
- SHRESHTHA, S. et al. Nitric oxide: It's role in immunity. **Journal of Clinical and**

- Diagnostic Research**, v. 12, n. 7, p. BE01–BE05, 2018.
- SHU, P.; HUANG, J. Current Advances in Dengue. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 4, p. 642–650, 2004.
- SHUM, D. et al. High-content assay to identify inhibitors of dengue virus infection. **Assay and Drug Development Technologies**, v. 8, n. 5, p. 553–570, 2010.
- SIQUEIRA, J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 48–53, 2005.
- SOUZA, L. J. DE. **Dengue–diagnóstico, tratamento e prevenção**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora: Rubio, 2008.
- SRIKIATKHACHORN, A.; GREEN, S. Markers of Dengue Disease Severity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 338, n. 1, p. 67–82, 2010.
- TAKHAMPUNYA, R.; PADMANABHAN, R.; UBOL, S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 10, p. 3003–3011, 2006.
- TANAKA, T. et al. Regulation of IL-6 in immunity and diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 941, p. 79–88, 2016.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. v. 6, n. Kishimoto 1989, p. 1–16, 2014.
- TANTAWICHIEEN, T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever in adolescents and adults. **Paediatrics and International Child Health**, v. 32, n. SUPP1, p. 22–27, 2012.
- TAPIA-CONYER, R.; MÉNDEZ-GALVÁN, J. F.; GALLARDO-RINCÓN, H. The growing burden of dengue in Latin America. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. SUPPL. 2, p. S3, 2009.
- TAUIL, P. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil Critical aspects of dengue control in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, n. 3, p. 867–871, 2002.
- TAYLOR-ROBINSON, A. W. et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 4, p. 980–984, 1994.
- TEIXEIRA, M. D. G. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil : what

research is needed based on trends , surveillance , and control experiences ? Dengue e febre hemorrágica do dengue no Brasil : que tipo de pesquisas a sua tendência , vigilância e experiências. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 5, p. 1307–1315, 2005.

TEIXEIRA, M. G. et al. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 25 Suppl 1, p. S7-18, 2009.

TERRY, C. F.; LOUKACI, V.; GREEN, F. R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 24, p. 18138–18144, 2000.

THEIN, T. L. et al. Association between increased vascular nitric oxide bioavailability and progression to dengue hemorrhagic fever in adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 5, p. 711–714, 2015.

TISONCIK, J. R. et al. Into the Eye of the Cytokine Storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 16–32, 2012.

TOURE, O. et al. Candidate Polymorphisms and Severe Malaria in a Malian Population. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 5–10, 2012.

TRAIRATVORAKUL, P. et al. Serum nitric oxide in children with dengue infection. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 23, n. 2–3, p. 115–119, 2005.

TUISKUNEN BÄCK, A.; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses – an overview. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 3, n. 1, p. 19839, 2013.

VALERO, N. et al. Short report: Increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 6, p. 762–764, 2002.

VALLANCE, P. Nitric Oxide and arginine. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 9, p. 31–35, 1999.

VAN DER MEIDE, P. H.; SCHELLEKENS, H. Cytokines and the immune response. **Cytokine Yearbook Volume 1**, p. 243–249, 1996.

VICENTE, C. R. et al. Serotype influences on dengue severity: A cross-sectional study on 485 confirmed dengue cases in Vitória, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.

WAHALA, W. M. P. B.; DE SILVA, A. M. The human antibody response to dengue virus

infection. **Viruses**, v. 3, n. 12, p. 2374–2395, 2011.

WEINBERG, J. B. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: A review. **Molecular Medicine**, v. 4, n. 9, p. 557–591, 1998.

WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518–528, 2007.

WILDER-SMITH, A. et al. Dengue. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 350–363, 2019.

WINK, D. A. et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 6, p. 873–891, 2011.

WRIGHT, W. F.; PRITT, B. S. Update: The diagnosis and management of dengue virus infection in North America. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 3, p. 215–220, 2012.

WU, S. J. L. et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. **Nature Medicine**, v. 6, n. 7, p. 816–820, 2000.

XU, W. et al. **Mapping of the genes encoding human inducible and endothelial nitric oxide synthase (nos2 and nos3) to the pericentric region of chromosome 17 and to chromosome 7, respectively** **Genomics**, 1994.

XUE, Q. et al. Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

YACOUB, S.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. The pathogenesis of dengue. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 284–289, 2013.

YAP, G.; SIL, B. K.; NG, L. C. Use of saliva for early dengue diagnosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, 2011.

YEN, Y.-T. et al. 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**, v. 82, n. 24, p. 12312–12324, 2008.

YU, Y. et al. IL6 gene polymorphisms and susceptibility to colorectal cancer: A meta-analysis and review. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 8, p. 8457–8463, 2012.

YUNG, C. F. et al. Dengue serotype-specific differences in clinical manifestation, laboratory

parameters and risk of severe disease in adults, Singapore. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 5, p. 999–1005, 2015.

ZHANG, Y. et al. Analysis of inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms in vitiligo in Han Chinese people. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, 2011.

## ANEXO

## ANEXO A – Parecer de aprovação pelo Comitê de ética e pesquisa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Polimorfismo genético dos pacientes com dengue no estado de Alagoas e a sua relação com a infecção e progressão da doença

**Pesquisador:** Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 1

**CAAE:** 18558913.1.0000.5013

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Alagoas

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE ALAGOAS

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 405.940

**Data da Relatoria:** 04/10/2013

## Apresentação do Projeto:

Infecções pelo vírus da dengue ocorrem em mais de 100 países. A infecção pode causar dengue clássica (DF), que se caracteriza por um estado febril, ou pode progredir para uma dengue hemorrágica (DHF) caracterizada por manifestações como a síndrome hemorrágica de choque na dengue (DSS). Esse é um estudo de casos e controles que busca demonstrar, a exemplo de outros já realizados, a relação entre os polimorfismos genéticos no sistema imune inato humano e respostas diferenciais à infecção ocasionada pelo Vírus da dengue, de forma que estejam associados com uma maior susceptibilidade a esta infecção, promovendo uma progressão mais grave para a doença. Os pacientes e casos controle do estudo serão do agreste alagoano. A genotipagem será realizada utilizando combinação entre reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise dos fragmentos gerado por enzimas de restrição (PCR-RFLP). O foco do estudo será os genes do Fator de necrose tumoral, IL-10 e complemento (C3 e C4). Todos os resultados serão analisados e publicados com o intuito de gerar e ampliar competência científica em grupo de pesquisa em polimorfismos.

## Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

**Endereço:** Campus A . C Simões Cidade Universitária

**Bairro:** Tabuleiro dos Martins

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**Fax:** (82)3214-1700

**E-mail:** comitedeeticafal@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALAGOAS



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Polimorfismo genético dos pacientes com dengue no estado de Alagoas e a sua relação com a infecção e progressão da doença

**Pesquisador:** Elaine Virgínia Martins de Souza Figueiredo

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 1

**CAAE:** 18558913.1.0000.5013

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Alagoas

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE ALAGOAS

### DADOS DA NOTIFICAÇÃO

**Tipo de Notificação:** Outros

**Detalhe:** PRORROGAÇÃO DO TEMPO DE COLETA E INCLUSÃO DE METODOLOGIA

**Justificativa:** A coleta das amostras no laboratório municipal está no cronograma até o mês de

**Data do Envio:** 03/04/2015

**Situação da Notificação:** Parecer Consubstanciado Emitido

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.073.204

**Data da Relatoria:** 05/05/2015

### Apresentação da Notificação:

Infecções pelo vírus da dengue ocorrem em mais de 100 países. A infecção pode causar dengue clássica (DF), que se caracteriza por um estado febril, ou pode progredir para uma dengue hemorrágica (DHF) caracterizada por manifestações como a síndrome hemorrágica de choque na dengue (DSS). Esse é um estudo de casos e controles que busca demonstrar, a exemplo de outros já realizados, a relação entre os polimorfismos genéticos no sistema imune inato humano e respostas diferenciais à infecção ocasionada pelo Vírus da dengue, de forma que estejam associados com uma maior susceptibilidade a esta infecção, promovendo uma progressão mais grave para a doença. Os pacientes e casos controle do

**Endereço:** Campus A . C Simões Cidade Universitária

**Bairro:** Tabuleiro dos Martins

**CEP:** 57.072-900

**UF:** AL

**Município:** MACEIO

**Telefone:** (82)3214-1041

**Fax:** (82)3214-1700

**E-mail:** comitedeeticaufal@gmail.com

## ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe com consentimento livre e esclarecido dos participantes, indivíduos ou grupos que, por si e/ou por seus representantes legais, manifestem a sua anuência à participação na pesquisa. Entende-se por Processo de Consentimento Livre e Esclarecido todas as etapas a serem necessariamente observadas para que o convidado a participar de uma pesquisa possa se manifestar, de forma autônoma, consciente, livre e esclarecida”. Resolução Nº 466 de 12 de dezembro de 2012.

Eu, \_\_\_\_\_ tendo sido convidado (a) a participar como voluntário (a) do estudo: **POLIMORFISMO GENÉTICO DOS PACIENTES COM DENGUE NO ESTADO DE ALAGOAS E SUA RELAÇÃO COM A INFECÇÃO E PROGRESSÃO DA DENGUE**, recebi da Sr. Professora Adjunta Elaine Martins de Souza Figueiredo do Departamento de Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas – Campus Arapiraca, responsável por sua execução e da discente de mestrado Ana Caroline Melo dos Santos, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina a investigar padrões genéticos na população geral relacionados a infecção e evolução da doença dengue;
- A importância deste estudo é entender estes aspectos correlacionados a doença da dengue e gerar conhecimento para poder determinar a predisposição das pessoas em relação com a dengue;
- Esse estudo começara em 2015 e terminará em 2016;
- O estudo será feito da seguinte maneira: Se você estiver com suspeita de dengue e for pedido a realização de exame sorológico pelo seu médico e você autorizar participar do estudo, será solicitada a coleta de sangue em um dos braços por punção venosa (retirada de sangue pela veia do braço com agulha) realizada com material descartável por profissional treinado. Será retirado no máximo 10 ml de sangue. Este volume de sangue é cerca de trinta vezes menor do que o volume de sangue normalmente doado quando um indivíduo doa sangue para bancos de sangue. Caso a punção realizada não obtiver sucesso, uma amostra de saliva será necessária através da coleta por uma escova (swab). Estas amostras serão submetidas à análise de laboratório para estudos genéticos. Solicitamos também a sua autorização para utilizar dados do seu prontuário como idade, sexo, idade que iniciou a doença, tempo de doença e os resultados dos últimos exames de rotina pedidos pelo seu médico;
- Que eu participarei das seguintes etapas: doação de material biológico (sangue ou saliva) e dessa forma encerra-se a minha participação neste estudo;
- Que os outros meios conhecidos para se obter o mesmo resultado são os seguintes: não existem outros meios para se obter os mesmos resultados;
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: o desconforto da coleta de sangue é dor leve e passageira;
- Os riscos à minha saúde física e mental são mínimos. No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da veia. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte. O acesso ao meu prontuário pode conter informações pessoais e confidenciais, entretanto os pesquisadores envolvidos afirmam que os resultados da pesquisa não terão os entrevistados divulgados. Estou ciente de que será mantido o sigilo e a privacidade do meu nome na pesquisa;
- Que eu não terei nenhuma despesa na participação da pesquisa;
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: a avaliação da predisposição da população estudada para a infecção e evolução da dengue;
- Que, sempre que eu desejar será fornecido esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo
-

- Que eu poderei, a qualquer momento, recusar a continuar participando do estudo e também a que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga nenhuma penalidade ou prejuízo;
- Que a qualquer momento eu poderei recusar e continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;
- Que as informações conseguidas através da minha participação no estudo não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto pelos responsáveis, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto;
- Que eu receberei uma cópia deste termo devidamente assinado por mim e pelos responsáveis pela pesquisa;
- Que não haverá ressarcimento de despesas, caso eu apresente algum custo na realização desta pesquisa e de que eu não serei indenizado por qualquer dano que venha a sofrer com a participação na pesquisa.
- Que serei indenizado para alguma situação adversa decorrentes da minha participação no projeto de pesquisa;

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implica, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

**Endereço do Comitê de Ética:**

Instituição: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas

Endereço: Prédio da Reitoria, sala do C.O.C, Campus A. C. Simões

Bairro: Cidade Universitária                      Cidade: Maceió

Fone: 32141041

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão datiloscópica do (a) voluntário ou responsável legal

*Elaine Virginia f. de Souza Figueiredo*

**Elaine Virginia de Martins de Souza Figueiredo**

*Ana Caroline Melo dos Santos*

**Ana Caroline Melo dos Santos**

Assinatura do(s) responsável (is) pela pesquisa.