

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Farmácia



Relatório de Estágio e Monografia

Ana Cláudia Vieira Ferreira

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Farmácia



**“Vírus emergentes: A infecção pelo vírus
do dengue”**

Ana Cláudia Vieira Ferreira

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

Monografia orientada pelo Prof. José Miguel Azevedo
Pereira

2014

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABELAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
Introdução histórica.....	13
INFECÇÕES VIRAIS EMERGENTES	15
DENGUE COMO DOENÇA EMERGENTE.....	16
EPIDEMIOLOGIA	17
A importância das viagens para a epidemiologia	19
Dengue na Europa/Ilha da Madeira.....	19
VÍRUS DO DENGUE.....	22
Descoberta do vírus do dengue	22
Estrutura e genoma viral.....	22
Ciclo replicativo	25
TRANSMISSÃO.....	28
Modos incomuns de transmissão.....	30
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	31
Dengue clássico.....	31
Dengue hemorrágico	32
Síndrome de choque de dengue.....	34
Manifestações clínicas atípicas do dengue	35
FISIOPATOLOGIA	36
ADE- Teoria dos anticorpos potencializadores de infecção.....	37
O papel dos linfócitos T no dengue grave	40
Auto-imunidade.....	42
Complemento	42
DIAGNÓSTICO.....	43

Diagnóstico diferencial.....	43
Diagnóstico laboratorial	44
Diagnóstico virológico	46
Detecção de genoma viral (RNA viral)	47
Diagnóstico sorológico.....	48
Detecção do antígeno NS1	49
Diagnóstico laboratorial do dengue em Portugal	50
TRATAMENTO/ PREVENÇÃO	51
VACINA - PERSPECTIVAS FUTURAS	52
CONCLUSÃO	55
BIBLIOGRAFIA.....	56

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADE	Teoria dos anticorpos potencializadores de infecção
<i>A. aegypti</i>	Vector <i>Aedes aegypti</i>
<i>A. albopictus</i>	Vector <i>Aedes albopictus</i>
APTT	Tempo de tromboplastina parcial
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
DEN	Vírus do dengue
DHF	Dengue hemorrágico
DF	Dengue febril
DSS	Síndrome de choque do dengue
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GM-CSF	Factor estimulante de colónias de granulócitos e monócitos
IF	Imunofluorescência
INF- γ	Interferão gama
INSA	Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MCP-1	Proteína quimioatractora de monócitos 1
MIF	Factor de inibição da migração dos macrófagos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reacção de polimerase em cadeia
PT	Tempo de protrombina
RE	Retículo endoplasmático
SARS	Síndrome de insuficiência respiratória aguda
TF	Factor tecidual
TGF- β	Factor de transformação de crescimento do tipo β
TNF- α	Factor de necrose tumoral α
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Presença mundial dos vários serótipos do dengue desde 1943.....	17
Figura 2: Relatório recente (últimos 3 meses) de infecções de dengue locais ou importadas obtidos a partir de dados oficiais.....	18
Figura 3: Distribuição semanal do nº de casos de febre do dengue confirmados laboratorialmente na ilha da Madeira 2012-2013	20
Figura 4: Estrutura do vírus do dengue e genoma viral	23
Figura 5: Diferentes conformações que a proteína E assume.	26
Figura 6: Ciclo replicativo do vírus do dengue	27
Figura 7: Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	28
Figura 8: Ciclo de vida do mosquito.	29
Figura 9: Esquema de classificação do dengue	31
Figura 10: Representação esquemática da Teoria dos anticorpos potencializadores de infecção	38
Figura 11: Modelo proposto para a patogénese de DF, DHF e DSS	39
Figura 12: Métodos de diagnóstico do dengue	44
Figura 13: Curso da infecção por dengue e testes de diagnóstico	45
Figura 14: Vírus do dengue, respostas dos antígenos e anticorpos utilizados no diagnóstico	48
Figura 15: Desenvolvimento da vacina usando a tecnologia de DNA recombinante	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Factores que contribuem para as infecções virais emergentes ou re-emergentes	15
Tabela 2- Graus de gravidade do dengue hemorrágico	33
Tabela 3: Principais citocinas implicadas no processo de patogénese da infecção pelo vírus do dengue.	41

RESUMO

O dengue representa um problema de saúde pública internacional crescente, para o qual, uma vacina licenciada, fármacos anti-virais e programas eficazes de controlo de vectores ainda não estão disponíveis.

Tornou-se uma doença re-emergente a nível global, devido ao aumento incomum nas últimas décadas, do vector *Aedes aegypti*, principal vector responsável pela sua transmissão. São estimadas ocorrer anualmente cerca de 50-100 milhões de infecções, em mais de 100 países endémicos, colocando quase metade da população mundial em risco.

A infecção com qualquer um dos serótipos do vírus do dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4) pode ser assintomática, na maioria dos casos, ou pode resultar num amplo espectro de sintomas clínicos, que vão desde uma doença febril leve às formas mais severas da doença. As formas mais severas do dengue (febre hemorrágica do dengue (DHF) e Síndrome do choque do dengue (DSS)) encontram-se geralmente associadas a infecções secundárias com serótipos heterólogos e são caracterizadas por um aumento da permeabilidade vascular gerado pela libertação de mediadores pró e anti-inflamatórios, muitas vezes referidos, como tempestade de citocinas.

Com este trabalho pretendo fazer uma revisão actual dos aspectos epidemiológicos, etiologia, patogénese e fisiopatologia do vírus do dengue, bem como demonstrar a importância de um correcto diagnóstico e desenvolvimento de uma vacina.

Palavras-chave: Vírus do dengue, flavivírus, *Aedes aegypti*, febre do dengue, dengue hemorrágico, citocinas, linfócitos T, monócitos, síndrome do choque do dengue, vacina contra o dengue.

ABSTRACT

Although dengue be a serious threat to world population, nowadays there isn't available any vaccine or effective chemotherapy and vector control.

In the last decades, the vector *Aedes aegypti*, the major responsible for dengue's transmission, has increased and led to a wide distribution of the disease. This way, half of the world population is at risk of dengue, a pathology that causes between 50 and 100 million infections in more than 100 endemic countries.

People infected by any serotype of dengue's virus (DEN-1, DEN-2, DEN-3 and DEN-4) may be asymptomatic or develop serious illness like dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue syndrome shock (DSS). Both DHF and DSS are associated with secondary infections caused by heterologous serotypes and due to the release into the bloodstream of anti and pro-inflammatory cytokines patients develop higher vascular permeability.

Herein I will review epidemiologic aspects, etiology, pathogenesis and physiopathology of dengue's virus as well as show how vital is to develop a vaccine and to do an accurate diagnostic.

Keywords: Dengue's virus; flavivirus, *Aedes aegypti*, dengue's fever, hemorrhagic dengue, cytokines, T lymphocytes, monocytes, dengue syndrome shock, dengue vaccine.

INTRODUÇÃO

Infecções virais emergentes ou re-emergentes representam um importante problema de saúde pública nas últimas décadas (1).

Vários factores, incluindo comportamentos humanos ou animais, viagens, mudanças climáticas, desastres naturais, uso de antimicrobianos e mutações nos agentes patogénicos, contribuem para o surgimento de agentes infecciosos, sejam estes, virais, bacterianos, fúngicos ou parasitológicos (2).

O dengue é uma das doenças tropicais emergentes mais importantes no início do século XXI. O ressurgimento da epidemia, e o surgimento do dengue hemorrágico, encontram-se estritamente relacionados com o crescimento populacional, a urbanização, as viagens aéreas, transporte de mercadorias e a falta de recursos para a implementação de medidas eficazes de controlo do vector (3).

O dengue pertence ao grupo das infecções virais transmitidas por artrópodes e é transmitido ao homem através da picada de mosquitos hematófagos fêmeas do género *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti* (*A. aegypti*). Constitui, hoje em dia, a nível global a arbovirose mais importante em termos de letalidade, morbilidade e implicações económicas (4).

Esta doença febril aguda afecta todas as faixas etárias, e é causada por quatro vírus antigenicamente distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3, e DEN-4), mas geneticamente relacionados (serótipos) (5).

O dengue apresenta diversas formas de expressão que vão desde uma febre indiferenciada (frequente nas crianças), a uma febre intensa com dores de cabeça, mau estar geral, dores ósseo-articulares, erupção cutânea e algum tipo de sangramento, até às formas mais graves que começam com os sintomas anteriores e evoluem para um choque hipovolémico devido à fuga de plasma, com trombocitopenia moderada ou intensa e grandes hemorragias no tracto gastrointestinal e outros locais (4).

Epidemiologicamente, mais de metade da população mundial vive em áreas onde há um risco de infecções por dengue e, nos últimos 10 anos tem havido um rápido e acentuado aumento no número de focos de dengue registados, em países de clima tropical e subtropical. Segundo a OMS, existem cerca de 50-100 milhões de infecções com o vírus do dengue, por ano no Mundo, dos quais 500 000 são de febre hemorrágica do dengue (DHF) (6).

Introdução histórica

O dengue encontra-se presente na população humana há séculos. Os primeiros registos, de uma doença com sintomas compatíveis com o dengue, foram descritos numa enciclopédia médica chinesa em 992 D.C.. A doença foi referida como “água envenenada” e associada a insectos voadores. Contudo, a etiologia viral e a transmissão por mosquitos, só foram finalmente determinadas no século XX (7).

Os quatro vírus do dengue tiveram a sua origem em macacos e, independentemente, passaram para os seres humanos em África ou no Sudoeste da Ásia, há cerca de 100 a 800 anos atrás (8).

A primeira epidemia de dengue registada como doença remonta a 1779-1780, quando os surtos ocorreram em Batávia (Jacarta), Cairo e na Filadélfia, indicando que a distribuição em todo o mundo já existe há pelo menos 200 anos. Nos séculos XVII e XIX as epidemias ou pandemias regionais do dengue, ocorreram aproximadamente a cada 10 a 40 anos nas regiões tropicais do mundo. Durante os séculos XIX e XX, o número de epidemias aumentou, com epidemias de dengue ou dengue hemorrágico em grande escala nos países do Sudoeste da Ásia, aproximadamente a cada 3 a 5 anos e com uma pandemia em 1998 (9).

O início destas epidemias coincidiu com o momento em que o *A. aegypti*, principal vector do dengue, começou a espalhar-se a partir de África e, ao longo dos trópicos através de embarcações à vela utilizadas no comércio, e comércio de escravos (10). O mosquito utilizava a água armazenada nos navios como local de reprodução, o que lhe permitiu assim, manter o seu ciclo de transmissão, mesmo em longas viagens (3).

O dengue permaneceu como uma doença relativamente menor, geograficamente restrita até meados do século XX. A epidemiologia e transmissão dinâmica global do vírus do dengue foram alteradas drasticamente, com o decorrer da Segunda Guerra Mundial, como consequência do transporte de mosquitos *Aedes* por todo o mundo. O movimento das tropas acelerou a disseminação do vírus entre os centros populacionais da região, conduzindo a grandes epidemias (8).

Factores como o aumento da urbanização, em áreas de alta densidade com sistemas inadequados de água e gestão de resíduos sólidos; actividades relacionadas com a Segunda Guerra Mundial e período pós-guerra, onde os sistemas de esgoto e abastecimento de água existentes foram destruídos durante a guerra, resultando em mais locais favoráveis para a proliferação de *A. aegypti*; e o movimento de soldados e materiais de guerra para outras

áreas, facilitando a circulação dos serótipos do dengue em toda a região, levaram a um aumento dramático de dengue febril (DF) e surgimento do dengue hemorrágico (DHF) como um problema de saúde na América e na Ásia (10).

A primeira epidemia de dengue hemorrágico registada ocorreu em Manila, Filipinas em 1953-1954, seguindo-se Bangkok na Tailândia em 1958, e Malásia, Singapura, e Vietnam na década de 1960. Epidemias de dengue hemorrágico foram localizadas no sudoeste da Ásia durante este período, devido ao isolamento das ilhas do Pacífico e ao sucesso do programa americano de erradicação do mosquito *A. aegypti* nas Américas. Na década de 1970, o programa americano foi interrompido e *A. aegypti* invadiu a maioria dos países da região. O transporte moderno facilitou e aumentou a circulação de pessoas e mercadorias dentro e entre as diferentes regiões do mundo, levando a um aumento da circulação de ambos os mosquitos e vírus. Como resultado, a epidemia de DF/DHF espalhou-se para os trópicos americanos e para o Pacífico. Nos anos de 1980 e 1990 tantos os mosquitos vectores como o vírus continuaram a sua expansão global levando a um aumento da frequência e magnitude da epidemia de DF e à emergência do dengue hemorrágico.

A incidência de dengue global tem aumentado vertiginosamente nas últimas cinco décadas e os casos graves de dengue também aumentaram. Antes de 1970, apenas nove países tinham experimentado casos graves de dengue, um número que, desde então, quadruplicou (7).

INFECCÕES VIRAIS EMERGENTES

Ao longo da história, as doenças infecciosas têm surgido, o que veio alterar drasticamente o curso da civilização humana.

O surgimento de uma doença infecciosa muitas vezes é multifactorial, reflectindo certos comportamentos humanos e mudanças na ecologia dos vectores ou na genética dos microorganismos (2).

As infecções virais emergentes ou re-emergentes representam um importante problema de saúde pública nos últimos anos. Isto é, em parte, devido à evolução dos agentes infecciosos ou à globalização e modificação dos habitats. As infecções virais emergentes podem ter origem a partir de agentes infecciosos anteriormente existentes, a partir de fenómenos de mutações genéticas e/ou recombinações, ou como consequências de vírus presentes em animais que se adaptam a hospedeiros humanos. Por outro lado, as infecções re-emergentes podem ter origem a partir da reactivação de reservatórios quiescentes ou como consequência do reaparecimento do vírus em áreas anteriormente infecciosas, mas onde este terá deixado de circular. Além disso, mudanças no comportamento da população humana, nos seus habitats, migração, evolução agrícola e modificação climática, também podem contribuir para o aparecimento e difusão de novas infecções virais (Tabela 1).

Por fim, a rápida introdução de agentes infecciosos em áreas anteriormente não infectadas pode ocorrer directamente de pessoa para pessoa ou indirectamente através da presença de vectores artrópodes ou através de meios de transportes (1).

Tabela 1: Factores que contribuem para as infecções virais emergentes ou re-emergentes

- Pobreza
- Mudanças climáticas
- Mudanças demográficas e comportamentos humanos
- Alterações ambientais
- Turismo e viagens de negócios
- Comércio de vida selvagem
- Adaptação dos vírus a novos hospedeiros
- Introdução de agentes exóticos pela migração humana e animal
- Contrabando de animais
- Falta de medidas de saúde pública

DENGUE COMO DOENÇA EMERGENTE

O dengue está emergindo rapidamente como uma doença viral pandémica em várias partes do mundo (10). Embora não seja uma nova doença, representa uma doença infecciosa emergente grave, que pode ter consequências desastrosas, inclusive a morte (9).

O dengue tornou-se assim, uma doença re-emergente a nível global devido ao aumento incomum do vector nas últimas décadas. Existem factores denominados macro determinantes que permitem explicar o aumento do dengue em escala mundial. São estes os do tipo climático tais como o aquecimento global; e os do tipo social como o aumento da população mundial, tendência para uma urbanização desordenada, viagens internacionais, pobreza expressa em questões associadas à habitação, educação, abastecimento de águas, recolha de resíduos sólidos e outros, bem como a falta de programas nacionais e internacionais eficazes contra esta doença e o seu vector (4).

EPIDEMIOLOGIA

A epidemiologia global e a dinâmica de transmissão do vírus do dengue mudaram dramaticamente desde a Segunda Guerra Mundial. A mudança na ecologia causada pela guerra, a distribuição geográfica dos mosquitos, urbanização e transporte moderno após a guerra contribuiu grandemente para a incidência das infecções pelo vírus do dengue (11).

A incidência de casos de dengue tem aumentado dramaticamente em todo o mundo nas últimas décadas. Mais de 2.5 mil milhões de pessoas, correspondendo a mais de 40% da população mundial, estão em risco de ser infectadas pelo vírus do dengue. Segundo a OMS, são estimadas cerca de 50-100 milhões de infecções de dengue, em todo o mundo a cada ano.

Antes de 1970, apenas nove países tinham relatado epidemias de dengue grave. A doença tornou-se endêmica em mais de 100 países (países de África, América, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e a Oeste do Pacífico), dos quais as regiões da América, Sudeste Asiático e Oeste do Pacífico foram gravemente mais afetadas, tendo ultrapassado os 1.2 milhões de casos em 2008 e, mais de 2,3 milhões em 2010 (com base em dados oficiais apresentados pelos Estados-Membros). Recentemente, o número de casos notificados de dengue tem vindo a aumentar (Figura 1) (10).

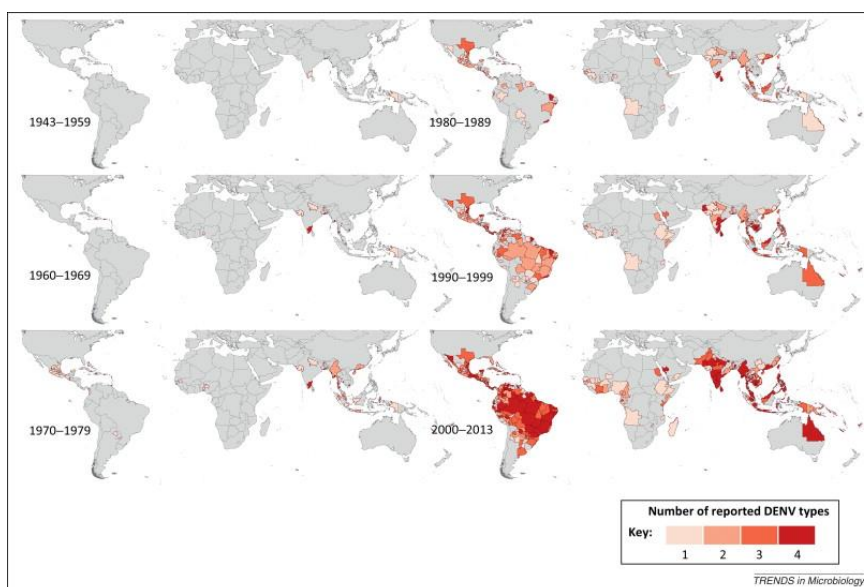


Figura 1: Presença mundial dos vários serótipos do dengue desde 1943. Até 1980 a maioria das áreas apenas tinha relatado infecções por um ou dois serótipos de dengue. Após 1980 o número de infecções pelos vários serótipos aumentou devido ao desenvolvimento dos vários testes de diagnóstico específicos (12).

Em 2012, o dengue foi mais uma vez classificado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a "doença viral transmitida por mosquitos mais importante no mundo" devido à significativa expansão geográfica do vírus e seu vector, em áreas anteriormente não afectadas e subsequente carga de doenças que ela acarreta (7).

Em 2013, foram notificados 2.350.000 casos de dengue apenas na América, 37.687 dos quais correspondiam a formas graves do dengue. Há medida que a doença se espalhou para novas áreas, novos surtos foram relatados. Em 2013, os casos ocorreram na Flórida (Estados Unidos da América) e na província de Yunnan da China. O dengue continua também a afectar vários países sul-americanos nomeadamente as Honduras, Costa Rica e México. Na Ásia, Singapura tem relatado um aumento dos casos após um intervalo de vários anos e, surtos também foram relatados em Laos.

Para 2014, as tendências indicam para o aumento do número de casos nas Ilhas Cook, Malásia, Fiji e Vanuatu, com Dengue tipo 3 (DEN 3) que afecta os países do Pacífico após um intervalo de mais de 10 anos (Figura 2).

Estima-se que 500 000 pessoas com dengue grave necessitam de hospitalização a cada ano, grande parte das quais são crianças. Cerca de 2,5 % destas acabarão por morrer (10).

Devido à pobre vigilância da doença, ao baixo nível de informação, à baixa taxa de letalidade da doença, às dificuldades de diagnóstico e análises comparativas inconsistentes, a verdadeira incidência e o impacto do dengue é provavelmente, significativamente maior do que a que se encontra relatado. Assim, a verdadeira carga global da doença e do impacto económico associado é desconhecido (7).

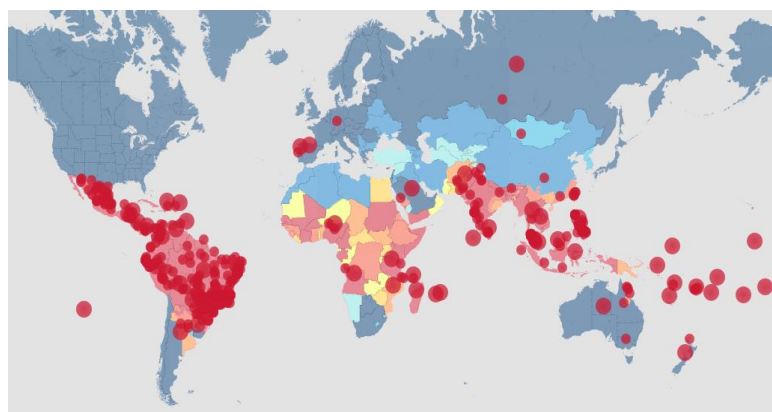


Figura 2: Relatório recente (últimos 3 meses) de infecções de dengue locais ou importadas (círculos vermelhos) obtidos a partir de dados oficiais. Os países encontram-se em várias cores devido ao seu risco de infecção: Ausente Improvável Provável Presente (8).

A importância das viagens para a epidemiologia

Muitos países em regiões endémicas são um destino turístico popular da população e, o aumento das viagens internacionais para estas regiões, tem desempenhado um papel significativo na disseminação global da doença (13).

Os viajantes podem assim, levar vários serótipos do dengue para áreas onde esteja presente o mosquito vector capaz de transmitir a infecção. O vírus é muitas vezes transportado de países tropicais em desenvolvimento, onde as instalações laboratoriais existentes são limitadas, para países desenvolvidos, com laboratórios que conseguem identificar os serótipos do vírus (14).

Como resultado, nos últimos anos, tem havido um aumento desastroso da circulação do vírus do dengue, dentro e entre as regiões endémicas, resultando num aumento da actividade epidémica, desenvolvimento de hiperendemicidade (co-circulação de múltiplos serótipos do vírus), expansão geográfica e aumento da incidência das formas graves e fatais da doença (dengue hemorrágico/ síndrome de choque do dengue) (15).

Dengue na Europa/Ilha da Madeira

Dengue na Europa

A última epidemia de dengue na Europa foi entre 1926 e 1928 na Grécia. Esta epidemia teve *A. aegypti* como vector predominante, e levou a uma grande taxa de mortalidade. Não houve notificações de infecções com o vírus do dengue desde essa época, até que *A. albopictus* se estabeleceu na Europa na década de 1990, como resultado do aumento do comércio mundial de pneus usados.

Hoje, há uma ameaça muito real e aparente de surtos de dengue na Europa. Casos importados em viajantes são vistos com frequência e, em 2010 a transmissão local do dengue foi relatada na Croácia e França.

Assim, apesar de a Europa estar livre do dengue durante a maioria do século XX, a expansão global do dengue está finalmente afectando a região (7).

Em 2012, um surto de dengue na ilha da Madeira, em Portugal, resultou em mais de 2000 casos e casos importados foram detectados em dez outros países da Europa para além de Portugal Continental (10).

Surto de dengue na ilha da Madeira

Após a identificação de dois casos autóctones de dengue a 3 de Outubro de 2012, um surto de dengue foi relatado na Madeira, Portugal. Este acontecimento representou a primeira epidemia de dengue na Europa desde 1928 (16).

O principal vector do dengue, *A. Aegypti* foi detectado pela primeira vez na cidade do Funchal em 2005. O mosquito conseguiu adaptar-se bem graças ao clima tropical presente na ilha. Após a sua identificação em 2005, nunca tinham ocorrido casos de febre do dengue até à data (17). Em 2012, a combinação da elevada densidade do vector, com múltiplos locais de reprodução na cidade e a falta de imunidade da população ajudam a explicar a dimensão do surto (18).

Desde o início do surto de dengue na ilha da Madeira foram notificados 2187 casos prováveis de febre de dengue, dos quais 1084 foram confirmados laboratorialmente. Todos os casos notificados evoluíram favoravelmente e não houve registo de óbitos.

O número de casos de dengue com confirmação laboratorial decresceu progressivamente desde meados de Novembro até à semana 4 de 2013 (Figura 3), tendo a partir desta data, apenas sido confirmados 3 casos de dengue importados (1 do Brasil e 2 de Angola) (19).

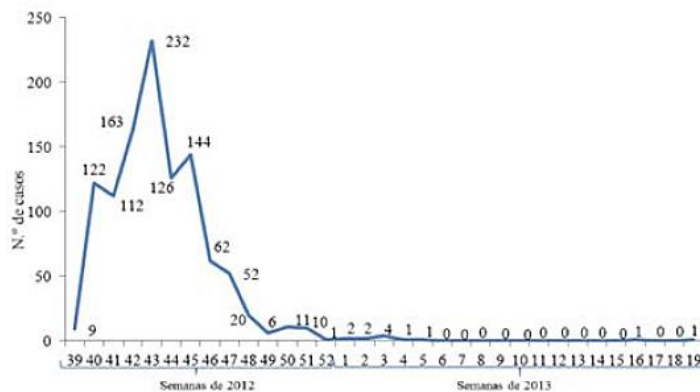


Figura 3: Distribuição semanal do nº de casos de febre do dengue confirmados laboratorialmente na ilha da Madeira 2012-2013 (19)

Devido à ocorrência recente dos casos autóctones de febre de dengue na ilha da Madeira, o INSA (Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge) realizou o diagnóstico laboratorial confirmatório tendo identificado, em amostras humanas, a presença do vírus DEN-1. A análise das sequências do genoma viral identificado indicaram 99% de semelhanças com o vírus DEN-1 que circulou na Venezuela (2006-2007), Colômbia

(2006-2009) e Roraima, norte do Brasil (2010). Conclui-se que o vírus DEN-1, detectado na Madeira, teve origem na América Latina, provavelmente na região do mar das Caraíbas (20).

Em resposta ao surto, várias medidas de controlo foram tomadas pelas autoridades de saúde da Madeira. A fim de impedir a exportação, medidas de controlo de vectores, foram implementadas no único aeroporto da Madeira. Actualmente, todos os aviões que partem desta ilha passam por procedimentos de desinfestação. Sistemas de vigilância de mosquitos no aeroporto de passageiros e portos de carga foram impulsionados. Um cuidado especial é dado ao porto de navios de passageiros, localizado na área mais afectada do Funchal (16).

Actualmente não há registo de actividade epidémica de dengue na ilha da Madeira, contudo mantêm-se todas as medidas de vigilância, controlo e resposta consideradas adequadas (19).

VÍRUS DO DENGUE

Descoberta do vírus do dengue

Os vírus do dengue são membros do género *Flavivirus* da família *Flaviviridae*. Juntamente, com o vírus do dengue, este género também inclui uma série de outros vírus transmitidos por mosquitos e carraças que são responsáveis por doenças humanas, tais como o vírus da febre-amarela, o vírus de *West Nile*, vírus da encefalite japonesa e o vírus da encefalite transmitida por carraças (TBE).

O vírus do dengue foi isolado pela primeira vez em 1943 por Ren Kimura e Susumo Hotta. Estes dois cientistas estavam estudando amostras de sangue de doentes recolhidas durante a epidemia de dengue de 1943 em Nagasaki, no Japão. Um ano depois, Albert B. Sabin e Walter Schlesinger isolaram independentemente o vírus do dengue. Ambos os pares de cientistas isolaram o vírus agora referido como o vírus do dengue 1 (DEN-1) (21).

Estudos genéticos de estirpes de dengue presentes em animais fornecem evidências de que os quatro vírus do dengue evoluíram de um ancestral comum em populações de primatas e que, por volta de 500 anos atrás, todos os vírus surgiram separadamente num ciclo de transmissão urbano-humano (22).

Estrutura e genoma viral

A infecção pelo vírus do dengue é causada por quatro serótipos, estreitamente relacionados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. Estes quatro vírus são denominados serótipos, porque cada um tem diferentes interações com os anticorpos no soro do sangue humano. Os quatro vírus do dengue são semelhantes entre si - partilham cerca de 65% dos seus genomas, mas mesmo dentro de um serotipo há alguma variação genética (21).

Estes serótipos podem ainda ser classificados em genótipos em função da variação dos nucleótidos. Diferenças genéticas virais têm sido associadas com as diferenças de virulência. Epidemias com alta incidência de dengue hemorrágico têm sido associadas a infecções primárias com o DEN-1 seguido de re-infecções com o DEN-2 ou 3 (23).

O vírus do dengue tem uma estrutura semelhante à dos outros *flavivirus*. Apresenta uma estrutura esférica com cerca de 40-50 nm de diâmetro, com um invólucro lipídico derivado da membrana da célula hospedeira a partir da qual o vírus teve origem. (Figura 4A). O invólucro engloba o “core” que é constituído por uma nucleocápside icosaédrica de

30-35 nm de diâmetro, sendo esta, por sua vez, constituída por proteínas da cápside e pelo genoma viral (15).

Ancoradas ao invólucro viral encontram-se as proteínas E e M, que se estendem através da bicamada lipídica e formam uma camada protectora externa que controla a entrada do vírus nas células humanas.

O genoma do vírus é composto por uma única cadeia de RNA de sentido positivo (ssRNA). É referido como RNA de sentido positivo, uma vez que pode ser directamente traduzido em proteínas. Tem aproximadamente 11 000 pares de bases de comprimento com pequenas regiões não traduzidas nas extremidades 3´e 5´, e um quadro de leitura interrompido entre elas.

O genoma viral codifica 10 genes e é traduzido num único polipéptido longo e, posteriormente clivado em dez proteínas (21). Das 10 proteínas codificadas, três são proteínas estruturais (cápside (C), membrana (prM) e invólucro (E)) codificadas por sequências perto da extremidade 5´e sete são proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) codificadas pelo restante genoma (figura 4 B) (15).

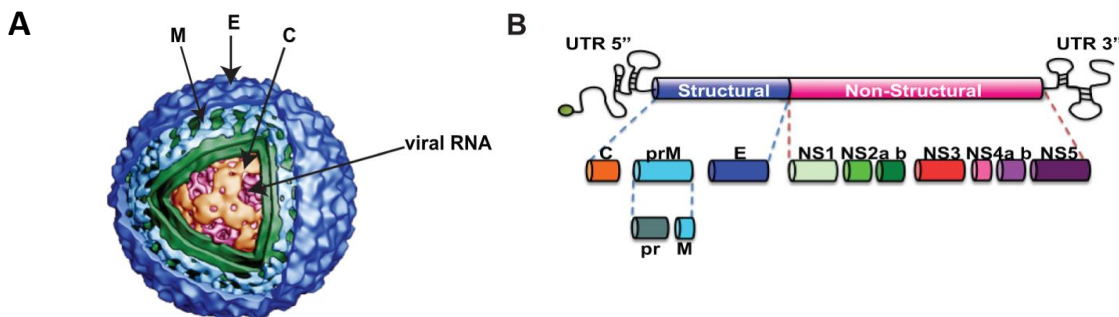


Figura 4: **A- Estrutura do vírus do dengue.** Os viriões são rodeados por um invólucro e contêm três proteínas estruturais: as proteínas do invólucro (E) e da membrana (M) (azul claro e escuro, respectivamente) que são ancoradas à membrana viral (verde), e a proteína da cápside (C) (laranja) que cobre o genoma viral (vermelho). **B - Genoma viral.** Genoma RNA de cadeia simples com uma única região de leitura aberta ladeada por 50 e 39 regiões não traduzidas (24).

A codificação das proteínas virais no genoma é organizada do seguinte modo: [C-PRM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5] (25).

As proteínas estruturais são componentes da partícula viral madura não estando envolvidas na replicação viral, enquanto as proteínas não-estruturais apenas são expressas em células infectadas e não estão presentes em níveis detectáveis nas partículas maduras (26).

A maior proteína do invólucro, proteína E (E) é essencial para a fixação viral ao receptor e entrada do vírus nas células hospedeiras e, é também o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. Uma vez que a proteína E está exposta à superfície do virião, esta contém os epitópos que vão ser reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes (24).

A proteína E é constituída por três domínios estruturais distintos: Domínio I em forma de dobra β com oito cadeias, estruturalmente posicionado no centro, entre o domínio II e domínio III; domínio II que contém um *loop* de fusão interno que está envolvido na fusão da membrana viral com a do endossoma e dimerização da proteína E; e o domínio III que consiste numa dobra do tipo imunoglobulina e é o domínio de ligação ao receptor da célula.

A proteína C estabiliza o RNA viral dentro da nucleocápside viral. O N-terminal da proteína C codifica uma sequência de localização nuclear de C, que permite a translocação da proteína para o núcleo, e a interacção com ribonucleoproteínas nucleares (25).

A proteína de membrana (M) é sintetizada como uma proteína precursora (prM) que é processada durante a exportação e impede que ocorram alterações conformacionais na proteína E durante a montagem viral (24). A proteína prM actua como uma chaperona que ajuda a dobragem da proteína E (25).

Relativamente às proteínas não estruturais, todas estas são necessárias para uma replicação viral eficiente (26).

A proteína NS1 é uma glicoproteína, e é expressa em três formas: a forma residente no retículo endoplasmático (RE); uma forma ancorada à membrana; e uma forma secretada. Como principais funções da proteína NS1 foram relatadas o envolvimento da proteína nas vias de transdução de sinal e activação do complemento.

NS2A tem actividade de protease e, ao mesmo tempo que cliva NS1, processa adequadamente NS1 no RE. NS2a também é capaz de bloquear a transdução de sinal mediada pelo interferão (IFN). NS2b é um cofactor de NS3 e, juntas, formam o complexo serina-protease.

NS3 é uma proteína multifuncional com um domínio de protease na porção N-terminal, actividade de RNA helicase no domínio central, domínio NTase estimulada por

RNA e RNA 5'-trifosfatase na porção C-terminal. A actividade de protease é necessária para processar o precursor da poliproteína e é essencial para a replicação viral. A actividade de helicase da NS3 está envolvida na replicação viral e montagem viral.

Ambas NS4A e NS4B podem estar envolvidos na indução da transdução do sinal de bloqueio IFN- α/β . A NS4B pode modular a replicação viral pela sua interacção com a NS3.

Por ultimo, NS5 é a maior e mais conservada proteína viral. NS5 têm duas actividades enzimáticas distintas, isto é, S-adenosil-metiltransferase que pode metilar a extremidade 5' do RNA viral, e actividade de polimerase de RNA, RNA dependente (25).

Ciclo replicativo

A interacção directa do vírus, introduzido pela picada de um mosquito vector, com a molécula receptora do hospedeiro é fundamental para a propagação viral e progressão patológica da doença. Durante a infecção viral, a adsorção de partículas virais é iniciada pela ligação da proteína E a moléculas receptoras presentes na membrana da célula hospedeira (27).

Diversas moléculas de superfície, incluindo o sulfato de heparina, CD14, GRP78, receptor de alta afinidade da laminina, proteínas de choque térmico, receptor de manose, um membro da família da lectina do tipo C de domínio 5 e as integrinas são necessários para a ligação celular e entrada durante a infecção pelo DEN.

Após a ligação ao receptor, o vírus do dengue infecta as células alvo através de endocitose mediada por receptores. Quando os viriões são internalizados por endocitose, a proteína de superfície E é rearranjada, conduzindo à fusão do invólucro viral com a membrana do endossoma, com consequente libertação do RNA viral para o citoplasma (28).

Vários estudos estruturais e funcionais foram realizados para desvendar os mecanismos envolvidos no processo de fusão do invólucro viral com a membrana do endossoma. Postula-se que há uma redução do pH (acidificação) do endossoma, o que faz com que a proteína E sofra uma mudança conformacional irreversível e assumam um formato diferente (transformação de dímero em trímero). Este novo formato expõe aminoácidos hidrófobos à superfície (péptido de fusão) que vão ser inseridos na membrana

viral, provocando a sua lise de modo a que haja então a fusão do invólucro viral com o endossoma (Figura 5) (29).

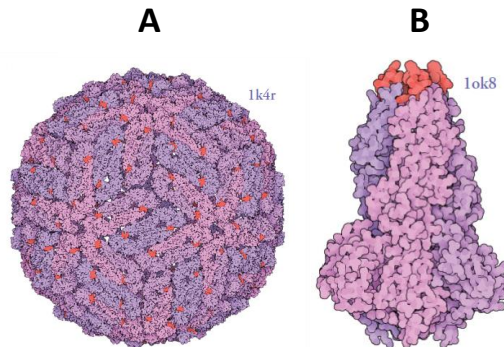


Figura 5: Diferentes conformações que a proteína E assume. Na forma infecciosa do vírus, a proteína E encontra-se na horizontal sobre a superfície do vírus, formando um revestimento liso com simetria icosaédrica (A). No entanto, quando o vírus é transportado para o interior da célula e do endossoma, o meio ácido faz com que a proteína assumira um formato diferente, montagem em espiga trimérico (B). Vários aminoácidos hidrófobos na ponta desta espiga (cor vermelha) são inseridos na membrana endossomal e causam a fusão da membrana viral com a do endossoma (29).

Uma vez no citoplasma, o genoma viral (RNA de sentido positivo) actua como RNA mensageiro e, é traduzido num único polipéptido usando os ribossomas do retículo endoplasmático rugoso. Este polipéptido posteriormente é clivado de modo a formar as proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas não estruturais vão desempenhar um papel importante na replicação do genoma viral (30).

Ciclos sucessivos de tradução produzem múltiplas cópias das 3 proteínas estruturais e 7 não estruturais que juntamente com o RNA viral vão participar na formação da partícula viral na membrana do reticulo endoplasmático. As partículas virais imaturas são transportadas através da via secretória do complexo de Golgi, onde amadurecem e tornam-se infecciosas. Os vírus maduros são então libertados da célula pela via secretória e podem ir infectar novas células (Figura 6) (21).

Em apenas algumas horas após a infecção, dezenas de milhares de cópias de moléculas virais são produzidas a partir de uma única molécula de RNA viral, levando a danos nas células e, em casos mais graves à morte da própria célula (31).

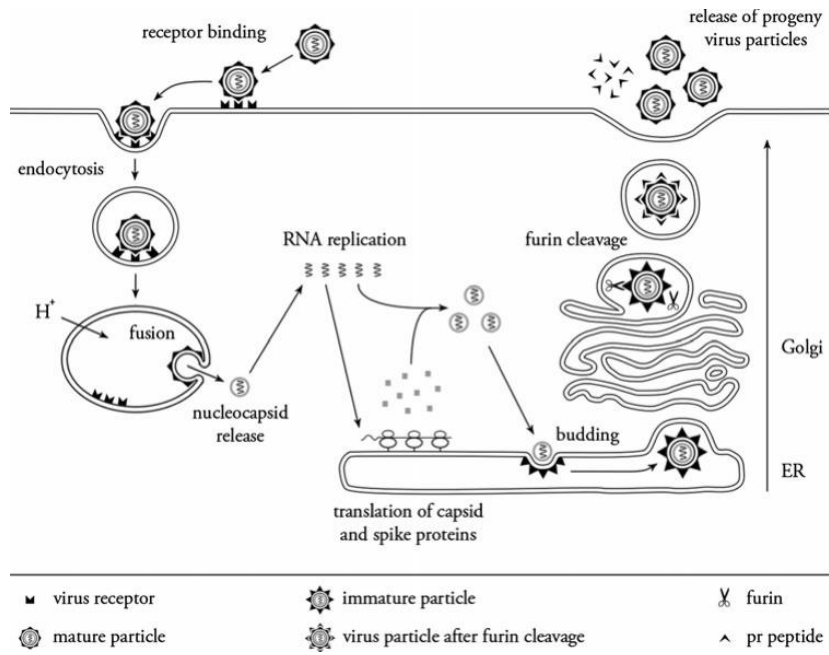


Figura 6: Ciclo replicativo do vírus do dengue (32).

TRANSMISSÃO

O vírus do dengue é transmitido aos seres humanos através da picada de um mosquito, vector infeccioso (15).

O principal vector responsável pela transmissão do vírus do dengue é o *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) (Figura 7). Mosquitos fêmeas hematófagas adquirem o vírus ao picarem seres humanos infectados durante o seu período de viremia que normalmente dura 4 a 5 dias, mas pode durar até 12 dias (4-12 dias). O vírus é ingerido com o sangue e infecta as células do mesentério do mosquito. Depois de aproximadamente 8-12 dias (período de incubação), dependente da temperatura ambiente, do mosquito e serotipo do vírus, o vírus torna-se infeccioso, dissemina e infecta outros tecidos, incluindo as glândulas salivares do mosquito. Quando o mosquito ingere uma refeição de sangue subsequente, o vírus é injectado na pessoa juntamente com a saliva.

Uma vez infectado, o ser humano torna-se o principal portador e multiplicador do vírus, servindo como fonte de vírus para mosquitos vectores não infectados (10).

A infecção pelo vírus do dengue não tem nenhum efeito aparente sobre os mosquitos e estes ficam infectados para toda a vida (15).

A. aegypti é conhecido pela sua eficiente “capacidade vectorial”, com elevada afinidade para o sangue humano, alta susceptibilidade para os quatro serótipos do vírus do dengue e grande adaptação à vida urbana (7).

É um mosquito fortemente antropofílico, prefere descansar em áreas escuras e abrigadas dentro de casas e tem um padrão de alimentação diurno com o pico geralmente a meio da manhã e final da tarde (33).



Figura 7: Mosquito *Aedes aegypti*. Mosquito mais comum responsável pela transmissão do vírus do dengue (8).

A. aegypti está intimamente associado com a habitação humana e entra rapidamente nos edifícios para se alimentar e descansar. As fêmeas põem ovos preferencialmente em recipientes artificiais, incluindo reservatórios de água, vasos de flores, bases de plantas, pneus descartados, baldes ou outros recipientes encontrados perto ou dentro das casas. Os ovos (estadio imaturo do vírus) são colocados sobre ou perto da superfície da água e, uma vez embrionados, podem suportar condições de dessecação até um ano (34). Os ovos tornam-se larvas e pupas mais tarde, até evoluírem à sua forma adulta (Figura 8) (4).

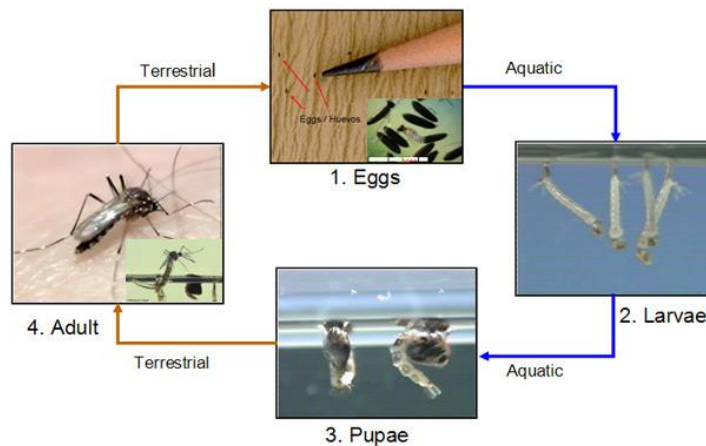


Figura 8: Ciclo de vida do mosquito (8).

O comportamento peri-doméstico de *A. aegypti* e seus ovos resistentes à dessecação fazem desta espécie, um modo alternativo de dispersão a longa distância mediante vias de transporte humano dentro e entre os continentes (35).

A distribuição urbana do dengue é limitada pela distribuição de *A. aegypti*, mas a presença do vector sozinho não garante a transmissão do dengue, mesmo que seja importado para uma região não-endêmica. O padrão de distribuição do dengue depende da interação de vários parâmetros de transmissão incluindo a dinâmica da multiplicação do vírus, a ecologia, comportamento dos seus vectores e comportamento e imunidade dos hospedeiros humanos (34).

O segundo vector, menos eficaz, *Aedes albopictus* (*A. albopictus*), alimenta-se de várias espécies de vertebrados e, também tem sido responsável pela transmissão do dengue (7).

A. albopictus é principalmente uma espécie florestal, que se adaptou a ambientes humanos rurais, suburbanos e urbanos. Nas últimas décadas, espalhou-se da Ásia para a

África, América e Europa, através do comércio internacional de pneus usados, cujos ovos eram depositados quando estes continham água da chuva. Os ovos podem resistir a condições muito secas (dessecação) e permanecer viáveis durante muitos meses, na ausência de água. A estirpe europeia de *A. albopictus* pode sofrer uma redução do período de desenvolvimento (diapausa) durante os meses de inverno (10).

Modos incomuns de transmissão

Apesar de representarem uma pequena proporção de casos do dengue, a doença também pode ser transmitida por meios que não envolvem os mosquitos como vectores (13). Os modos incomuns de transmissão incluem a transmissão vertical da mãe para o feto através da placenta, a transmissão nosocomial através de acidentes com picadas de agulhas infectadas, transmissão associada a transplantes de órgãos e medula óssea e transfusões de sangue (36) (37).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A infecção pelo vírus do dengue pode apresentar-se de forma subclínica, ou pode resultar numa doença febril com ou sem sangramento/ choque (38).

Com a recente revisão da OMS do esquema de classificação do dengue, os doentes são agora classificados como dengue (dengue clássico) ou dengue grave (dengue hemorrágico). Os doentes que recuperam sem maiores complicações são classificados como tendo dengue clássico ou febril, enquanto aqueles que têm complicações tais como extravasamento do plasma, resultando em choque, hemorragias graves ou disfunção de órgãos são classificados como dengue grave ou hemorrágico (Figura 9) (39).

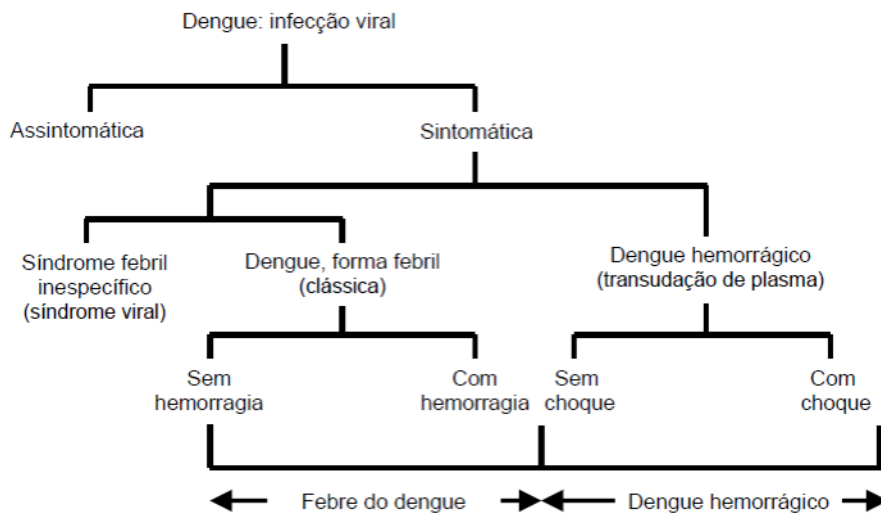


Figura 9: Esquema de classificação do dengue

Dengue clássico

O Dengue clássico é a forma mais frequente da doença (19).

Após um período de incubação de 3 a 15 dias (geralmente 5 a 8) após a picada do mosquito infectado, o dengue clássico começa com um início súbito de febre alta (cerca de 40°C).

A doença é auto-limitada, acompanhada de dor de cabeça, dor retro-orbital, dores musculares e articulares, erupção cutânea e leucopenia. A erupção maculopapular aparece 3 a 5 dias após o início da febre e geralmente começa no tronco antes de se espalhar periféricamente (dorso, braço, pernas e rosto). Dengue clássico ou febril (DF) é muitas

vezes referido como “febre quebra-ossos” devido aos sintomas incapacitantes graves do músculo e dor nas articulações (30).

Os dados laboratoriais incluem trombocitopenia ligeira a moderada e leucopenia, muitas vezes com uma elevação moderada dos níveis das transaminases hepáticas (40) (39).

As manifestações clínicas variam em função da idade do doente. O dengue clássico é observado com maior frequência em adultos. As manifestações clínicas das crianças podem diferir dos adultos - tosse, vômitos e dor abdominal parecem ser mais comuns. Durante a fase febril, a desidratação pode causar perturbações neurológicas e crises febris em crianças. A taxa de mortalidade em crianças é significativamente maior que em adultos ou crianças mais velhas (41).

A maioria das pessoas experimenta uma evolução auto-limitada e não evolui para as formas graves de dengue. Casos de fatalidade associados ao dengue febril são raros, enquanto a mortalidade associada ao dengue hemorrágico é bastante elevada (26).

Dengue hemorrágico

O dengue hemorrágico (DHF) corresponde à forma mais grave da doença e atinge aproximadamente 1% dos casos sintomáticos, sendo mais frequente nas crianças (19).

Os factores de risco para o desenvolvimento do dengue hemorrágico incluem:

1. Idade: 95% dos casos ocorrem em crianças com menos de 15 anos de idade;
2. Infecções recorrentes com dengue: anticorpos pré-existentes de uma infecção anterior não são capazes de neutralizar a infecção por um serotipo diferente;
3. Genótipos virais com maior patogenicidade;
4. Factores genéticos;
5. Estado nutricional do paciente (42).

As crianças têm um risco mais elevado do que os adultos de desenvolver dengue grave, uma das principais causas de morbidade e morte neste grupo etário. O risco de mortalidade de uma infecção secundária é quase 15 vezes maior que nos adultos (13).

A OMS classificou o dengue hemorrágico em quatro graus (I-IV). Os graus I e II correspondem às formas mais brandas da doença e os graus III e IV correspondem a casos mais graves e podem conduzir à coagulação intravascular disseminada (CID) (Tabela 2).

Tabela 2- Graus de gravidade do dengue hemorrágico (19) (26).

Grau	Clínica
I	Febre com sintomas não específicos
II	Para além das manifestações do grau I, hemorragias espontâneas na forma de sufusões e /ou outras
III	Falência circulatória, com pulso rápido e fraco, diminuição da tensão arterial diferencial (de 20 mm Hg ou menos) ou hipotensão, com pele fria, viscosa e agitação
IV	Choque profundo com pulso e tensão arterial não detectáveis.

O dengue hemorrágico, segundo a OMS é definido pela combinação de quatro manifestações clínicas (4 manifestações major):

1- Febre;

2- Episódios hemorrágicos com pelo menos a presença de um dos seguintes episódios: uma sequência do teste de torniquete positivo (teste também chamado de teste de fragilidade capilar: método de diagnóstico clínico para determinar a tendência hemorrágica de um doente e avaliar a fragilidade das paredes dos capilares); petéquias, equimoses ou púrpura ou sangramento das mucosas do tracto gastrointestinal, injeção entre outras;

3- Extravasamento do plasma devido ao aumento da permeabilidade capilar;

4- Trombocitopenia ($100\ 000/\text{mm}^3$ ou inferior). Trombocitopenia moderada a acentuada com hemoconcentração é um dado clínico característico de dengue hemorrágico (26) (42) (43).

Os primeiros sintomas do DF e DHF são indistinguíveis, mas o dengue hemorrágico está associado com manifestações hemorrágicas, extravazamento do plasma resultante de

um aumento da permeabilidade vascular e trombocitopenia. Extravasamento do plasma é caracterizado pela hemoconcentração (hematócrito acima dos 20%), desenvolvimento de ascite ou derrame pleural. O DHF distingue-se do DF pela presença de um compromisso cardiovascular que ocorre quando o extravasamento do plasma para os espaços intersticiais resulta em estado de choque (30).

A nível laboratorial a trombocitopenia é uma característica muito comum e há uma função plaquetária anormal. O prolongamento moderado do tempo de protrombina (PT) e trombotestina parcial (APTT) com níveis de fibrinogénio reduzidos é comum. Pacientes com síndrome de choque do dengue têm anormalidades significativas em todas as principais vias da cascata da coagulação (33).

Síndrome de choque de dengue

A Síndrome de choque do dengue é a forma mais grave do dengue hemorrágico e é caracterizada pela presença de todas as quatro manifestações clínicas do dengue hemorrágico e por insuficiência circulatória. Todas as manifestações de insuficiência circulatória devem estar presentes: pulso rápido e fraco, pressão de pulso estreito ou hipotensão, pele húmida e fria e estado mental alterado (26).

A elevação máxima do hematócrito coincide com o estado de choque. A contagem de plaquetas atinge os níveis mais baixos também durante o choque. O choque pode ocorrer com uma frequência 4 a 5 vezes mais elevada, no momento das descidas de febre ou após as primeiras 24 horas após a febre, do que durante a fase febril.

Alguns sinais de alarme são indicadores da iminência do choque tais como, a dor abdominal intensa e contínua, vômitos frequentes, sonolência e/ou irritabilidade, bem como uma diminuição brusca da temperatura levando a hipotermia (4).

A perda de sangue é rara tanto em DHF como em DSS e esta está presente em grande parte restrita ao tracto gastrointestinal. Isto geralmente ocorre devido ao choque prolongado resultando no desvio de sangue para longe a partir do tracto gastrointestinal levando a anoxia, morte celular e hemorragias gastrointestinais (23). Com o choque prolongado, a consequente hiperfusão dos órgãos resulta numa deficiência orgânica progressiva, acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada. Isto, por sua vez leva a uma hemorragia grave causando uma diminuição do hematócrito em choque severo.

Manifestações clínicas atípicas do dengue

As características clínicas atípicas do dengue estão sendo cada vez mais frequentemente relatadas. Estas incluem encefalopatia, miocardite, hepatite, pancreatite, retinite e síndrome de insuficiência respiratória aguda (SARS). Estas apresentações atípicas reflectem a patologia em diferentes superfícies endoteliais (41).

FISIOPATOLOGIA

Os mecanismos que conduzem às manifestações graves da infecção com o vírus do dengue ainda não se encontram totalmente compreendidos, contudo trata-se de processo multifactorial.

O processo de imunopatogênese da infecção pelo vírus do dengue envolve respostas imunitárias específicas do hospedeiro incluindo, a activação de células imunes, a libertação de citocinas (IL-1B, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18, factor de inibição da migração dos macrófagos (MIF), TNF- α , IFN- γ e quimiocinas (IL-8, MCP-1), a activação do complemento, a produção de mediadores inflamatórios e a auto-imunidade (28).

Os fenótipos graves do dengue não são observados no momento em que a carga viral é mais elevada *in vivo*, mas paradoxalmente quando o vírus é rapidamente eliminado dos tecidos do hospedeiro pela resposta imune inata e adaptativa, o que levou à sugestão de que a patogénese da doença está intimamente relacionada com a resposta imune do hospedeiro (41).

Após a picada do mosquito infectado e introdução do vírus na pele, pensa-se que as células de Langerhans, células dendríticas inicialmente imaturas na derme são as primeiras células a serem infectadas (41). As células dendríticas infectadas, amadurecem e migram do local de infecção para os nódulos linfáticos onde apresentam os antígenos virais às células T, iniciando uma resposta imune celular e humoral. Em consequência disso, a infecção é amplificada e o vírus é disseminado pelo sistema linfático. Como resultado desta viremia primária, várias células de linhagem mononuclear incluindo, monócitos derivados do sangue, células dendríticas mielóides e macrófagos do baço e fígado são infectados (23).

Após infecção secundária, com um vírus do dengue heterólogo, elevadas concentrações de anticorpos pré-existentes com baixa capacidade de neutralização vão-se ligar ao novo vírus, formando complexos antígeno- anticorpo, que vão ser internalizados por células mononucleares, especialmente macrófagos através do receptor para a porção constante dos anticorpos (Fc). Este fenómeno pode facilitar a infecção e é denominado ADE (antibody-dependent enhancement) (30).

ADE- Teoria dos anticorpos potencializadores de infecção

Estudos epidemiológicos mostraram um aumento do risco de desenvolvimento de DHF/DSS, após infecção secundária com o vírus do dengue.

Halsted e colegas observaram que a incidência de dengue hemorrágico (DHF) e síndrome de choque do dengue (DSS) atingiu um pico em duas populações de crianças. Um pico ocorreu em crianças (6-9 meses) que foram infectadas com serotipo DEN diferente daquele que tinha infectado as suas mães. A doença grave ocorreu em crianças para quem os anticorpos maternos caíram para níveis baixos, sub-neutralizantes. O outro pico foi observado em crianças que anteriormente tinham sido infectadas com um serotipo e posteriormente foram infectadas com um serotipo DEN diferente. Estas observações levaram à conclusão que a infecção subsequente de indivíduos pré-ímmunes com um serotipo DEN diferente poderia exacerbar a doença em vez de a atenuar. Este fenómeno foi reivindicado ser causado por anticorpos e denominado ADE (anticorpos potencializadores de infecção) (23).

Geralmente, os anticorpos protegem o hospedeiro contra a maioria das infecções virais de várias formas, incluindo a neutralização do vírus, opsonização e lise das células infectadas pelo vírus (44).

Segundo ADE, os anticorpos heterólogos pré-existentes resultantes de uma infecção anterior pelo vírus do dengue, não neutralizam o segundo vírus infectante de serotipo diferente e amplificam a infecção pelo vírus.

Estes anticorpos formam complexos antigénio-anticorpo que são reconhecidos e internalizados principalmente por macrófagos, através de receptores para a porção constante dos anticorpos (Fc), sem neutralizar o vírus. Uma vez que os anticorpos não neutralizam este segundo vírus, este acaba por replicar dentro do macrófago, o que permite um aumento do número de células infectadas levando a uma grande carga viral (Figura 10) (44).

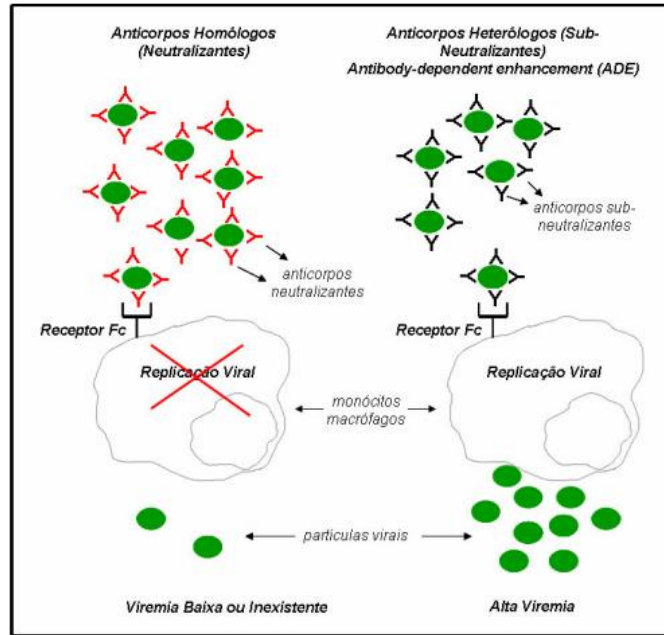


Figura 10: Representação esquemática da teoria dos anticorpos potencializadores de infecção.

Linfócitos T de memória CD4+ e CD8+ específicos para o vírus são induzidos após a infecção com o vírus do dengue. Supõe-se que um ciclo de retroação positiva que existe em ADE aumenta o número de células apresentadoras de antígeno que desempenham funções de apresentação do vírus às células T, bem como a sua activação (11).

A activação, proliferação e secreção de citocinas nos tecidos por linfócitos T de memória que reconhecem péptidos conservados e alterados criam um meio inflamatório durante as infecções secundárias (39).

A produção excessiva de citocinas leva a um aumento da permeabilidade vascular, o que se traduz por um extravasamento do plasma, alteração fisiopatológica fundamental do dengue, por meio do qual água e proteínas escapam para o espaço extravascular, resultando em hemoconcentração e por vezes em choque hipovolémico. A infecção viral induz a apoptose dos linfócitos T ao longo dos primeiros dias de infecção o que, de acordo com a sua gravidade, pode exercer uma influência favorável no desaparecimento do vírus, ou pode causar a lise de grandes quantidades destas células e transitoriamente diminuir a competência imunológica do doente, assim como causar danos a outras células e tecidos do hospedeiro, tais como o endotélio, os hepatócitos, miocardiócitos, neurónios, células tubulares renais entre outras, o que pode explicar o dano de muitos órgãos durante a infecção (Figura 11) (4).

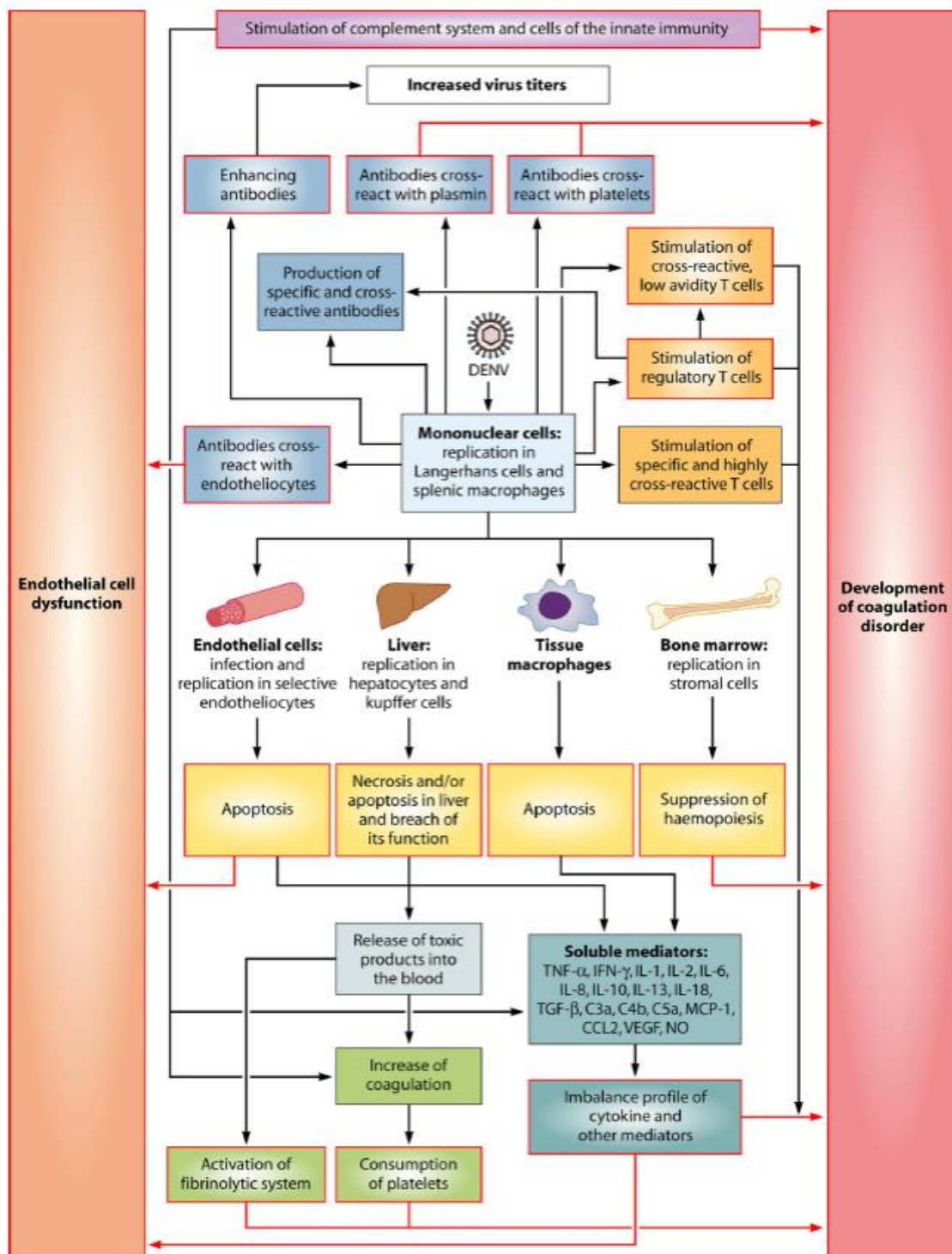


Figura 11: Modelo proposto para a patogénese de DF, DHF e DSS. As caixas coloridas com centro branco indicam os eventos patológicos (23).

O papel dos linfócitos T no dengue grave

Os linfócitos T de memória são sugeridos estar implicados no desenvolvimento de DHF.

De acordo com a teoria do pecado original das células T, as células T de memória de reactividade cruzada, geradas durante uma infecção primária expandem-se selectivamente (expansão clonal de células T) durante uma infecção secundária com outro serotipo viral antes da activação das células T naïves de maior avidéz para o segundo serotipo. Estas células T de memória de reactividade cruzada produzem concentrações elevadas de citocinas inflamatórias e podem contribuir para a patogénese da infecção, sendo responsáveis pelo extravasamento do plasma (45) (46).

Como resultado ou não da teoria do pecado original das células T, as citocinas desempenham um papel importante na fisiopatologia do dengue, devido especialmente aos seus efeitos pró-inflamatórios nas células endoteliais vasculares (47).

Vários estudos têm demonstrado que as concentrações de várias citocinas, quimiocinas e outros mediadores, bem como de receptores solúveis, estão significativamente aumentados durante as infecções graves do dengue. Níveis plasmáticos aumentados de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, TGF-1 β , TNF- α e INF- γ foram encontrados em pacientes com infecções de dengue graves em particular em doentes com DSS (Tabela 3). Outros mediadores e factores solúveis encontram-se aumentados na doença grave e incluem o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), factor estimulante de colónias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), proteína quimioattractora de monócitos1 (MCP-1), factor inibidor da migração de macrófagos (MIF), trombopoetina, molécula de adesão celular (VCAM-1), ICAM-1, factor de von Willebrand, trombomodulina, E-selectina, factor tecidual (TF), inibidor do activador do plasminogénio (PAI-1) e activador do plasminogénio tecidual (23).

A inexistência de bons modelos animais da doença é um obstáculo para a compreensão do papel das células T de memória e imunopatogenese (41).

Tabela 3: Principais citocinas implicadas no processo de patogénese da infecção pelo vírus do dengue.

IL-1 β	Principal mediador da activação plaquetária induzido pelas células endoteliais, causando uma maior libertação de quimiocinas e regulação positiva de VCAM-1 que, por sua vez promove a adesão de monócitos ao endotélio. IL-1 estimula o hipotálamo e, conseqüentemente a hipófise a produzir mediadores anti-inflamatórios.
IL-2	Desempenha um papel central na regulação da resposta imunológica. Actua como indutor potente da proliferação dos linfócitos T e em menor grau dos linfócitos B. Estimula a síntese de IFN- γ e TNF- α e pode danificar o endotélio.
IL-6	IL-6 é um importante mediador na indução da febre e no aumento de produção de proteínas de fase aguda no fígado. É produzida por macrófagos activados e células endoteliais. Em conjunto com outras citocinas pró-inflamatórias, IL-6 potencia a cascata da coagulação e fibrinólise.
IL-8	Citocina produzida abundantemente pelos monócitos, hepatócitos e células endoteliais. IL-8 tem um efeito sobre a expressão de moléculas de adesão tais como ICAM-1 e VCAM-1.
IL-10	É produzida por monócitos e linfócitos T CD4 ⁺ e pode causar a deterioração das plaquetas. A IL-10 é conhecida como citocina imunossupressora. A citocina diminui a expressão da resposta inflamatória e cria um ambiente de sobrevivência proviral.
TNF- α	É libertado a partir de monócitos infectados pelo vírus do dengue. É um activador potente das células endoteliais, sendo implicada no aumento da permeabilidade vascular. É também responsável pela activação do sistema de fibrinólise. Aumenta a expressão de ON e medeia a morte induzida pela activação de células T, tendo sido implicado na supressão de células T periféricas.
TGF- β	Pode actuar como citocina pró-inflamatória ou anti-inflamatória em função da sua concentração.
MCP-1	Provoca aberturas nas junções apertadas do endotélio <i>in vitro</i> e induz alterações na permeabilidade endotelial <i>in vivo</i> .

Auto-imunidade

Não só a exposição prévia a um serotipo heterólogo justifica a possibilidade de ocorrer doença grave em infecções subsequentes. A proteína NS1 também foi implicada estar envolvida na capacidade de induzir doença autoimune em alguns doentes. Anticorpos dirigidos contra a proteína NS1 (anti-NS1) apresentam reactividade cruzada com as plaquetas sanguíneas e células endoteliais resultando em disfunção plaquetária e danos no endotélio (45) (23).

Complemento

O sistema do complemento é um dos principais componentes da imunidade inata e interage intimamente com o sistema hemostático de modo a fornecer a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos (23).

Os anticorpos contra o vírus do dengue também podem ligar-se a proteínas do complemento e promover a sua activação. A activação do complemento é uma característica do dengue grave e, encontra-se relacionada com o extravasamento do plasma (30).

Elevadas concentrações de C3a e C5a foram detectadas no soro de doentes com dengue grave. Estes produtos de clivagem do C3 e C5 são anafilotoxinas que promovem a quimiotaxia de células do sistema imunológico e contribuem para a resposta inflamatória (45).

A ligação de anticorpos contra a proteína NS1 expressa pelo vírus do dengue em células infectadas tem sido relatado resultar na activação do complemento. Além disso, acredita-se que NS1 libertada a partir de células infectadas, pode activar directamente factores do complemento presentes no processo de extravasamento do plasma. A produção do complexo C5b-C9 pode então provocar reacções celulares e estimular a produção de citocinas inflamatórias que estão associadas ao desenvolvimento de DHF/DSS (23).

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce do dengue continua sendo um desafio (48).

Em casos de surtos de dengue, o laboratório tem um papel essencial na detecção precoce e notificação dos primeiros casos. Os testes laboratoriais são importantes para a identificação precisa do agente etiológico e determinação da sua origem (20).

Os países em desenvolvimento podem não ter recursos necessários para realizar estes testes caros de diagnóstico confirmativo de dengue e, portanto, muitos dos casos de suspeita de dengue não são totalmente diagnosticados. Estes países, que não têm acesso a testes laboratoriais sofisticados, contam com a identificação de indicadores clínicos de laboratório simples que podem fornecer um diagnóstico confiável do dengue antes do internamento (26).

Diagnóstico diferencial

O diagnóstico do dengue começa com suspeita clínica, suscitada pelo reconhecimento de um conjunto de sinais e sintomas que este apresenta. Na fase febril aguda precoce da doença, doentes com dengue apresentam frequentemente, história de febre de início súbito que é muitas vezes acompanhada de náuseas, dores e mau estar. Infelizmente, estes sintomas não são exclusivos do dengue e são relatados em outras doenças febris. O aparecimento da erupção cutânea maculopapular, dor retro-orbital, petéquias ou sangramento do nariz ou gengivas são mais patognomônicos do dengue e, provavelmente desencadeiam um diagnóstico diferencial do dengue, embora estes sintomas apareçam em estádios mais avançados da doença (48).

A febre do dengue pode ser facilmente confundida, sobretudo em situações não-epidémicas. Dependendo da origem geográfica do paciente, outras etiologias deverão ser excluídas. Estas incluem o vírus da febre-amarela, encefalite japonesa, encefalite St. Louis, *West Nile*, alfavírus (como o *chikungunya*) e ainda, outras causas de febre como a malária, leptospirose, febre tifóide, sarampo, riquetsioses, enterovírus, vírus influenza e doenças gripais e febres hemorrágicas (Ébola, hantavírus, febre hemorrágica do Crimeia-Congo entre outras) (14).

Diagnóstico laboratorial

Como o diagnóstico clínico baseado na combinação da história clínica e sintomas carece de especificidade, um diagnóstico definitivo da infecção pelo vírus do dengue requer confirmação laboratorial (30).

No entanto, este diagnóstico laboratorial do dengue nem sempre está disponível no momento do atendimento.

Vários métodos laboratoriais estão disponíveis para uso no diagnóstico (Figura 12) (48).

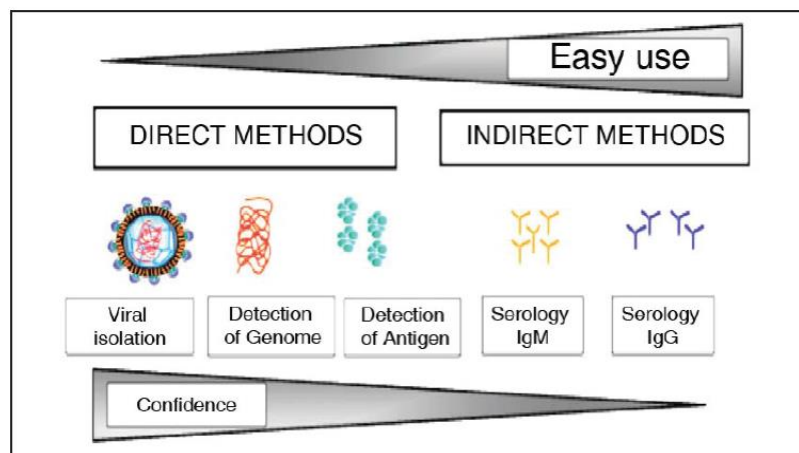


Figura 12: Métodos de diagnóstico do dengue (4).

Para a escolha do teste de diagnóstico é importante também ter em conta o tempo aproximado do início da doença em que cada um dos testes deve ser utilizado (Figura 13).

O diagnóstico do dengue divide-se em duas fases: Fase I, com febre e viremia acompanhadas da presença de antígenos NS1 no sangue; e fase II, correspondendo ao período pós-febril inicial com duração de algumas semanas, quando os anticorpos IgM e IgG estão presentes. Durante a infecção primária, a fase de viremia coincide mais ou menos com a febre (Figura 13). Contudo, durante uma infecção secundária, a duração da viremia pode ser de 2 ou 3 dias, enquanto, a presença de antígenos NS1 no sangue dura um pouco mais.

A importância do diagnóstico das duas fases da infecção pelo vírus do dengue deve ser entendida pelo médico. Normalmente, a detecção de anticorpos recentemente formados (IgM), não é possível depois dos picos de viremia ou após desaparecimento da febre.

As síndromes do dengue diferem na sua apresentação. No dengue clássico, por causa do início agudo de febre e mal-estar, os pacientes geralmente procuram atendimento médico dentro dos primeiros 2 dias de febre. Nesta fase, o diagnóstico é possível apenas através da detecção de viriões, RNA, ou proteínas de dengue no sangue. O diagnóstico serológico não vai ser positivo até defervescência (isto é, redução da febre). Se for pedido um teste sorológico, o paciente deve fazer uma segunda colheita de sangue após a febre terminar. Nos pacientes com DHF / DSS, a permeabilidade vascular é geralmente reconhecido pela defervescência, altura em que a pesquisa de anticorpos IgM deve ser positiva, mas ensaios para a detecção de viriões, RNA viral, ou proteínas de dengue podem ser negativos (22).

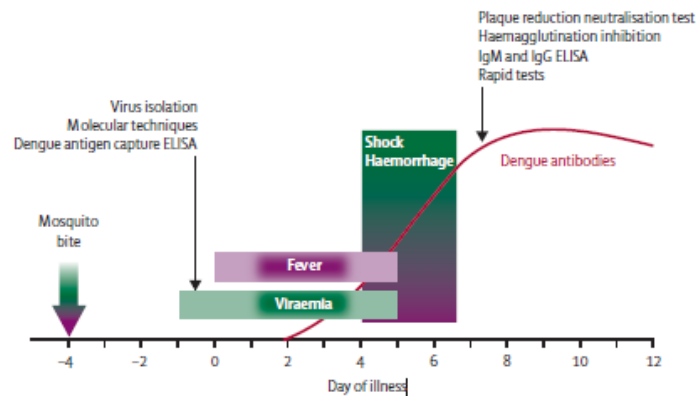


Figura 13: Curso da infecção por dengue e testes de diagnóstico (22)

Resultados positivos para um dos seguintes métodos confirmam o diagnóstico laboratorial do dengue:

- 1) Isolamento e identificação do vírus do dengue em amostras de sangue (soro ou plasma) ou fragmentos de órgãos obtidos pós-morte (fígado, baço, rim, coração, pulmão, sistema nervoso);
- 2) Detecção do RNA viral pela reacção de RT-PCR;
- 3) Detecção da proteína não estrutural NS1;
- 4) Aumento no soro de títulos de anticorpos IgG;
- 5) Detecção de anticorpos IgM específicos para o dengue numa única amostra de soro ou;
- 6) Demonstração da presença do antígeno viral (49).

Diagnóstico virológico

Para o isolamento viral é requerida uma amostra de soro/plasma de um doente no estado agudo da doença (fase de viremia) (30). A fase de viremia pode ser detectada a partir do 2º ou 3º dia antes do início dos sintomas, até um máximo de 4 a 5 dias após o início da doença, para a infecção primária e secundária, respectivamente (48).

Uma vez que o pico de viremia ocorre ainda antes do aparecimento dos sintomas, os níveis de vírus no soro tendem a cair de forma significativa, na altura em que o doente procura o atendimento médico (30).

A inoculação das amostras em mosquitos é o sistema mais sensível para o isolamento do vírus do dengue, podendo ser usadas tanto larvas como mosquitos adultos. Em geral preferem-se mosquitos *Toxorhynchites*, pois estes são maiores que *Aedes* e não são hematófagos. Contudo, machos adultos de *A. aegypti* e *A. albopictus* também são utilizados.

As linhagens celulares usadas são também provenientes de mosquitos e mostraram-se bastante eficazes no isolamento viral. A linhagem de células C6/36, derivada do *A. albopictus*, é a linhagem de escolha para o isolamento viral.

A identificação do agente viral isolado é geralmente feita através de técnicas de imunofluorescência indirecta (IF) utilizando anticorpos monoclonais anti-dengue serotipo-específicos sobre as células em cultura. As amostras no geral são primeiro testadas por IF utilizando um anticorpo policlonal como triagem. Posteriormente, os resultados positivos serão confirmados com anticorpos monoclonais específicos para cada um dos quatro serotipos do dengue.

A cultural viral demora muito tempo e o trabalho é intensivo. O material infeccioso deve ser mantido no frio e um Nível de Segurança Laboratorial 3 é necessário. As amostras de lavado brônquico do paciente e tecidos obtidos a partir de autópsias de casos fatais, especialmente fígado, baço, nódulos linfáticos e timo também podem ser utilizadas.

O isolamento viral em cultura de células é um processo demorado que mimetiza a replicação do vírus nas células do hospedeiro e, por isso, pode não ser o método de diagnóstico mais desejável na rotina de identificação de infecções agudas (50).

Deteção de genoma viral (RNA viral)

A deteção do genoma viral por PCR não é uma técnica menos complexa e dispendiosa comparativamente à cultura viral. Contudo é mais rápida, mais sensível e permite a deteção de partículas virais em amostras de soro contendo poucas cópias de genoma viral (51).

A reacção de polimerase em cadeia tornou-se uma importante ferramenta no diagnóstico do dengue. Novos protocolos e metodologias de PCR têm surgido, permitindo uma rápida deteção e quantificação do RNA viral. Estes métodos utilizam a metodologia de RT-PCR. Uma vez que o genoma viral é RNA, a amplificação do DNA é precedida por uma reacção de transcrição reversa de modo a produzir DNA complementar (cDNA). Vários iniciadores e protocolos têm sido desenvolvidos utilizando os sistemas convencionais de RT-PCR e PCR em tempo real, utilizando SYBR-green como marcador fluorescente ou na deteção de sondas oligonucleotídicas marcadas.

Estes ensaios usam primers específicos, que se ligam a regiões conservadas conhecidas do genoma, de modo a evitar a obtenção de resultados falsos negativos devido a mutações espontâneas esperadas em consequência da replicação do genoma viral.

A sensibilidade de RT-PCR é altamente dependente da pequena janela que coincide com o período de viremia e que pode durar até 8 dias após o início da doença. No entanto, RT-PCR raramente é positiva após 6 dias do início da doença.

Além de amostras de sangue, a RT-PCR também foi usada para detectar RNA viral em tecidos (48).

O uso da PCR tem como principais vantagens o facto de se poder detectar genoma viral em amostras degradadas por longos períodos de tempo; permite a vigilância entomológica, ou seja, o controle das espécies de mosquitos que estão envolvidas na transmissão do vírus; permite a identificação dos serótipos responsáveis por um dado surto de infecção; e permite estudar a variabilidade genética das estirpes com o objectivo de identificar a origem de epidemias e revelar marcadores de virulência.

Esta técnica é altamente sensível e de particular valor no diagnóstico precoce da infecção com o vírus do dengue, mas no momento, só se encontra disponível em laboratórios de investigação. As técnicas de PCR requerem equipamento específico e instalações físicas apropriadas além de ser necessário uma extensa avaliação dos protocolos adequados às condições do espaço que o laboratório dispõe (50).

Diagnóstico sorológico

Os testes sorológicos são, sem dúvida, os testes de diagnóstico mais frequentemente utilizados no diagnóstico da infecção pelo vírus do dengue. Os custos são relativamente mais baixos, e a metodologia mais simples comparativamente aos métodos de diagnóstico anteriores (PCR e cultura viral) (4).

O diagnóstico sorológico permite a detecção de anticorpos específicos para o vírus do dengue (IgM e IgG), complementa o diagnóstico virológico e, quando estes não estão disponíveis, funciona com um meio alternativo para o diagnóstico (49).

A resposta dos anticorpos à infecção varia consoante o estado imunitário da pessoa. Uma resposta primária de anticorpos é observada em pessoas que não são imunes ao dengue e, uma resposta imunitária secundária é observada em doentes que tenham tido uma infecção anterior com o vírus do dengue.

Uma infecção primária é caracterizada por uma resposta lenta e um menor título de anticorpos. Os anticorpos IgM são os primeiros a surgir e podem ser detectados relativamente cedo, cerca de 3-5 dias após o início da doença. Os seus níveis aumentam atingindo um pico na 2ª semana após início da febre e, em seguida, diminuem para níveis não detectáveis nos 2-3 meses seguintes (Figura 14) (52). Para um diagnóstico definitivo é necessário a utilização de duas amostras de soro, de modo a observar um aumento dos títulos de IgM.

Relativamente aos anticorpos IgG, durante a infecção primária só podem ser detectados após 10 dias do início da doença, tornando a sua pesquisa menos útil para o diagnóstico precoce. No entanto, um aumento rápido dos níveis de IgG durante a infecção secundária pode ser indicativo de dengue quando a proporção de IgM e IgG é utilizada (48).

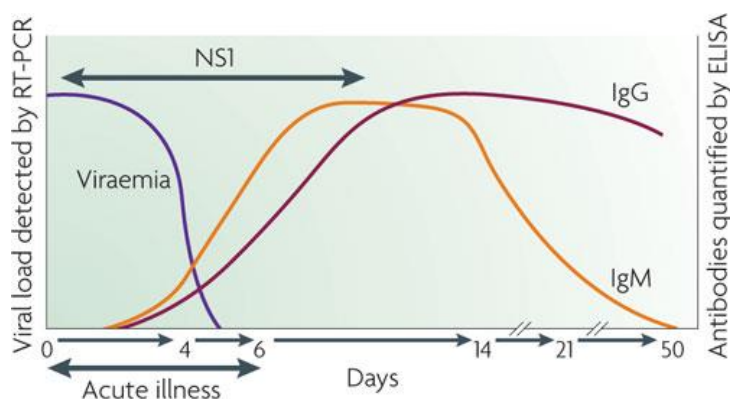


Figura 14: Vírus do dengue, respostas dos antígenos e anticorpos utilizados no diagnóstico (52).

A técnica de inibição da hemaglutinação (HI) é a técnica sorológica mais aceita, contudo como é muito demorada, a técnica de ELISA tornou-se a técnica frequentemente mais usada.

A detecção de IgG pelo método de ELISA é amplamente utilizada sobretudo para a classificação do tipo de infecção (primária ou secundária). A detecção de anticorpos IgM utilizando ELISA representa um dos avanços mais importantes no diagnóstico laboratorial do dengue. A técnica de captura de IgM por ELISA (MAC-ELISA) é baseada na detecção específica de IgM anti-dengue no soro através da sua captura utilizando anticorpos anti-IgM humana previamente adsorvida à fase sólida (50).

As técnicas de ensaio são relativamente simples e existem vários kits de diagnóstico comerciais, dos quais os ensaios baseados na detecção de IgM são os mais vulgarmente utilizados em diagnóstico de rotina.

A principal desvantagem dos testes sorológicos é o risco considerável de resultados falsos positivos devido há potencial reactividade cruzada com outros flavivírus, por exemplo a vacinação contra o vírus da febre-amarela (30).

Deteção do antígeno NS1

Devido às desvantagens dos métodos sorológicos para o diagnóstico das infecções agudas de modo fiável, métodos alternativos baseados na detecção da proteína viral NS1 têm sido desenvolvidos.

NS1 é uma glicoproteína produzida por todos os flavivírus e é essencial para a replicação viral. Uma vez que esta proteína é secretada para o sangue, muitos testes foram desenvolvidos para diagnosticar infecções pelo vírus do dengue usando a proteína NS1 (52).

A quantidade de NS1 secretada no soro do doente correlaciona-se com a viremia e gravidade da doença. NS1 é detectável no soro pela técnica de ELISA, a partir do primeiro dia de febre até 9 dias após a infecção, podendo persistir até 18 dias a partir do início da doença em alguns casos (48).

Técnicas de ELISA baseadas na proteína NS1 tornaram-se assim, uma importante ferramenta de diagnóstico para amostras na fase aguda da doença em que os anticorpos IgM ainda não são detectáveis e onde a técnica de PCR ainda não está disponível. Vários

kits comerciais para a detecção do antígeno NS1 também já se encontram disponíveis e são amplamente utilizados em países endêmicos e não endêmicos (30).

Diagnóstico laboratorial do dengue em Portugal

Em Portugal, o INSA (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge) é o laboratório de referência para o diagnóstico do Dengue. O diagnóstico é feito pela demonstração laboratorial da infecção pelos seguintes métodos:

1. Serologia- em Portugal os métodos usados são a imunofluorescência (INSA) e a imunocromatografia (Instituto de Higiene e Medicina Tropical)

O diagnóstico serológico é feito pela detecção de IgM para vírus do dengue na fase aguda da doença (no sangue e também no LCR se houver sinais ou sintomas do envolvimento do SNC) ou subida de 4 vezes o título de IgG entre uma primeira amostra colhida no início dos sintomas e uma 2ª amostra cerca de 4 semanas depois.

2. PCR- detecção do vírus no sangue (e no líquido se houver sinais ou sintomas de infecção do SNC). A PCR efectua-se no INSA, mas não é, no contexto epidemiológico de Portugal, considerada um exame de 1ª linha (19).

TRATAMENTO/ PREVENÇÃO

Actualmente nem vacinas eficazes nem fármacos estão disponíveis para a prevenção e tratamento da doença causada pelo vírus do dengue. O tratamento é meramente sintomático e, para além das hemorragias fatais e do choque, que são tratados por reposição de fluídos, o tratamento da febre menos grave do dengue é limitado ao uso de analgésicos (51). Contudo, estão contra-indicados a administração de aspirina (anti-plaquetário) e anti-inflamatórios não esteróides, uma vez que estes podem causar hemorragias.

Dependendo da progressão da doença, para um dengue hemorrágico leve, uma terapia de re-hidratação oral é suficiente, enquanto a fluidoterapia endovenosa é sugerida para manifestações mais graves e transfusão de sangue é requerida para casos mais críticos (48).

O sucesso do tratamento vai depender essencialmente do reconhecimento precoce da doença.

A prevenção e controlo é actualmente limitado a medidas de controlo de vectores. O controlo de vectores é alcançado principalmente através da eliminação dos habitats, ou seja dos recipientes que favorecem a sobrevivência dos vectores, ou onde eles depositam os ovos e ocorre o desenvolvimento das suas fases aquáticas (10).

A nível individual o único método de prevenir e controlar a infecção pelo vírus é evitar a picada do mosquito infeccioso. Embora isso possa ocorrer evitando viagens para áreas onde o dengue é endémico, não é uma estratégia ideal, uma vez que exige que as pessoas evitem a maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo, regiões para as quais viajam muitas vezes em trabalho (53). Perante isto outras medidas de prevenção são necessárias e incluem: o uso roupas claras e que protejam a maior superfície corporal possível ou uso de vestuário de protecção; uso de redes mosquiteiras; aplicação de repelente nas áreas do corpo expostas e na roupa; evitar permanecer em zonas ao ar livre, preferindo espaços fechados com ar condicionado; e evitar zonas onde existam águas paradas (19).

VACINA - PERSPECTIVAS FUTURAS

A importância do desenvolvimento de uma vacina capaz de proteger a população mundial é fundamental. Como não existem medicamentos antivirais disponíveis, e os programas de controlo de vectores têm falhado na prevenção de surtos de dengue, a vacinação parece ser a opção mais viável para prevenir uma infecção (54).

Ao contrário de outros flavivírus, como o vírus da encefalite japonesa e da febre amarela, ainda não existe, nenhuma vacina licenciada contra o dengue (30).

Existem muitos obstáculos ao desenvolvimento de uma vacina contra o dengue. Entre eles, o facto de a fisiopatologia da doença ainda não ser totalmente compreendida e a falta de um modelo animal que reproduza a doença, representam os grandes obstáculos. Contudo, o crescente conhecimento da patogénese do dengue está oferecendo mais perspectivas sobre o melhor projecto de uma vacina (25).

A vacina ideal contra o dengue deve proporcionar uma protecção homotípica e heterotípica de longo prazo. Portanto, existem vários factores, que requerem consideração. Em primeiro lugar, a vacina deve ser tetravalente, ou seja, ser capaz de induzir uma protecção forte e de longa duração contra os quatro serótipos do dengue. Em segundo lugar, a imunização deve ser segura, e não causar efeitos colaterais intoleráveis, causados por reacções cruzadas de anticorpos ou reacção cruzada de células T. Em terceiro lugar, o custo deve ser acessível para as pessoas que mais necessitam das vacinas (25).

Outros factores explicam ainda a baixa taxa de desenvolvimento de vacinas contra o dengue, tais como o facto de os surtos serem sazonais, e a incidência da doença variar de ano para ano, obrigando a que, estudos para avaliar a eficácia de uma candidata a vacina, sejam efectuados em períodos com níveis elevados de infecções. O facto de ocorrer uma baixa taxa de mortalidade das infecções pelo vírus do dengue, foi também, até certo ponto, um desincentivo ao desenvolvimento de vacinas, especialmente porque o desenvolvimento de uma vacina eficaz e segura deve ser disponibilizada às populações de áreas endémicas, em vez de se desenvolver uma vacina para turistas, ou vacinas para grupos especiais como por exemplo, os militares (6).

As primeiras candidatas a vacinas contra o dengue foram avaliadas em 1929. Porém não se obtiveram os resultados desejados.

Mais de 80 anos de pesquisa e desenvolvimento de vacinas passaram, e mais de 25 candidatas a vacinas foram testadas em ensaios clínicos na última década. O aumento do

esforço para o desenvolvimento de uma vacina na última década deveu-se principalmente a uma maior consciência da pandemia do dengue e ao desenvolvimento de novas técnicas moleculares (55).

Actualmente, um grande número de vacinas candidatas encontram-se em várias fases de desenvolvimento. Estas incluem: vacinas contendo vírus vivos atenuados; vacinas de vírus vivos quiméricos; vacinas de vírus inactivos; vacinas recombinantes; vacinas de subunidades; ou vacinas de DNA (25).

A vacina que se encontra na fase mais avançada de estudos (fase III) consiste numa vacina tetravalente de vírus vivos atenuados (53). Esta vacina foi desenvolvida em 2000, pela empresa farmacêutica Sanofi Pasteur que produziu uma geração de vacinas de vírus vivos atenuados para cada um dos quatro serótipos do vírus do dengue, usando a tecnologia de DNA recombinante e, que teve como base a vacina do vírus da febre amarela (estirpe 17D).

Os vírus que compõe a vacina recombinante foram construídos por meio da substituição dos genes que codificam para as proteínas de pré-membrana (prM) e do invólucro (E) da estirpe utilizada na vacina da febre amarela, pelos respectivos genes dos quatro serótipos do vírus do dengue. Consiste, portanto numa vacina tetravalente que contem as estirpes recombinantes resultantes (CYD1, CYD2, CYD3 e CYD3) numa única vacina (Figura 15) (56).

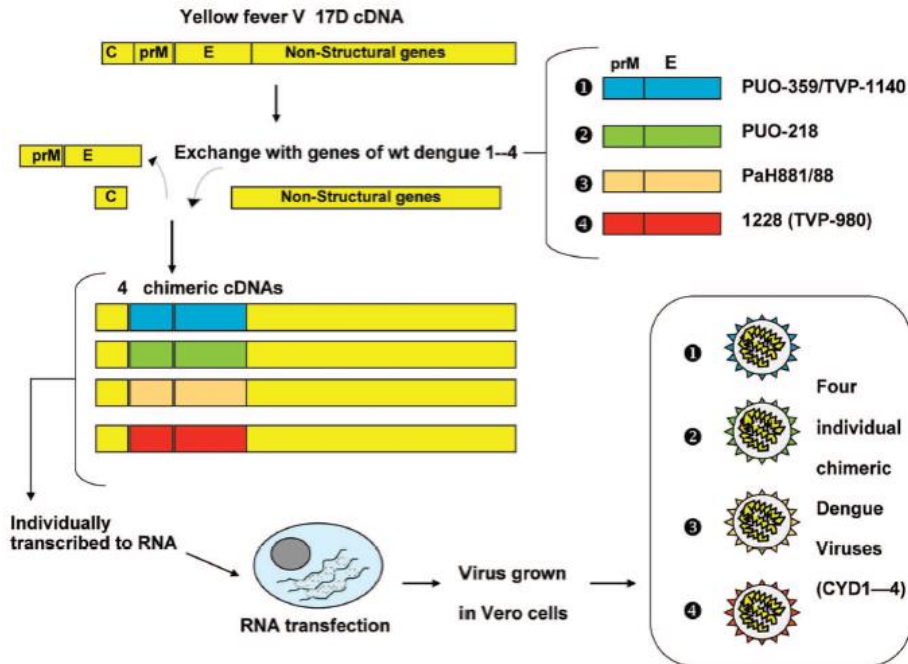


Figura 15: Desenvolvimento da vacina usando a tecnologia de DNA recombinante (56)

Esta vacina demonstrou a capacidade de induzir respostas imunes amplas e equilibradas contra os quatro serótipos do dengue em crianças e adultos de áreas endêmicas e não-endêmicas com um esquema de vacinação de 3 doses aos 0, 6 e 12 meses (57).

A empresa farmacêutica francesa, Sanofi Pasteur anunciou resultados positivos com a sua vacina em seres humanos. Esta vacina já foi administrada a pessoas de diferentes lugares do mundo que habitam em regiões onde há grande possibilidade de contrair a doença e, após a vacinação foi observado que mesmo estando expostos ao vírus do dengue, ninguém chegou a desenvolver a doença, pois o sistema imunitário já tinha sido capaz de desenvolver anticorpos contra o vírus do dengue.

Durante os testes em humanos não foram observados quaisquer efeitos colaterais importantes, apenas a dor e vermelhidão no local de aplicação o que é comum na administração da maioria das vacinas.

Estima-se que no final de 2014 sejam conhecidos os resultados dos estudos de fase II e que em 2015 esta vacina já esteja disponível no mercado após a conclusão de todos os testes nos humanos e ter sido aprovada (58).

CONCLUSÃO

Infecções virais emergentes e re-emergentes são historicamente uma preocupação importante e crucial para os biólogos, epidemiologistas, virologistas e veterinários.

O mundo globalizado e interconectado de hoje aumenta os factores sociais, políticos e económicos, permitindo o rápido e fácil acesso de agentes patogénicos virais a novos ambientes e populações.

O dengue continua a ser uma ameaça crescente de saúde pública em muitas partes do mundo.

O diagnóstico laboratorial demonstrou uma grande importância no diagnóstico das infecções pelo vírus do dengue uma vez que, muitas das manifestações clínicas não são exclusivas do dengue, e podem ser facilmente confundidas com outras doenças. No entanto, quando o diagnóstico com base no laboratório é requerido, muitas das vezes é necessário recorrer a várias técnicas de diagnóstico disponíveis e não se restringir a uma única metodologia.

No futuro, enquanto se espera pelo licenciamento de uma vacina eficaz contra os vários serótipos do dengue, medidas de prevenção são importantes. A redução dos casos de dengue grave passa também pelo reconhecimento clínico precoce da doença e início oportuno de terapias de suporte.

BIBLIOGRAFIA

1. Pugliese A, Beltramo T, Torre D. Emerging and re-emerging viral infections in Europe. *Cell biochemistry and function*. 2007;25:1-13.
2. Bales JF. Emerging Viral Infections. *Semin Pediatr Neurol*. 2012;19:152-157.
3. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*.2002;10:100-103.
4. Torres EM. Dengue. *Estudos avançados*. 2008; 22:33-51.
5. Colón-González FJ, Fezzi C, Lake IR, Hunter PR. The Effects of Weather and Climate Change on Dengue. *Negl Trop Dis*.2013;7.
6. Norrby R. Outlook for a dengue vaccine. *Clin Microbiol Infect*. 2013;5:92-4.
7. Murray NE, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*. 2013; 5: 299-309.
8. CDC [Internet]. [updated 2013 Sept 2; cited 2014 Jun 14]; Available from: <http://www.cdc.gov/dengue>.
9. Ligon BL. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: A review of the history, transmission, treatment and prevention. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005;16:60-65
10. WHO. [Internet]. [updated 2013 Aug 16; cited 2014 Jun 14]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>.
11. Oishi K, Saito M, Mapua CA, Natividad FF. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *J Infect Chemother*.2007;13:125-133.
12. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, Bhatt S, Katzelnick L, Howes RE, Battle KE, Simmons CP, Hay SI. Global spread of dengue virus types:. *Trends Microbiol*.2014;22:138-46.
13. Wilder-Smith A. Dengue infections in travellers. *Paediatrics and International Child Health*. 2012;32 Suppl 1:28-32

14. Dengue: Guidelines for treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization. 2009.
15. Gubler DJ. Dengue Fever Viruses. Encyclopedia of life sciences.2001
16. Sousa CA, Clairouin M, Seixas G, Viveiros B, Novo MT, Silva AC, Escoval MT, Economopoulou A. Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira, Portugal: preliminary report. Euro Surveill. 2012;17:59.
17. Wilder-Smith A, Quam M, Sessions O, Rocklov J, Liu-Helmersson J, Franco L, Khan K . The 2012 dengue outbreak in madeira: exploring the origins. Euro Surveill. 2014;19
18. Alves MJ, Fernandes PL, Amaro F, Osório H, Luz T, Parreira P, Andrade G, Zé-Zé L, Zeller H. Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal .Euro Surveill.2013;18
19. DGS [Internet]. [updated 2013 Sept 4; cited 2014 Jun 14]
Available from:
<http://www.dgs.pt/pagina.aspx?f=1&lws=1&mcna=0&lnc=&mid=5005&codigoms=0&codigono=683368347243AAAAAAAAAAAAA>.
20. Alves MJ, Amaro F, Osório H, Luz T, Parreira P, Zé-Zé L. Diagnóstico laboratorial de dengue no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge: casos autóctones na Madeira. INSA. 2013.
21. Scitable by Nature education [Internet]. [updated 2013 Oct 3; cited 2014 Jun 14]
Available from: <http://www.nature.com/scitable/ebooks/dengue-fever-22453392/118246843>.
22. Halstead SB. Dengue. Lancet. 2007;370: 1644-52.
23. Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue Virus Pathogenesis: an Integrated View. Clin Microbiol Rev. 2009;22:564-581.
24. del Angel RM, Reyes-del Valle J. Dengue Vaccines: Strongly Sought but Not a Reality Just Yet. PLOS Pathogen. 2011; 9.
25. Wan SW, Lin CF, Wang S, Chen YH, Yeh TM, Liu HS, Anderson R, Lin YS .Current progress in dengue vaccines. J Biomed Sci. 2013; 20:37.

26. Ross TM. Dengue Virus. *Clin Lab Med.*2010;30: 149-60.
27. Hidari KI, Suzuki T. Dengue virus receptor. *Trop Med Health.* 2011;39:37-43.
28. Tsai TT, Chuang YJ, Lin YS, Wan SW, Chen CL, Lin CF. An emerging role for the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in dengue virus infection. *J Biomed Sci.* 2013; 20:40.
29. PDB. Molecule of the month: Dengue virus. 2008.
30. Bäck AT, Lundkvist A. Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol.* 2013; 3.
31. Idrees S, Ashfaq UA, Khaliq S. RNAi: antiviral therapy against dengue virus. *Asian Pac J Trop Biomed.*2013;3: 232-236.
32. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67: 2773–2786.
33. Whitehorn J, Farrar J. Dengue. *Clinical Medicine.* 2011;11:583-7.
34. Jansen CC, Beebe NW. The dengue vector *aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect.* 2010; 12: 272-279.
35. Seixas G, Salgueiro P, Silva AC, Campos M, Spenassatto C, Reyes-Lugo M, Novo MT, Ribolla PE, da Silva Pinto JP, Sousa CA. *Aedes aegypti* on Madeira Island (Portugal):genetic variation of a recently introduced dengue vector. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*2013; 108: 3-10.
36. Wiwanitkit V. Non vector-borne transmission modes of dengue . *J Infect Dev Ctries.* 2010;4:51-54.
37. Schmidt M, Geilenkeuser WJ, Sireis W, Seifried E, Hourfar K. Emerging Pathogens – How Safe is Blood? .*Transfus Med Hemother.*-2014; 41:10-17.
38. Jacobs M. Dengue. *Viral tropical infections.* 2005;33:18-20.
39. Simmons CP, Farrar JJ, Nguyen vV, Wills B. Dengue. *N Engl J Med.* 2012;366:1423-32.

40. Oishi K, Saito M, Mapua CA, Natividad FF. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. *J Infect Chemother.* 2007; 13: 125–133.
41. Whitehorn J, Simmons, CP. The pathogenesis of dengue. *Vaccine.*2011;29:7221–7228.
42. Senanayake S. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever– a diagnostic challenge. *Aust Fam Physician.* 2006;35:609-612.
43. Meltzer E, Schwartz E. A travel medicine view of dengue and dengue hemorrhagic fever. *Travel Med Infect Dis.* 2009;7:278-283.
- 44 Ho TS, Wang SM, Anderson R, Liu CC. Antibodies in dengue immunopathogenesis. Tzong-Shiann Ho, Shih-Min Wang, Robert Anderson, Ching-Chuan Liu. *J Formos Med Assoc.* 2013 ;112:1-2.
45. Wan SW, Lin CF, Yeh TM, Liu CC, Liu HS, Wang S, Ling P, Anderson R, Lei HY, Lin YS. Autoimmunity in dengue pathogenesis. *J Formos Med Assoc.* 2013:112:3-11.
46. Weiskopf D, Sette A. T-Cell Immunity to Infection with Dengue Virus in Humans. *Front Immunol.* 2014;5:93.
47. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *J Virol.* 2006;80:11418–11431.
48. Tang KF, Ooi EE. Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012; 10:895–907.
49. Cordeiro MT. Laboratory diagnosis for dengue. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2012;54.
50. Oliveira A, Dutra N. Diagnóstico laboratorial do dengue: situação actual e perspectivas. 2011;43.
51. Teles FR, Prazeres DM, Lima-Filho JL. Trends in dengue diagnosis. *Rev Med Virol.* 2005;15: 287–302.

52. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegriño JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8.
53. Chawla P, Yadav A, Chawla V. Clinical implications and treatment of dengue. *Asian Pac J Trop Med.* 2014;7:169-178.
54. Dengue Vaccine: The Current Status. Maj MS Mustafa, Lt Col VK Agrawal. 2008, Contemporary Issue, Vol. 64, pp. 161-164.
55. Thisyakorn U, Thisyakorn C. Latest developments and future directions in dengue vaccines. *Ther Adv Vaccines.* 2014;2:3-9.
56. Guy B, Saville M, Lang J, Siqueira JB, Bricks LF. Desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra o dengue. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2011; 2:51-64.
57. Lang J. Development of sanofi pasteur tetravalent dengue vaccine. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2012;54: 15-17.
58. A tua saúde. [Internet].[updated 2014 March 12; cited 2014 Jun 14] Available from: <http://www.tuasaude.com/vacina-contra-dengue/>.