

Filipa Manuela Santiago Almeida

Vírus do Dengue: Uma Ameaça Crescente a Nível Global

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Filipa Manuela Santiago Almeida

Vírus do Dengue: Uma Ameaça Crescente a Nível Global

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A Tutora da Monografia

Paula Cristina dos S. Luxo Maia

(Professora Doutora Paula Cristina Santos Luxo Maia)

A Aluna

Filipa Manuela Santiago Almeida

(Filipa Manuela Santiago Almeida)

Agradecimentos

A realização desta Monografia foi o culminar de um processo de aprendizagem e desenvolvimento pessoal que só foi possível graças ao contributo e incentivo de algumas pessoas, a quem não posso deixar de agradecer:

A todos os docentes da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela transmissão de conhecimentos nas mais diversas áreas.

À Professora Doutora Cristina Luxo pela sua orientação, por todo o suporte e disponibilidade.

A toda a minha família e amigos por toda a compreensão, apoio e incentivo.

Às pessoas mais importantes da minha vida e a quem devo tudo, os meus pais, por estarem sempre presentes e permitirem que a minha vida seja um mundo de oportunidades, incentivando-me sempre a seguir os meus sonhos com trabalho, dedicação e humildade. Obrigada por serem uma fonte de motivação e apoio incondicional.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte deste meu percurso.

Muito Obrigada a Todos!

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	2
RESUMO.....	3
ABSTRAT	4
1. Introdução.....	5
2. Vírus do Dengue.....	6
2.1 Características gerais	6
2.2 Estrutura viral	6
2.3 Replicação.....	8
2.4 Ciclo de vida	9
3. Dengue: infecção viral.....	10
3.1 Classificação e manifestações clínicas do Dengue.....	10
3.2 Transmissão	13
3.3 Diagnóstico laboratorial.....	14
3.3.1 Isolamento do vírus	14
3.3.2 Deteção de ácido nucleico	15
3.3.3 Métodos serológicos	15
3.4 Tratamento	16
3.5 Prevenção	17
4. Epidemiologia	18
4.1 Contextualização histórica	18
4.2 Dengue na Europa	20
5. Conclusão	21
Referências Bibliográficas.....	22

Lista de Abreviaturas

Ae. aegypti – *Aedes aegypti*

Ae. albopictus – *Aedes albopictus*

DENV – Vírus do Dengue

DF – Dengue Fever (Febre do Dengue)

DHF – Dengue Hemorrhagic Fever (Febre Hemorrágica do Dengue)

DSS – Dengue Shock Syndrome (Síndrome de Choque do Dengue)

mRNA – RNA mensageiro

OMS – Organização Mundial de Saúde

RE – Retículo Endoplasmático

RNA – Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)

(+) SSRNA – positive-sense Single-Stranded RNA (RNA de cadeia simples com polaridade positiva)

RESUMO

Dengue é uma doença infecciosa causada por um dos serótipos do vírus do dengue (DENV-4) e é transmitida aos humanos por vetores artrópodes, os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

Nos últimos anos tornou-se uma das principais doenças infecciosas emergentes a nível mundial, sendo o vírus do dengue (DENV) considerado, atualmente, o arbovírus com o maior impacto sobre a saúde humana.

Na maioria dos casos é uma doença febril auto-limitada. No entanto, tem um curso clínico imprevisível com diversas manifestações clínicas, e não existe tratamento antiviral específico nem vacina profilática.

Nesta monografia pretende-se efetuar uma revisão bibliográfica da literatura existente sobre o vírus do dengue para uma melhor compreensão da infecção viral provocada pelo DENV, do seu tratamento e da patogénese do vírus, reconhecer a importância de um diagnóstico correto e dos métodos de prevenção e ainda compreender a epidemiologia deste vírus, incluindo a sua situação atual na Europa.

Palavras-chave: dengue; DENV; *Aedes aegypti*; *Aedes albopictus*; tratamento; diagnóstico; prevenção; epidemiologia.

ABSTRAT

Dengue is an infectious disease caused by the serotypes of dengue virus (DENV1-4) and is transmitted to humans by arthropod vectors, the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*.

In recent years it has become one of the main emerging infectious diseases worldwide, with the dengue virus (DENV) considered, currently, the arbovirus with the greatest impact on human health.

In most cases it is a self-limited febrile illness. However, it has an unpredictable clinical course with diverse clinical manifestations, and there is no specific antiviral treatment or prophylactic vaccine.

This monograph is intended to carry out a literature review of existing literature on the dengue virus to a better understanding of viral infection caused by DENV, its treatment and pathogenesis of the virus, recognize the importance of a proper diagnosis and prevention methods, and yet to understand the epidemiology of the virus Denge, including its current situation in Europe.

Keywords: dengue; DENV; *Aedes aegypti*; *Aedes albopictus*; treatment; diagnosis; prevention; epidemiology.

I. Introdução

Dengue é uma doença infecciosa causada pelo vírus do dengue e é transmitida aos humanos pela picada do mosquito fêmea do género *Aedes*. Dengue tem um amplo espectro de manifestações clínicas, muitas vezes com evolução clínica imprevisível. A maioria dos doentes recupera após um curso clínico auto-limitado, no entanto há uma pequena percentagem em que ocorre evolução para doença grave, caracterizada principalmente pela perda de plasma com ou sem hemorragia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

O dengue evoluiu de uma doença esporádica a um grave problema de saúde pública com impacto social e económico, sendo, hoje em dia, a doença transmitida por mosquitos mais disseminada, ocorrendo um aumento drástico na incidência global durante os últimos 50 anos (GUZMAN e HARRIS, 2015; SCHAFFNER e MATHIS, 2014).

O vírus do dengue (DENV) é, atualmente, o arbovírus com o maior impacto sobre a saúde humana. Embora a sua dispersão esteja parcialmente condicionada por restrições ambientais que limitam a distribuição do seu principal vetor, mosquito *Aedes aegypti*, a áreas tropicais e subtropicais, o DENV tem vindo a disseminar-se geograficamente nos últimos tempos. Esta propagação deve-se a vários fatores, nomeadamente ao aumento das viagens e comércio internacional, à introdução de novas práticas agrícolas, à evolução sócio demográfica da população, às migrações e às alterações climáticas abrindo, assim, a possibilidade de ocorrência de surtos inesperados, como aconteceu na Europa, nomeadamente o caso da Madeira, em 2012 (PARREIRA e SOUSA, 2015).

Além do seu impacto sobre a saúde da população local, serviços de saúde e economia, este surto de dengue revelou o quão difícil pode ser controlar a circulação de arbovírus patogénicos, especialmente agora que a Europa também já se encontra parcialmente colonizada por outro vetor do DENV, o mosquito *Aedes albopictus* (PARREIRA e SOUSA, 2015).

Uma vez que ainda não há vacina profilática ou terapêutica específica disponível, o controlo de vetores continua a ser a melhor alternativa para conter a sua circulação (PARREIRA e SOUSA, 2015).

2. Vírus do Dengue

2.1 Características gerais

Vírus Dengue (DENV) é, atualmente, o arbovírus com maior impacto na saúde humana. Os arbovírus (acrônimo do inglês “arthropod borne virus”) são vírus transmitidos por artrópodes. A palavra arbovírus tem sido utilizada para descrever vírus, quase todos com genoma de RNA, pertencentes a famílias distintas com origem em mosquitos, carraças, pulgas e outros. Hoje em dia estão identificados mais de 500 arbovírus, dos quais, 100 podem infectar os seres humanos, resultando normalmente em síndromes febris, encefalites e febres hemorrágicas (CENTRO DE ESTUDOS DE VETORES E DOENÇAS INFECCIOSAS DOUTOR FRANCISCO CAMBOURNAC, 2010; HENCHAL e PUTNAK, 1990; KUHN *et al.*, 2002; WEAVER e REISEN, 2010).

O vírus dengue pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae* que engloba mais de 70 vírus, como o da febre amarela, *West Nile*, entre outros. Os flavivirus apresentam uma grande diversidade de artrópodes como vetores, no entanto, os mais comuns são os mosquitos, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor do DENV. Um outro vetor capaz de transmitir o vírus do dengue, é o mosquito *Ae. Albopictus*. Os seres humanos são os principais hospedeiros do vírus dengue (HENCHAL E PUTNAK, 1990; KUHN *et al.*, 2002; WEAVER e REISEN, 2010).

2.2 Estrutura viral

O vírus do dengue é um vírus esférico de pequeno tamanho (50-55 nm de diâmetro), envelopado, possui uma nucleocápside icosaédrica e o genoma consiste em uma cadeia simples de RNA de polaridade positiva ((+)ssRNA). O vírus do dengue compreende 4 serótipos (DENV 1-DENV 4) geneticamente e antígenicamente distintos, mas manifestam-se com sintomas clínicos semelhantes (HENCHAL e PUTNAK, 1990; IDREES e ASHFAQ, 2013; WANG *et al.*, 2000).

O seu genoma contém cerca de 11000 bases (11 kb) e codifica uma poliproteína precursora. Esta poliproteína é, posteriormente, clivada em 3 proteínas estruturais (C, M, E) e 7 não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). As proteínas estruturais são a proteína da cápside (C), a proteína do envelope (E) e a proteína da membrana (M), fragmento proteolítico de prM, a sua forma precursora (GUBLER, 1998; HENCHAL e

PUTNAK, 1990; IDREES e ASHFAQ, 2013; RODENHUIS-ZYBERT, WILSCHUT e SMIT, 2010; SHU e HUANG, 2004).

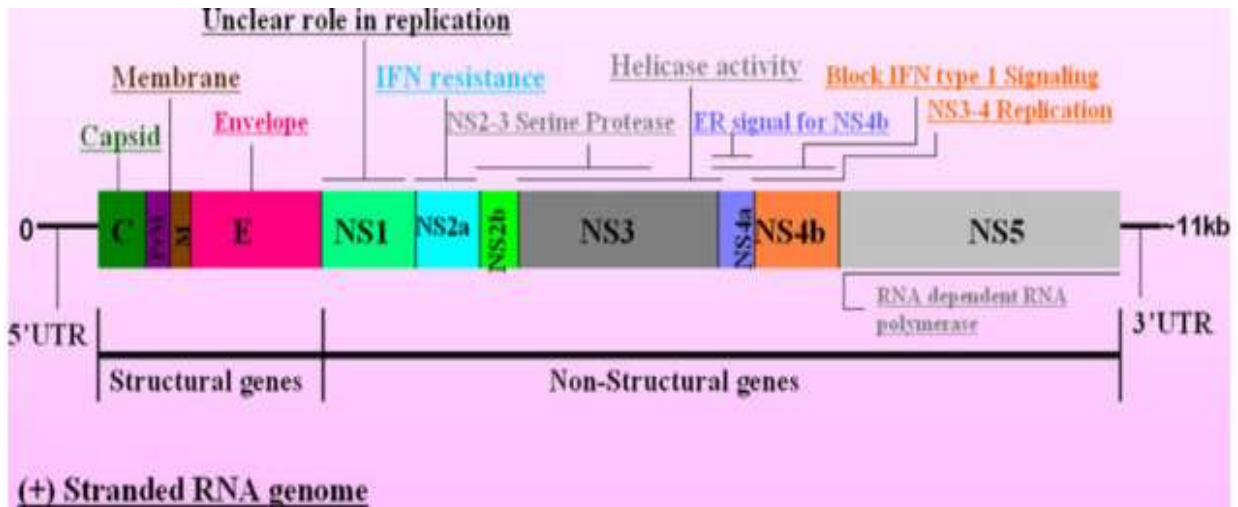


Figura I. Organização do genoma do Vírus do Dengue (retirado de FAHEEM *et al.*, 2011).

A proteína C é uma proteína muito básica que interage e se une ao RNA induzindo a formação da nucleocápside. A prM é clivada por proteases celulares em proteína M, que auxilia a proteína E na formação do virião maduro. A proteína E tem um papel fundamental, uma vez que é a única proteína viral envolvida na ligação do vírus aos recetores da membrana celular, favorecendo a endocitose. É também a proteína que estimula a resposta imune do indivíduo infetado e induz a produção de anticorpos neutralizantes. Possui uma estrutura tridimensional com três domínios estruturais distintos: primeiro (I) ou central; segundo (II), domínio de homodimerização que contém o peptídeo de fusão e o terceiro (III) que é o principal domínio de ligação do vírus ao receptor (FAHEEM *et al.*, 2011; RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010; VELANDIA e CASTELLANOS, 2011).

A função da proteína NS1 não está completamente esclarecida mas pensa-se que participa na replicação do RNA viral. A proteína NS2A está envolvida na montagem de vírus e replicação do RNA. A NS2B age como um co-fator da NS2B-NS3 serina protease, que regula a clivagem da poliproteína viral. A NS3 é uma proteína multifuncional que está envolvida na replicação do RNA e possui várias actividades enzimáticas. A NS4A é uma proteína que está associada à membrana e a sua região C-terminal serve como uma sequência de sinalização para a translocação de NS4B adjacente para o lúmen do retículo endoplasmático (RE). A proteína NS4B regula a replicação do RNA através da sua interação com a NS3. E a proteína NS5 tem atividade RNA polimerase RNA dependente, fundamental

à replicação do RNA (FAHEEM *et al.*, 2011; HENCHAL e PUTNAK, 1990; KAUTNER *et al.*, 1997; VELANDIA e CASTELLANOS, 2011).

2.3 Replicação

O ciclo de replicação do DENV começa quando o vírus entra na célula hospedeira. In vitro, tem sido demonstrado que o vírus é capaz de infectar várias células humanas, incluindo células dendríticas, monócitos, macrófagos, células B, células T, células endoteliais, hepatócitos e células neuronais (CLYDE *et al.*, 2006).

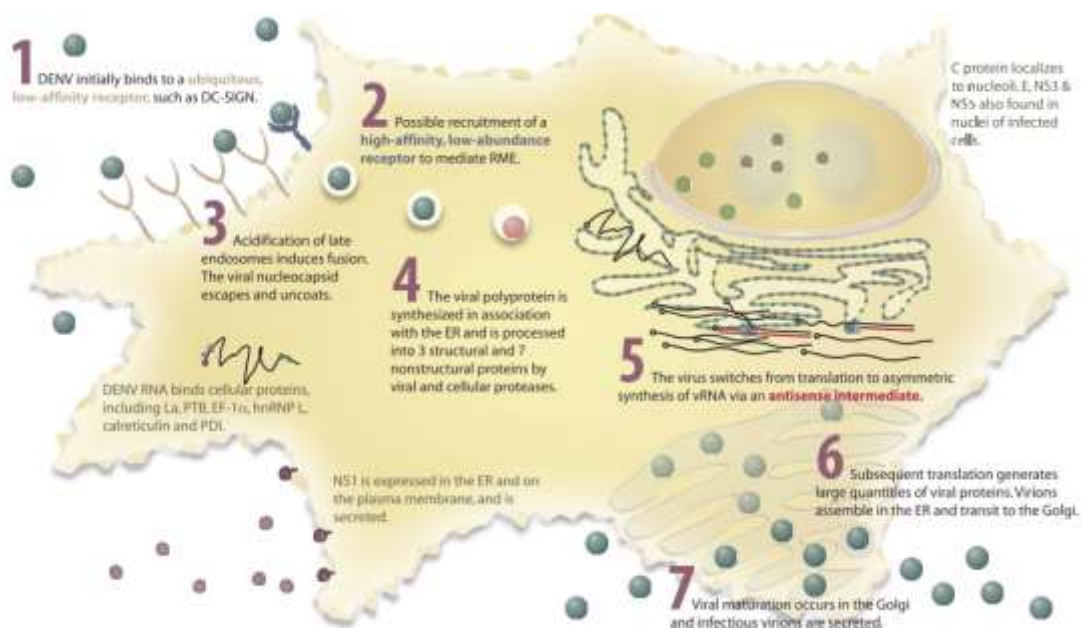


Figura 2. Ciclo de vida intracelular do vírus Dengue (retirado de CLYDE *et al.*, 2006).

A primeira etapa da replicação do DENV é a ligação a recetores da superfície celular, através da proteína do envelope (proteína E), permitindo a entrada do vírus na célula hospedeira por endocitose ou, excepcionalmente, por fusão direta com a membrana plasmática. São conhecidos vários recetores celulares deste vírus, nomeadamente o sulfato de heparina, CD14, CD209 ou DC-SIGN (intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin) (CLYDE *et al.*, 2006; FAHEEM *et al.*, 2011; GREEN *et al.*, 2014; IDREES e ASHFAQ, 2013; MCBRIDE e BIELEFELDT-OHMANN, 2000; RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010; VELANDIA e CASTELLANOS, 2011). Dentro da vesícula endocítica ocorre diminuição do pH, permitindo uma mudança conformacional da proteína do envelope viral (proteína E) facilitando, assim, a fusão das membranas viral e endossomal e, conseqüentemente, a libertação da nucleocápside no

citoplasma da célula infetada (CLYDE *et al.*, 2006; FAHEEM *et al.*, 2011; GREEN *et al.*, 2014; IDREES e ASHFAQ, 2013; MCBRIDE e BIELEFELDT-OHMANN, 2000; RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010; VELANDIA e CASTELLANOS, 2011).

De seguida ocorre a descapsidação do genoma e a sua tradução numa única poliproteína que é, posteriormente, clivada por enzimas celulares e virais em diversas proteínas virais (estruturais e não estruturais). O RNA de cadeia positiva (atua como RNA mensageiro (mRNA)) é transcrito pela RNA polimerase RNA dependente numa cadeia de polaridade negativa que, por sua vez, serve de molde para a formação de novos genomas virais (CLYDE *et al.*, 2006; FAHEEM *et al.*, 2011; MCBRIDE e BIELEFELDT-OHMANN, 2000).

Ciclos sucessivos de tradução produzem grandes quantidades de proteínas virais que, juntamente com os novos genomas formam os novos viriões. A sua maturação ocorre no complexo de Golgi e a libertação dos novos vírus a partir da célula hospedeira ocorre por exocitose (CLYDE *et al.*, 2006).

2.4 Ciclo de vida

Todos os serótipos do vírus do dengue (DENV 1-4) têm o ser Humano como principal hospedeiro vertebrado e os mosquitos *Aedes* (especialmente o *Ae. Aegypti* e o *Ae. Albopictus*) como vetor principal. A infeção pelo vírus dengue não tem efeito patogénico direto no seu vetor. Para ocorrer transmissão, a fêmea *Aedes aegypti* tem de picar um ser humano infetado durante a fase virémica da doença, que dura geralmente 4-12 dias. Depois da ingestão de sangue contendo o vírus, há infecção das células epiteliais que revestem o intestino do mosquito. As partículas virais produzidas nestas células escapam para a hemocele e infetam as glândulas salivares do mosquito, que se tornam os órgãos reservatórios para o vírus. Assim, a transmissão aos humanos ocorre através da picada da fêmea *Aedes aegypti*, quando liberta a saliva infetada com o vírus (MCBRIDE e BIELEFELDT-OHMANN, 2000; VELANDIA e CASTELLANOS, 2011).

O trato genital do mosquito também é infetado, possibilitando a transmissão do vírus para os ovos durante a sua deposição, ficando, assim, o futuro mosquito contaminado e apto a transmitir o vírus. O período de incubação no mosquito é 8-12 dias, conhecido como um período de incubação extrínseca (MCBRIDE e BIELEFELDT-OHMANN, 2000; VELANDIA e CASTELLANOS, 2011).

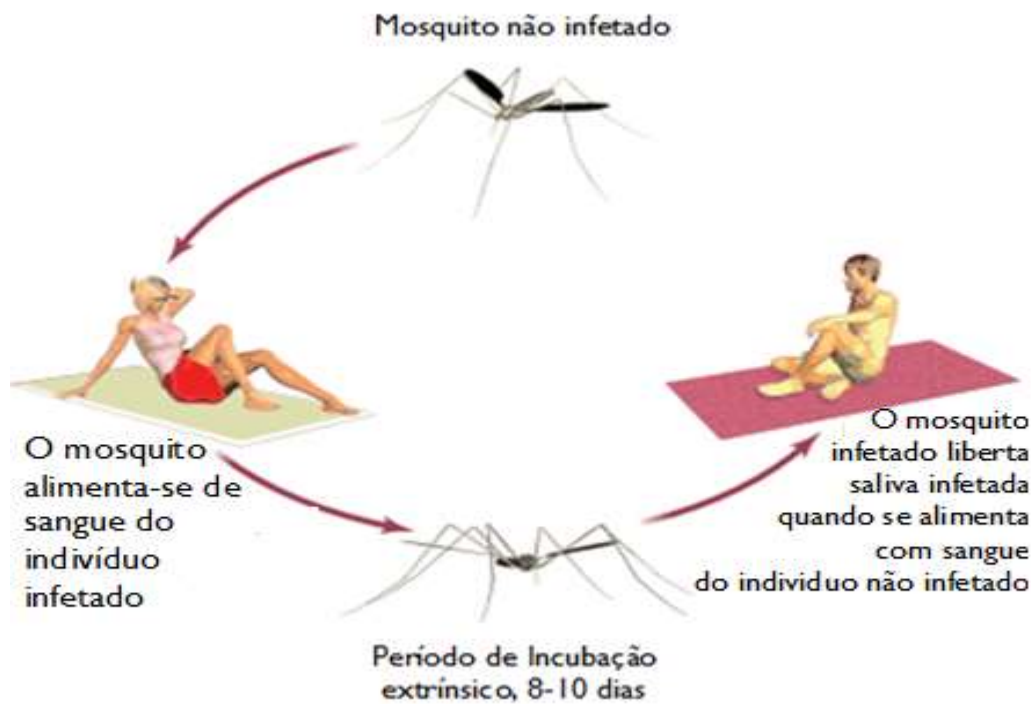


Figura 3. Ciclo de vida do vírus do dengue (adaptado de CHAKRABORTY, 2008).

3. Dengue: infecção viral

3.1 Classificação e manifestações clínicas do Dengue

Dengue é uma doença sistêmica, autolimitada, causada por um dos quatro serótipos do vírus do dengue. Depois de um período de incubação de 4 a 12 dias, a infecção por um dos serótipos do vírus pode produzir um largo espectro de manifestações clínicas (suaves ou muito graves), embora a maioria das infecções sejam assintomáticas. A infecção primária induz imunidade contra o serótipo infectante, para o resto da vida. Os indivíduos que sofrem de uma infecção primária ficam também protegidos contra a doença provocada por um serótipo diferente mas apenas por 2-3 meses, não tendo imunidade cruzada a longo prazo. Fatores de risco individuais tais como a idade, etnia e possivelmente doenças crônicas como a asma, diabetes *mellitus* determinam a gravidade da doença (CHAKRABORTY, 2008; PARREIRA e SOUSA, 2015; SILVANO e ABREU, 2014; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Historicamente, o dengue era considerado uma doença debilitante, mas não fatal. Contudo, durante o final dos anos 60, surtos de dengue hemorrágica fatal em crianças mudaram essa percepção, e as informações clínicas desses surtos formaram a base para a classificação da dengue. Em 1975 foi publicada uma *guideline* da Organização Mundial de Saúde (OMS) e atualizada em 1997, em que as formas clínicas da doença eram divididas em febre do dengue

(DF), febre hemorrágica do dengue (DHF) e síndrome de choque do dengue (DSS) (RODRIGUEZ-ROCHE e GOULD, 2013; SILVANO e ABREU, 2014; SRIKIATKHACHORN *et al.*, 2011).

A febre do dengue (DF) era definida como uma doença febril com pelo menos dois dos seguintes sintomas clínicos: náuseas, vômitos, dor de cabeça, artralgia, dor retro-orbital, erupção cutânea, mialgia, manifestações hemorrágicas e leucopenia (RODRIGUEZ-ROCHE e GOULD, 2013; SRIKIATKHACHORN *et al.*, 2011).

A definição de dengue hemorrágica (DHF) baseava-se em 4 critérios clínicos: febre alta, tendência hemorrágica, trombocitopenia (contagem de plaquetas $\leq 100\ 000$ células/mm³) e hemoconcentração (aumento no hematócrito $>20\%$) (RODRIGUEZ-ROCHE e GOULD, 2013; SRIKIATKHACHORN *et al.*, 2011).

Os doentes que progredissem para o síndrome do choque do dengue (DSS) apresentavam intensa dor abdominal, vômitos persistentes, pulso fraco e hipotensão, sendo a evolução geralmente fatal (RODRIGUEZ-ROCHE e GOULD, 2013; SRIKIATKHACHORN *et al.*, 2011).

No entanto, surgiram várias críticas relativamente a esta classificação, argumentando que é uma classificação demasiado rígida e difícil de aplicar, falhando-se muitas vezes na identificação de casos severos, uma vez que não engloba algumas manifestações graves tais como encefalopatia e insuficiência hepática. Consequentemente, foi conduzido um estudo com o objectivo de definir clinicamente o dengue e, com base nas suas conclusões, uma nova classificação foi publicada na mais recente *guideline* da OMS, em 2009. A OMS propõe, então, uma nova classificação com duas categorias: dengue (com ou sem sinais de alerta) e dengue grave, seguindo alguns critérios. A definição de dengue é um pouco semelhante à febre do dengue (DF): uma combinação de 2 ou mais dos seguintes sinais e sintomas - dores, náuseas, vômitos, erupção cutânea, leucopenia e teste do laço positivo - num indivíduo febril que viva ou viaje numa área endémica. Dor e sensibilidade abdominal, vômitos persistentes, acumulação de líquidos, hemorragias (causadas pelo aumento da permeabilidade capilar), letargia, agitação, hepatomegalia e diminuição da contagem de plaquetas estão também incluídos na lista de manifestações clínicas sugestivas de dengue, sendo consideradas sinais de alerta para dengue potencialmente grave.

Para ser classificada como dengue grave, tem de incluir uma das seguintes manifestações clínicas: extravasamento de plasma levando a choque ou desconforto respiratório, hemorragia grave ou falência de órgãos (ex: enzimas hepáticas elevadas, alteração de consciência ou insuficiência cardíaca) (SRIKIATKHACHORN *et al.*, 2011).

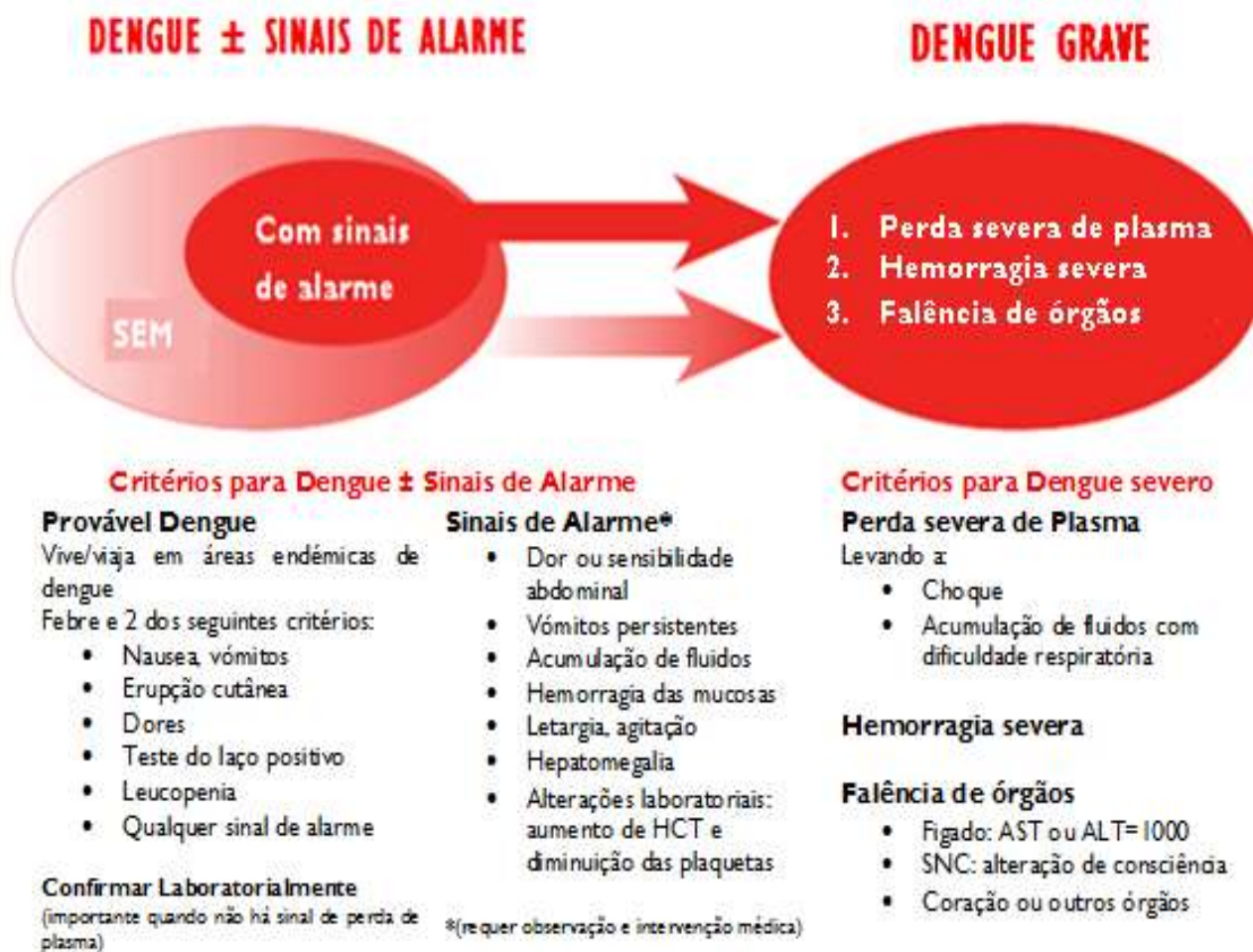


Figura 4. Classificação do dengue (adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Nos doentes que apresentam sintomatologia, podem ser observadas 3 fases:

Fase febril:

Após o período de incubação, os doentes desenvolvem repentinamente uma febre alta, que dura geralmente 2-7 dias e é muitas vezes acompanhada de rubor facial, eritema cutâneo, mialgia, dor retro-orbital, fotofobia e dores de cabeça. Nesta fase pode ser difícil distinguir clinicamente o dengue de outras doenças febris. O teste do laço positivo indica uma maior probabilidade de dengue, no entanto, é crucial a monitorização de sinais de alarme e outros parâmetros clínicos, de forma a reconhecer a progressão para a fase crítica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

A realização do teste do laço é de extrema importância nesta fase pois ajuda a determinar a fragilidade das paredes capilares e estimar a tendência à hemorragia. Durante 5 minutos é

mantida uma pressão elevada sobre um membro (geralmente o braço), usando um garrote. Em seguida é realizada a contagem do número de petéquias (pequenas manchas hemorrágicas, que apareçam num círculo de 5 cm de diâmetro).

Fase crítica:

Durante a transição da fase febril para a fase afebril, os doentes sem aumento da permeabilidade capilar, irão recuperar sem passar pela fase crítica. Pelo contrário, os doentes com aumento da permeabilidade capilar, podem apresentar os sinais de alarme, que marcam o início da fase crítica.

Alguns destes casos de dengue com sinais de alerta, podem ainda evoluir para dengue grave (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Fase de recuperação:

Se o doente sobreviver à fase crítica e não evoluir para dengue grave, ocorre reabsorção gradual do fluido intravascular nas 48-72h seguintes, há uma melhoria do estado geral, dos sintomas gastrointestinais e o estado hemodinâmico estabiliza (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

3.2 Transmissão

O vírus do dengue é transmitido aos humanos pela picada de um vector- o mosquito fêmea infetado, do género *Aedes* . Os mosquitos *Aedes aegypti* são os principais vetores para a infeção por dengue, mas *Aedes albopictus* e outras espécies *Aedes* também podem transmitir dengue, com diferentes graus de eficiência.

Estas espécies de mosquitos adaptam-se bem ao ambiente humano, muitas vezes reproduzindo-se perto das habitações ou mesmo dentro delas, depositando os seus ovos em pequenas quantidades de água encontrados em pneus velhos ou outros pequenos recipientes descartados pelos humanos. Os ovos podem permanecer viáveis durante vários meses, mesmo sem água. O mosquito *Aedes* alimenta-se durante o dia e se for interrompido durante o processo de alimentação, tende a picar outras pessoas na vizinhança levando, muitas vezes, a que todos os membros de uma família ou de um grupo fiquem infetados. A infeção desenvolve-se dentro de 24-36h (CHAKRABORTY, 2008; PARREIRA e SOUSA, 2015).

3.3 Diagnóstico laboratorial

A natureza dinâmica do dengue exige um acompanhamento atento e várias avaliações clínicas e laboratoriais. Um diagnóstico eficiente e preciso do dengue é de primordial importância não só para a implementação de cuidados clínicos mas também para atividades de vigilância, controlo de surtos, investigação, estudos epidemiológicos e desenvolvimento de vacinas. A necessidade de confirmação laboratorial, nos casos de infeção pelo vírus do dengue, deve-se ao largo espectro de sintomas, muitos dos quais não específicos, tornando o diagnóstico baseado apenas na sintomatologia num diagnóstico não confiável (GUZMÁN e KOURÍ, 2004; SRIKIATKHACHORN *et al.*, 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Os métodos de diagnóstico laboratorial para confirmação da infeção podem envolver o isolamento do vírus, a deteção de ácido nucleico viral, a pesquisa de antigénios ou de anticorpos. Após o início da doença, o vírus pode ser detetado no soro, plasma, células do sangue e outros tecidos, durante 4-5 dias, correspondendo à fase febril. Durante esta fase inicial, o isolamento do vírus, a deteção de ácido nucleico viral ou de antigénios, podem ser usados para diagnosticar a infeção. No final da fase aguda da infeção, a deteção de anticorpos por métodos serológicos é o métodos de escolha para o diagnóstico (GUZMAN e HARRIS, 2015; GUZMÁN e KOURÍ, 2004; SHU e HUANG, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

3.3.1 Isolamento do vírus

A fase virémica é curta, portanto a amostra para isolamento do vírus deve ser colhida nos primeiros 4-5 dias de doença. O vírus pode ser encontrado no soro, plasma, sangue e tecidos (fígado, baço, pulmões recolhidos de casos fatais). A cultura celular é o método mais utilizado para o isolamento do vírus. Uma vez que nem todos os vírus do dengue induzem efeito citopático, deve-se fazer pesquisa de antigénios virais por imunofluorescência após a cultura. A técnica de isolamento do vírus através da inoculação em cultura de células é normalmente de elevada sensibilidade mas depende da qualidade da amostra, e é demorada (necessita 1-2 semanas) (GUZMAN e HARRIS, 2015; GUZMÁN e KOURÍ, 2004; SHU e HUANG, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

3.3.2 Detecção de ácido nucleico

Os métodos mais utilizados para a deteção de ácido nucleico são a transcrição reversa seguida de reacção de polimerização (RT-PCR) e RT-PCR em tempo real. São técnicas muito sensíveis e com um tempo de resposta muito mais rápido (24-48h) do que a cultura celular (GUZMAN e HARRIS, 2015; GUZMÁN e KOURÍ, 2004; SHU e HUANG, 2004; WORLD Health ORGANIZATION, 2009).

3.3.3 Métodos serológicos

Podem ser observados dois padrões de resposta serológica em doentes com infeção pelo vírus do dengue: resposta de anticorpos primária e secundária, dependendo do estado imunológico do indivíduo infetado (GUZMAN e HARRIS, 2015; SHU e HUANG, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

A resposta de anticorpos primária ocorre em pessoas que não são imunes a *Flavivirus* e é caracterizada por um aumento lento de anticorpos específicos, sendo o anticorpo IgM o primeiro a aparecer. Este anticorpo anti-dengue atinge o seu nível máximo cerca de duas semanas após o início dos sintomas e, em seguida, vai diminuindo ao longo de 2-3 meses para níveis indetetáveis. Na primeira semana de doença são detetados níveis baixos de IgG, aumentado lentamente a partir daí, e permanecendo detetável no soro durante vários anos ou para toda a vida, conferindo imunidade contra o tipo de vírus infetante (GUZMAN e HARRIS, 2015; SHU e HUANG, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

A resposta de anticorpos secundária é observada em pessoas que já tiveram uma infeção prévia por *Flavivirus*. Neste caso, os níveis de anticorpos sobem rapidamente. São detetados níveis elevados de IgG, mesmo na fase aguda e este anticorpo persiste por longos períodos de tempo ou para a vida toda. Os níveis de IgM são significativamente mais baixos nas infecções secundárias, e podem mesmo ser indetetáveis nalguns casos (GUZMAN e HARRIS, 2015; SHU e HUANG, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

O teste serológico mais usado é o MAC-Elisa (*IgM antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay*), onde o diagnóstico serológico é feito por ensaios imunoenzimáticos com captura de anticorpo IgM, utilizando antígenos de um dos 4 serótipos do vírus DENV. Este método tem uma especificidade e sensibilidade muito elevada, mas ainda assim podem ocorrer falsos negativos, principalmente em casos de infeção secundária em que os níveis de IgM são mais baixos (GUZMAN e HARRIS, 2015; SHU e HUANG, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

3.4 Tratamento

A redução da mortalidade causada pelo dengue requer um processo organizado que garanta o reconhecimento precoce da doença, a sua gestão e tratamento. O componente chave do processo, para além de um diagnóstico eficiente, é a prestação de bons serviços clínicos. Embora a maioria dos doentes com dengue recuperem sem necessidade de internamento, existe uma pequena percentagem que pode evoluir para doença grave (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Durante a fase febril, raramente é possível prever clinicamente se o doente vai progredir para dengue grave, uma vez que as várias manifestações clínicas podem aparecer apenas com o progredir da doença, na fase crítica. No entanto, os sinais de alerta são bons indicadores de um risco elevado de desenvolver dengue grave, sendo necessário fazer avaliações diárias ao doente com verificação cuidadosa dos sintomas e sinais de alerta (CHAKRABORTY, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Dada a inespecificidade da evolução clínica da doença, a Organização Mundial de Saúde *standardizou* níveis de atuação segundo grupos de A a D, dependendo da gravidade da situação.

Um dos principais problemas associados ao dengue é o aumento da permeabilidade capilar, o que pode resultar na perda até 20% do volume de plasma. Esta perda pode levar, muitas vezes, à morte. Uma vez que não existe nenhum antivírico disponível nem nenhum tratamento específico, a deteção precoce deste estado e a rápida substituição do fluido corporal com ingestão de líquidos (em casos menos graves, sem sinais de alerta e que não precisam de hospitalização) ou com solução eletrolítica por via intravenosa (em casos mais graves) pode reverter eficazmente a doença. Quando a temperatura é elevada, recomenda-se o uso de paracetamol como antipirético (CHAKRABORTY, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Em caso de dengue grave, pode ainda ser necessário a administração de oxigénio e transfusões de sangue (CHAKRABORTY, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Com um diagnóstico precoce e um bom acompanhamento médico consegue-se, geralmente, evitar a progressão da doença e fazer uma recuperação sem sequelas.

3.5 Prevenção

Muitos fatores têm contribuído para a forma e velocidade com que o vírus do dengue se tem distribuído mundialmente: a degradação ambiental funciona como um fator facilitador para a multiplicação dos seus vectores invertebrados que, geralmente, ocorrem nas imediações das habitações humanas e, frequentemente (embora não estritamente) em contextos de urbanização descontrolada aumentando, conseqüentemente, as probabilidades de contacto humano-vector. A intensificação do tráfego de mercadorias juntamente com o aumento das viagens permite que os mosquitos percorram longas distâncias muito rapidamente. Finalmente, a falta de vontade política e os limitados recursos técnicos, científicos e financeiros impossibilitam algumas intervenções de controlo da doença (PARREIRA e SOUSA, 2015; RODRIGUEZ-ROCHE e GOULD, 2013).

A prevenção é importante para diminuir a taxa de morbidade e mortalidade que se tem vindo a verificar, devido ao aumento de surtos de dengue nas últimas décadas. Na ausência de tratamento antiviral específico e de vacina contra o vírus, a melhor estratégia para prevenir e reduzir a transmissão de dengue é o controlo dos seus vetores (BHATT *et al.*, 2013; CHAKRABORTY, 2008; RODRIGUEZ-ROCHE e GOULD, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Estes mosquitos proliferam em diversos locais com água, tanto em recipientes para uso doméstico como numa multiplicidade de ambientes que estejam em contacto com a água da chuva, desde pneus usados, latas de bebida descartadas até edifícios em construção. Assim, o melhor método de controlo dos vetores passa pela gestão ambiental, tendo como objectivo a eliminação dos habitats e locais de oviposição, de forma a eliminar larvas e mosquitos adultos (BHATT *et al.*, 2013; CHAKRABORTY, 2008; RODRIGUEZ-ROCHE e GOULD, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

Para além disso, é muito importante ter um sistema de vigilância adequado da população de mosquitos para entender a sua distribuição geográfica, a sua dependência do clima e para monitorizar as diferentes etapas do seu ciclo de vida. Depois da vigilância, o próximo passo é a implementação de várias medidas para prevenir e minimizar a propagação do vetor. Estas medidas incluem uma melhoria do saneamento básico, da higiene ambiental, do abastecimento de água doméstica e uma boa gestão de resíduos, diminuindo a quantidade de lixo e aumentando a reciclagem, e o uso de repelentes e inseticidas (BHATT *et al.*, 2013; CHAKRABORTY, 2008; RODRIGUEZ-ROCHE e GOULD, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

4. Epidemiologia

Atualmente, o dengue é considerado a doença viral transmitida por mosquitos mais disseminada e com maior impacto na saúde humana a nível mundial. O vírus e os seus vetores tornaram-se amplamente distribuídos em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente nos últimos 50 anos, e hoje em dia a transmissão de dengue está presente em todas as regiões da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Mais de 125 países são conhecidos como regiões endémicas do dengue e estima-se que a expansão do vírus deverá aumentar ainda mais e, conseqüentemente aumentar a possibilidade de ocorrência de surtos inesperados, como aconteceu na Madeira em 2012 (MURRAY *et al.*, 2013; PARREIRA e SOUSA, 2015).

4.1 Contextualização histórica

Embora haja indícios de que o dengue existe há séculos, o início da sua história não é claro uma vez que o seu quadro clínico é semelhante a outras infecções febris. Os primeiros registos de sintomas compatíveis com infecção pelo vírus dengue estão descritos numa enciclopédia médica chinesa, de 992 dC. A doença foi referida como “água envenenada” e associada a insetos voadores. No entanto, os primeiros casos bem documentados de epidemias, em que se acredita tratar-se realmente de dengue, aconteceram apenas em 1779 e 1780, em Filadélfia (HENCHAL e Putnak, 1990; KYLE e HARRIS, 2008; MURRAY *et al.*, 2013).

Há registos históricos que indicam também uma série de pandemias de dengue, entre 1823 e 1916, que se propagaram da África à Índia e da Oceânia à América. Embora seja impossível saber qual o serótipo envolvido, estes surtos foram, provavelmente, causados pelo mesmo serótipo e este foi transportado entre as diversas regiões geográficas através dos escravos e do comércio (WEAVER e VASILAKIS, 2013).

A etiologia viral do dengue foi sugerida experimentalmente no século XX, mas os serótipos 1 e 2 foram isolados apenas durante a Segunda Guerra Mundial por investigadores Japoneses e Americanos. O início da guerra proporcionou mudanças a vários níveis que permitiram a criação de comissões científicas para estudar a doença, o seu agente etiológico e o desenvolvimento de testes de diagnóstico. No entanto, pensa-se que o movimento das tropas durante a Segunda Guerra Mundial, juntamente com a destruição do meio ambiente contribuíram para a propagação do vírus e, em certa medida, dos seus vetores ao longo de todo o sudoeste da Ásia e do Pacífico Ocidental. Desde então, o sudoeste da Ásia manteve-

se hiperendêmico para os quatro serótipos do vírus do dengue. Os serótipos 3 e 4 foram identificados mais tarde, após um surto ocorrido nas Filipinas e na Tailândia em 1954 (KYLE e HARRIS, 2008; MURRAY *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-ROCHE e GOULD, 2013; WEAVER e VASILAKIS, 2013).

O final da Segunda Guerra Mundial levou a um aumento incontável da urbanização, com habitações e sistemas de distribuição de água inadequadas, bem como má gestão de esgotos e resíduos, permitindo uma elevada propagação do vetor e, conseqüentemente, uma maior transmissão do vírus e hiperendemicidade (vários serótipos presentes) em diversas regiões geográficas, com surgimento de formas graves de dengue (MURRAY *et al.*, 2013; WEAVER e REISEN, 2010; WEAVER e VASILAKIS, 2013; WILDER-SMITH *et al.*, 2014).

Atualmente, estima-se que 3.6 milhões de pessoas vivem em áreas tropicais e subtropicais, onde o vírus do dengue tem grande probabilidade de ser transmitido. As estimativas globais variam, mas aproximadamente 50 a 200 milhões de infecções de dengue, 500.000 episódios de dengue grave e mais de 20.000 mortes relacionadas com dengue ocorrem, anualmente. O dengue constitui, assim, um grave problema de saúde pública a nível mundial (MURRAY *et al.*, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

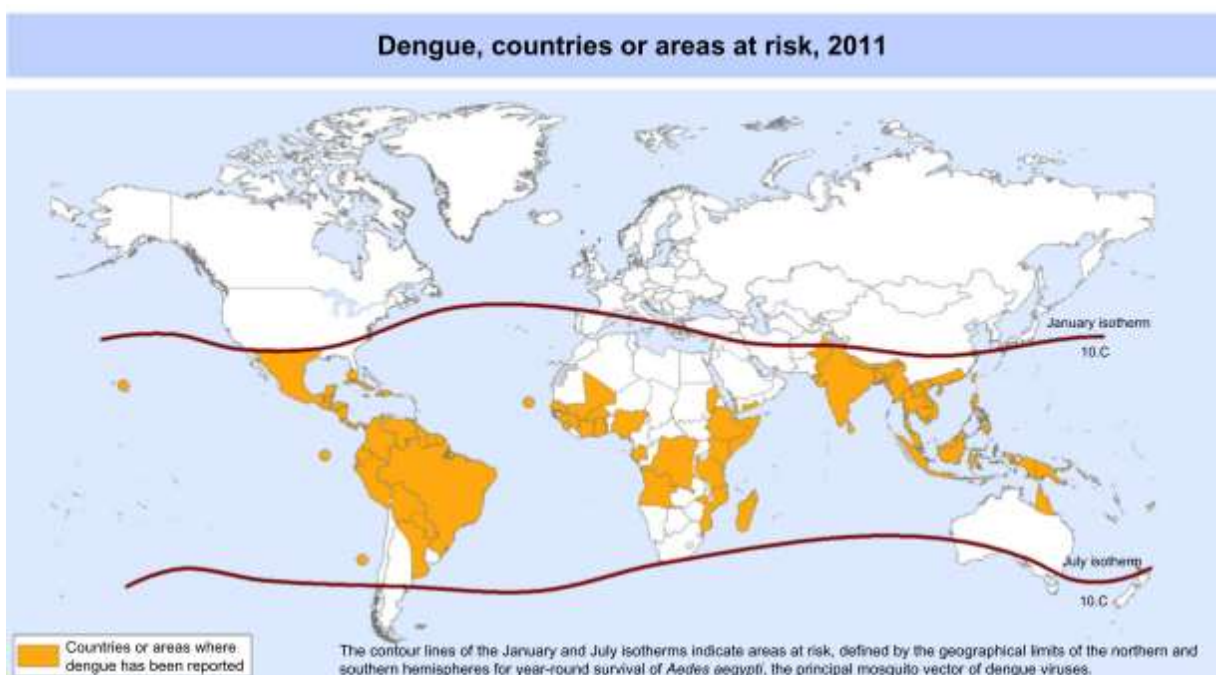


Figura 5. Países ou áreas onde o Dengue foi reportado. As linhas isotérmicas de Janeiro e Julho indicando áreas de risco, definidas pelos limites geográficos dos Hemisférios Norte e Sul, explicada pela sobrevivência/ ano do *Aedes aegypti* (retirado de MURRAY *et al.*, 2013).

4.2 Dengue na Europa

Dengue não é endêmico na Europa. Historicamente, sabe-se que os seus vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (menos eficaz) expandiram o seu habitat por todo o globo (desde a África ocidental), incluindo a Europa no início do século XX, mas desde então tem diminuído e, consequentemente, a doença desapareceu na Europa. O último surto de dengue com grande impacto na Europa ocorreu em 1927 e 1928, na Grécia, causando um milhão de casos com mais de 1000 mortes. No entanto, atualmente, casos isolados e um novo surto de dengue reapareceram na Europa (MEDLOCK *et al.*, 2012; SEMENZA *et al.*, 2014; TOMASELLO e SCHLAGENHAUF, 2013).

Um dos principais fatores que favoreceu a expansão geográfica do dengue para áreas não endêmicas, nos últimos anos, foi a introdução de mosquitos *Aedes* infetados através de embarcações, e a importação do vírus dengue através de viajantes virémicos. Na Europa não havia casos relatados até 2010, quando foram notificados dois casos no sul de França, seguidos de casos na Croácia (TOMASELLO e SCHLAGENHAUF, 2013; WILDER-SMITH *et al.*, 2014).

Em 2012 surgiu um surto de dengue na Europa, que ocorreu na Região Autónoma da Madeira, Portugal, tendo sido reportado a presença do seu principal vetor, *Ae. aegypti*, já em 2005. A mistura de áreas densamente povoadas com vegetação sub-tropical abundante terá permitido a introdução do mosquito no Funchal, tendo-se espalhado longitudinalmente ao longo da costa e depois para o resto da ilha. A reprodução de mosquitos no Funchal não pode ser associada à falta de saneamento, recolha do lixo ou práticas de armazenamento de água, contrariamente ao que acontece em muitas cidades endêmicas de dengue em regiões tropicais. Em vez disso, o hábito de colocar pequenas plantas e flores em vasos, fornece um grande número de potenciais locais para a reprodução dos mosquitos, tanto dentro como em torno das habitações. Além disso, o clima ameno da Madeira juntamente com zonas costeiras, paisagens montanhosas e urbanas fazem da ilha da Madeira um destino turístico atraente (LOURENÇO e RECKER, 2014; WILDER-SMITH *et al.*, 2014).

O surto de dengue na Madeira evoluiu rapidamente desde o seu início a 3 de Outubro de 2012 e resultou em mais de 2.100 casos até Março de 2013, com mais 13 países europeus a reportar um total de 82 casos oriundos da Madeira. Este surto foi provocado pelo serótipo I do vírus do dengue e mais nenhum caso foi identificado desde 3 de Março de 2013 (SILVANO e ABREU, 2014; TOMASELLO e SCHLAGENHAUF, 2013; WILDER-SMITH *et al.*, 2014).

5. Conclusão

Apesar das novas informações e de um melhor entendimento da dinâmica de transmissão do vírus do dengue, a situação global continua a agravar-se com a expansão e crescimento dramático da doença, a nível global, afetando já países não endémicos. Para isto contribui o facto dos vetores que transmitem a doença estarem amplamente distribuídos pelo mundo, e estima-se que o risco de transmissão da doença aumente ainda mais, devido a diversos fatores nomeadamente alterações climáticas, aumento da densidade populacional e exportação de mercadorias, que permitem a sobrevivência e propagação desses vetores. Na Europa já existem condições favoráveis ao seu desenvolvimento, inclusivamente em Portugal.

Nos últimos anos foram feitos progressos significativos no que diz respeito à compreensão da estrutura viral, do ciclo de vida e da patogénese da doença, no entanto é ainda necessário uma maior compreensão da epidemiologia e patogénese do vírus do dengue, de forma a acelerar o desenvolvimento de vacinas e/ou tratamento antiviral adequado.

Enquanto isso não é uma realidade, deve-se recorrer a outros métodos de controlo da doença, sendo indispensável a otimização dos sistemas de saúde, educação dos profissionais de saúde e implementação de medidas eficazes de controlo do vetor. Além disso, é também muito importante o reconhecimento da gravidade, magnitude e futuras implicações da doença de forma a minimizar a propagação e transmissão da doença e, assim, inverter a situação atual.

Referências Bibliográficas

BHATT, S., GETHING, P.W., BRADY, O.J., MESSINA, J.P., FARLOW, A.W., MOYES, C.L., DRAKE, J.M., BROWNSTEIN, J.S., HOEN, A.G., SANKOH, O., MYERS, M.F., GEORGE, D.B., JAENISCH, T., WINT, G.R.W., SIMMONS, C.P., SCOTT, T.W., FARRAR, J.J., HAY, S.I. - The global distribution and burden of dengue. **Nature**. ISSN 1476-4687. 496:7446 (2013) 504-7.

CENTRO DE ESTUDOS DE VETORES E DOENÇAS INFECCIOSAS DOUTOR FRANCISCO CAMBOURNAC - Relatório REVIVE 2010 - Culicídeos (excerto): Programa Nacional de Vigilância de Vetores Culicídeos. (2010).

CHAKRABORTY, T. - Deadly Diseases and Epidemics: Dengue Fever and Other Hemorrhagic Viruses. New York: Chelsea House, 2008. ISBN:9780791085066.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. - Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of virology**. . ISSN 0022-538X. 80:23 (2006) 11418-11431.

FAHEEM, M., RAHEEL, U., RIAZ, M.N., KANWAL, N., JAVED, F., US SAHAR SADAF ZAIDI, N., QADRI, I.- A molecular evaluation of dengue virus pathogenesis and its latest vaccine strategies. **Molecular Biology Reports**. ISSN 03014851. 38:6 (2011) 3731-3740.

GREEN, A.M., BEATTY, P.R., HADJILAOU, A., HARRIS, E. - Innate immunity to dengue virus infection and subversion of antiviral responses. **Journal of Molecular Biology**. ISSN 00222836. 426:6 (2014) 1148-1160.

GUBLER, D. J. - Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**. ISSN 0893-8512. 11:3 (1998) 480-496.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. - Dengue. **The Lancet**. ISSN 01406736. 385:9966 (2015) 453-465.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. - Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases**. ISSN 12019712. 8:2 (2004) 69-80.

HENCHAL, E. A; PUTNAK, J. R. - The Dengue Viruses. **Clinical microbiology reviews**. ISSN 0893-8512. 3:4 (1990) 376-396.

IDREES, S.; ASHFAQ, U. A. - RNAi: Antiviral therapy against dengue virus. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. ISSN 22211691. 3:3 (2013) 232-236.

KAUTNER, I.; ROBINSON, M. J.; KUHNLE, U. - Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. **The Journal of pediatrics**. ISSN 0022-3476. 131:4 (1997) 516-524.

KUHN, R.J., ZHANG, W., ROSSMANN, M.G., PLETNEV, S. V., CORVER, J., LENCHES, E., JONES, C.T., MUKHOPADHYAY, S., R., P.C., STRAUSS, E.G., BAKER, T.S., STRAUSS, J.H. - Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. **Changes**. ISSN 15378276. 108:5 (2002) 717-725.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. - Global spread and persistence of dengue. **Annual review of microbiology**. ISSN 0066-4227. 62 (2008) 71-92.

LOURENÇO, J.; RECKER, M. - The 2012 Madeira Dengue Outbreak: Epidemiological Determinants and Future Epidemic Potential. **PLoS neglected tropical diseases**. ISSN 1935-2735. 8:8 (2014) e3083.

MCBRIDE, W. J.; BIELEFELDT-OHMANN, H. - Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and Infection**. ISSN 12864579. 2:9 (2000) 1041-1050.

MEDLOCK, J.M., HANSFORD, K.M., SCHAFFNER, F., VERSTEIRT, V., HENDRICKX, G., ZELLER, H., BORTEL, W. VAN. - A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. ISSN 1530-3667. 12:6 (2012) 435-447.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. - Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**. ISSN 11791349. 5:1 (2013) 299-309.

PARREIRA, R.; SOUSA, C. A - Dengue fever in Europe: could there be an epidemic in the future? **Expert Review of Anti-infective Therapy**. ISSN 1478-7210. 13:1 (2015) 29-40.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. - Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**. ISSN 1420682X. 67:16 (2010) 2773-2786.

RODRIGUEZ-ROCHE, R.; GOULD, E. A. - Understanding the dengue viruses and progress towards their control. **BioMed Research International**. ISSN 23146133. 2013 (2013).

SCHAFFNER, F.; MATHIS, A. - Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. **The Lancet Infectious Diseases**. ISSN 14733099. 14:12 (2014) 1271-1280.

WEAVER, S.C.; VASILAKIS, N. - Molecular Evolution of Dengue Virus. 2009:4 (2013) 523-540.

SEMENZA, J.C., SUDRE, B., MINIOTA, J., ROSSI, M., HU, W., KOSSOWSKY, D., SUK, J.E., VAN BORTEL, W., KHAN, K. - International Dispersal of Dengue through Air Travel: Importation Risk for Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. ISSN 19352727. 8:12 (2014) 1-12.

SHU, P.; HUANG, J. - Current Advances in Dengue. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 11:4 (2004) 642-650.

SILVANO, J.; ABREU, C. - Dengue nos Países da Lusofonia: Que Ligações Epidemiológicas Poderemos Traçar?. 27:4 (2014) 503-510.

SRIKIATKHACHORN, A., ROTHMAN, A.L., GIBBONS, R. V., SITTISOMBUT, N., MALASIT, P., ENNIS, F. A., NIMMANNITYA, S., KALAYANAROOJ, S. - Dengue-how best to classify it. **Clinical Infectious Diseases**. ISSN 10584838. 53:6 (2011) 563-567.

TOMASELLO, D.; SCHLAGENHAUF, P. - Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007-2012. **Travel Medicine and Infectious Disease**. ISSN 14778939. 11:5 (2013) 274-284.

VELANDIA, M. L.; CASTELLANOS, J. E. - Virus del dengue: estructura y ciclo viral Dengue virus: structure and viral cycle. **Asociacion Colombiana De Infectologia**. ISSN 01239392. 15:571 (2011) 33-43.

WANG, E., NI, H., XU, R., BARRETT, A D., WATOWICH, S.J., GUBLER, D.J., WEAVER, S.C. - Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of virology**. ISSN 0022-538X. 74:7 (2000) 3227-3234.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. - Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**. ISSN 01663542. 85:2 (2010) 328-345.

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 surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**. ISSN 15607917. 19:8 (2014) 20718.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**. (2009). [acedido a 2 de junho de 2015]. Disponível na internet : <http://www.who.int/rpc/guidelines/9789241547871/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Handbook for clinical management of dengue**. (2012). [acedido a 2 de junho de 2015]. Disponível na internet: http://www.who.int/tdr/publications/handbook_dengue/en/.