UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

Curso de Biomedicina

Lindsay Kaori Aguena dos Santos

INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE: FOCO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

São Paulo

2022

Lindsay Kaori Aguena dos Santos

INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE: FOCO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Biomedicina

Orientador: Profª. Me. Drª Marina Tiemi Shio

SÃO PAULO

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

S237i Santos, Lindsay Kaori Aguena dos.

Infecção pelo vírus da dengue: foco na resposta imunológica / Lindsay Kaori Aguena dos Santos. — São Paulo, 2022.

38 p.: il., color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) — Universidade Santo Amaro, 2022.

Orientadora: Prof.ª Me. Dr.ª Marina Tiemi Shio.

1. Dengue. 2. Flavivírus. 3. Sistema imunitário. I. Shio, Marina Tiemi, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Fernando Carvalho — CRB8/10122

Lindsay Kaori Aguena dos Santos

INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE: FOCO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Santo Amaro - UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Biomedicina.

Orientador (a): Profª. Me. Drª Marina Tiemi Shio.

São Paulo, 7 de dezembro de 2022.

Banca Examinadora

Dr. João Paulo Ferreira (UNIFESP)

_____

Ms Letícia Torres Dias (UNISA)

_____

Profª. Me. Dr. Marina Tiemi Shio

Conceito Final: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a minha mãe, Diva Aguena, que com muito carinho e apoio não mediu esforços para que eu concluísse essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente a Deus, que me concedeu saúde física e psicológica durante toda essa caminhada, me cercando de pessoas amáveis e compreensíveis que sempre me deram todo o suporte necessário.

Um agradecimento muito especial à minha mãe, Diva Aguena, que me ajudou na realização desse sonho. Sempre me apoiando e fornecendo suporte necessário para alcançar essa meta importante, a minha conquista só foi possível graças a vossa eterna força de vontade.

Agradeço imensamente a Profª. Me. Drª Marina Tiemi Shio, por aceitar ser minha orientadora e me guiar nesse trabalho.

EPÍGRAFE

“Num país como o Brasil, manter a esperança viva é em si um ato revolucionário”.

Paulo Freire

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Partícula viral do DENV 18
Figura 2 - Ciclo de replicação do vírus da dengue 19
Figura 3 - Respostas inflamatórias durante a infecção pelo vírus da Dengue 31

1. INTRODUÇÃO 13
2. OBJETIVO 14
3. METODOLOGIA 14
4. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO 14
5. REVISÃO DA LITERATURA 15
5.1 - Dengue no Brasil 15
5.2 - Dengue no Rio de Janeiro 15
5.3 - Estrutura do Vírus da Dengue 16
5.4 – Transmissão 18
5.5 - Ciclo de Replicação do Vírus da Dengue 19
5.5.1 - Fusão e Liberação do Genoma 20
5.5.3 - Replicação viral 21
5.5.4 - Montagem de proteínas virais 22
5.5.5 - Maturação e saída do vírus 23
5.6 - Método de diagnóstico 24
5.6.1 - Isolamento viral 24
5.6.2 - RT-PCR (convencional e real time) 24
5.6.3 - Detecção de Antígeno NS1 25
5.6.4 - Detecção de Anticorpos 25
5.6.5 - Prova do laço 27
5.7 - Prevenção 27
5.8 - Tratamento 28
5.9 - Cenário de desenvolvimento das vacinas contra a Dengue 28
5.9.1 - Construção Dengvaxia 29
6. RESULTADOS 29
6.1 - Patogênese do vírus da Dengue dentro do hospedeiro 29
6.2 - Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) 30
6.3 - Síndrome do Choque Associada à Dengue (SCD) 30
6.4 - Inflamação durante a infecção pelo vírus da Dengue 31
Figura 3 - Respostas inflamatórias durante a infecção pelo vírus da Dengue: 32
6.5 - Respostas das células imunes à infecção pelo vírus da Dengue 32
6.6 - Morte celular induzida pelo vírus da Dengue 33
6.7 - Regulação da apoptose durante a infecção pelo Vírus Dengue 34
6.8 - Imunopatogênese da Dengue 34
6.10 - A patogênese da Dengue no pulmão 36

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS 37
REFERÊNCIAS 38

RESUMO

O vírus da Dengue é uma arbovirose que pertence à família Flaviviridae, do gênero Flavivírus, onde possui quatro sorotipos geneticamente distintos, DEN-1, DENV-2, DEN-3 e DENV-4. O vírus é transmitido pela fêmea do mosquito *Aedes aegypti* (quando também infectada pelo vírus) causando a manifestação clássica da doença ou na forma hemorrágica.

A transmissão é favorecida pelo descuido do homem, deixando água parada em pneus, vasos de plantas ou qualquer outro objeto que possa armazenar água da chuva, levando ao período de proliferação das larvas e posteriormente os mosquitos. No verão aumenta os criadouros por conta de chuvas e altas temperaturas, acelerando o desenvolvimento do mosquito.

Os pacientes infectados pelo vírus podem apresentar sinais e sintomas como febre, dor de cabeça, cansaço, dores musculares e vômitos, nesse momento o sistema imunológico começa a trabalhar para combater o vírus. Uma resposta inflamatória começa acontecer, recrutando monócitos/macrófagos para os sítios de infecção primária. O vírus começa a se multiplicar e replicar, o DENV se replica com a ajuda de um complexo de replicação, que é um compartimento citoplasmático que se projeta para o reticulo endoplasmático. Os métodos de diagnósticos são constituídos pela técnica de ELISA, RT-PCR e prova do laço. O tratamento pode ser feito com uso de analgésicos e antitérmicos.

O objetivo do trabalho é apresentar qual a funcionalidade das células imunológicas diante de uma infecção, apresentar métodos de prevenção e qual técnica deve ser utilizada para o diagnóstico.

A metodologia do trabalho foi buscar informações em bancos de dados confiáveis para apresentar conhecimento sobre o assunto apresentado.

Como resultado o entendimento de como o vírus age no organismo do hospedeiro e como devemos nos manter protegidos do mosquito *Aedes aegypti.*

Palavras-chave

DENV, dengue, *Aedes aegypti*, Flavivírus, proliferação, sistema imunológico, tratamento e prevenção.

ABSTRACT

Dengue virus is an arbovirus that belongs to the Flaviviridae family, of the Flavivirus genus, where it has four genetically distinct serotypes, DEN-1, DENV-2, DEN-3 and DENV-4. The virus is transmitted by the female Aedes aegypti mosquito (when also infected by the virus) causing a classic manifestation of the disease or in the hemorrhagic form.

Transmission is favored by man's carelessness, leaving standing water in tires, plant pots or any other object that can store rainwater, leading to the anticipation period of the larvae and later the mosquitoes. In the summer, breeding sites increase due to rains and high temperatures, accelerating the development of the gnat.

Patients infected by the virus may show signs and symptoms such as fever, headache, fatigue, muscle aches and vomiting, at which point the immune system begins to work to fight the virus. An inflammatory response begins to take place, recruiting monocytes/macrophages to the sites of primary infection. The virus begins to multiply and replicate, DENV replicates with the help of a replication complex, which is a cytoplasmic compartment that protrudes into the endoplasmic reticulum. The diagnostic methods are constituted by the technique of ELISA, RT-PCR and loop test. Treatment can be done with the use of analgesics and antipyretics.

The objective of this work is to present the functionality of immune cells in the face of an infection, to present methods of prevention and which technique should be used for the diagnosis.

The methodology of the work was to seek information in reliable databases to present knowledge on the subject presented.

As a result, the understanding of how the virus acts in the host organism and how we must remain protected from the Aedes aegypti mosquito.

Key words

DENV, dengue, Aedes aegypti, Flavivirus, proliferation, immune system, treatment and prevention.

1. INTRODUÇÃO

A dengue pertence à família Flaviviridae, do gênero Flavivírus que se agrupam em quatro sorotipos do complexo antigênico. Com uma morfologia esférica, genoma de cadeia simples e com polaridade positiva, pode apresentar um ácido nucleico com 11kb de comprimento. Seu genoma possui uma única fase de leitura onde codifica uma proteína, originando proteínas estruturais e não estruturais. A transmissão envolvendo humanos e mosquito (*Aedes aegypti*) em centros urbanos pode causar muitos problemas. A fêmea adulta deposita seus ovos em recipientes como vasos de plantas e pneus, acima da linha da água. Em 48 horas em um ambiente úmido e quente o desenvolvimento embrionário é concluído.

Através das glândulas salivares da fêmea, o vírus da dengue é liberado na pele do hospedeiro no repasto sanguíneo, iniciando a replicação viral no tecido secundário do vetor. A dengue tem uma curta duração no hospedeiro, em média de 2 a 7 dia, a febre é a primeira manifestação da doença, seguido por dores de cabeça, vômitos, dores nas articulações entre outro.

A células do sistema imunológico começam atuar nesse momento, com o recrutamento e extravasamento de neutrófilos, ativação de células endoteliais, e a formação de agentes quimiotáticos que recrutam monócitos/macrófagos para o sítio de infecção primária. As células Natural Killer (NK) são recrutadas com o objetivo de reduzir a replicação do patógeno durante o estágio inicial. A infecção pelo vírus da dengue foi observada no pulmão e fígado através das células dendríticas, monócitos e macrófagos.

O método mais utilizado para a confirmação do diagnóstico de dengue é através da RT-PCR (convencional e real time), com uma alta sensibilidade, especificidade e menor possibilidade de contaminação, pode ser considerada a melhor opção para um diagnóstico preciso.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo fazer uma revisão narrativa sobre a resposta imunológica do hospedeiro, indicando a funcionalidade das células no combate ao vírus DENV.

3. METODOLOGIA

Teve como base livros e artigos pesquisados nas bases de dados como PubMed, SciELO, Ministério da Saúde e Fiocruz, sem intervalo de tempo e na língua portuguesa e inglesa. Utilizando a combinação das palavras *Aedes aegypti*, dengue, diagnóstico e tratamento, sistema imunológico, dengue no Brasil, Flavivírus.

4. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

A incidência da dengue está aumentando consideravelmente nos últimos anos, e cada vez as manifestações clinicas da doença está se apresentando de forma mais grave. O Brasil tem sofrido com o mosquito da dengue, em regiões como São Paulo, Minas Gerias, Nordeste e no Estado do Rio de Janeiro, onde o aumento é significativo.

Esse trabalho visa avaliar como as células do sistema imune age durante a presença do vírus no organismo do hospedeiro, como ocorre a replicação dos antígenos, e a resposta imune das células (CD68+, T CD4+ E T DC8+). O conhecimento de como o nosso organismo funciona, contribui significativamente para identificação dos alvos celulares envolvidos na patogênese da dengue no paciente. O entendimento dessas alterações podem ser relevante, pois permite um tratamento em paciente em casos mais graves.

5. REVISÃO DA LITERATURA

5.1 - Dengue no Brasil

No Brasil, a dengue se apresenta um padrão sazonal, com um aumento de casos nos primeiros cinco meses do ano, períodos mais quentes e úmidos. A primeira epidemia documentada aconteceu em Boa Vista (RO) no ano de 1981, quando foram isolados os sorotipos 1 e 4. Em 1986, a dengue adquiriu muita importância epidemiológica, quando surgiu a epidemia no Estado do Rio de Janeiro com a circulação do sorotipo DENV1, que logo alcançou a região nordeste. Com isso a dengue se tornou endêmica no Brasil, intercalando-se em epidemias. Entre os anos de 1986 e 1990, as epidemias de dengue se restringiram em alguns Estados da região sudeste como Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerias e no Nordeste, Pernambuco, Alagoas, Ceara e Bahia. Nos anos de 1990 a situação se agravou no Estado do Rio de Janeiro com a introdução do sorotipo DENV2. Em 2001, o sorotipo DENV3 foi introduzido no Rio de Janeiro e Roraima, acredita-se que esse sorotipo chegou ao Brasil através do intenso trânsito de pessoas na fronteira entre Brasil e Venezuela.[1]

5.2 - Dengue no Rio de Janeiro

O estado do Rio de Janeiro é uma região muito importante na epidemiologia de dengue no Brasil, por ser um centro turístico foi o local de introdução e disseminação dos sorotipos 1,2 e 3 no país, com alta infestação de *Aedes aegypti*. O primeiro surto de dengue ocorreu no ano de 1986 no subúrbio do município de Nova Iguaçu (RJ), onde houve o isolamento do sorotipo DENV-1, com uma população numerosa e que diariamente se deslocava para áreas vizinhas onde ocorreu uma rápida disseminação do vírus para outras regiões do estado e país, com uma estimativa de 95 mil casos notificados entre os anos de 1986-1987. No ano de 1990, houve novamente um período de alta atividade viral de DENV-1, no mesmo ano na cidade de Niterói (RJ) foi identificado a presença do sorotipo DENV-2, os dois sorotipos ficaram circulando simultaneamente até o ano seguinte, com cerca de 140 mil casos notificados. Nesta epidemia, muitos pacientes apresentaram trombocitopenia e quadros clínicos mais grave, na cidade de Niterói houve um caso fatal de FHD/SCD devido a DENV-2, onde o paciente sorologicamente confirmado pelo igG para anti-DENV1, infectado em 1987, adquiriu uma infecção secundária.[1]

Entre 1992-1994 se manteve baixo o nível de atividade viral, porém entre os 1995-1996 outra pandemia foi registrada, novamente com a circulação do vírus DENV-1 e DENV-2, sendo notificado 51.465 casos da doença. Em 1997 poucos casos de FH foram notificados, mas 1998 no Vale da Paraíba, uma nova epidemia atingiu o país, com uma rápida disseminação, inclusive na região dos Lagos uma importante área turística do Estado. No final do 2000, o sorotipo DENV-3 chegou no Estado do Rio de Janeiro novamente na cidade de Nova Iguaçu, a partir de então uma nova co circulação de sorotipos, agora DENV-1, DENV-2 e DENV-3. A introdução deste novo sorotipo contribuiu no aumento de novos casos no Estado no ano de 2001.[1]

No ano de 2002 durante o período de verão ocorreu a maior e mais importante epidemia já registrada no Estado, com 288.245 casos notificados, incluindo 1.831 de FHD/SCD e 91 mortes. A partir do ano de 2005, houve novamente um aumento nos casos de dengue que durou até o ano de 2008, quando o Brasil notificou 806.036 mil casos de dengue, com uma ocorrência de 425,1 casos novos por 100 mil habitantes, sendo que 255.818 destes casos ocorreram só no estado do Rio de Janeiro, com uma incidência de 1611,7 novos casos por 100 mil habitantes. Em 2009 houve uma redução da doença em relação ao ano interior.[1]

É importante destacar que entre 2002 e 2006, o DENV-3 foi o sorotipo predominante na maioria dos estados brasileiros, e que entre 2007 e 2009 o DENV-2 voltou a ser o mais frequente causando um deslocamento dos casos graves para os menores de 15 anos. Entre 2009 e 2011, os monitoramentos apontam para a recirculação do DENV-1, o que pode ocasionar um aumento ainda maior das formas graves da doença, afetando principalmente crianças e adolescentes, já que na última década houve uma baixa circulação deste sorotipo. Já havia registros da entrada do sorotipo DENV-4 em Boa Vista (RO) e sua disseminação para outras regiões.[1]

5.3 - Estrutura do Vírus da Dengue

O vírus da Dengue é uma arbovirose que pertence à família Flaviviridae, do gênero Flavivírus se agrupam em sorotipos diferentes dentro do complexo antigênico. O vírus tem morfologia esférica, cerca de 40 a 50 nm de diâmetro, o genoma uma cadeia simples com polaridade positiva, com ácido nucleico com 11kb de comprimento e com terminações arredondadas de cerca de 2 nm de diâmetro. O genoma possui uma única fase de leitura onde codifica uma poliproteína que de imediato é processada originado proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais incluem a

proteína (C), denominada proteína de capsídeo, que junto com o ssRNA formam um núcleocapsídeo viral. As três proteínas codificadas pelo genoma são as proteínas de membrana (M), as proteínas de envelope (E) e a proteína capsídeo (C) (Figura 1). Existem sete proteínas não estruturais (NS) são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. No genoma tem-se regiões não codificadas 3`UTR e 5`UTR, respectivamente com 450 e 96 nucleotídeos. No processo de replicação viral, estão envolvidos alguns elementos virais da região 3`UTR, regulação da tradução, síntese de RNA e interação com as proteínas virais e celulares.[2]

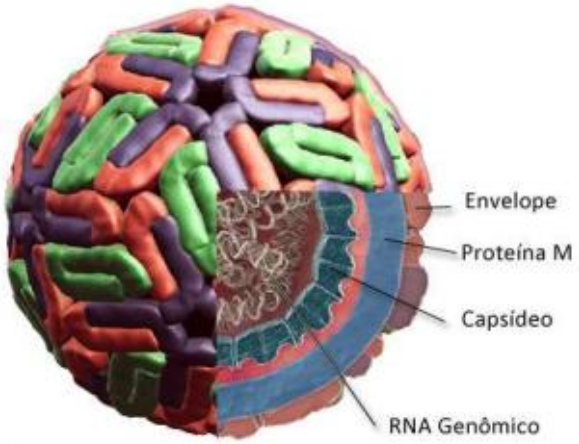
A proteína M, inibe a atividade de fusão da proteína E durante a maturação do vírus no interior da célula, as proteínas não estruturais estão relacionadas no processo de replicação do RNA viral. A proteína NS5 se destaca, pois possui atividade de RNA polimerase e metiltransferase, a NS3 possui a atividade de helicase, protease e trifosfatase de RNA e NS2A e NS4B inibem a sinalização por interferões. A proteína C é o primeiro polipeptídio viral sintetizado, ela está envolvida na formação do componente estrutural do nucleocapsídeo. Possui uma carga altamente positiva, pois é rica em resíduos de arginina e lisina. Com uma grande proporção de aminoácidos básicos, a proteína C se torna capaz de neutralizar a carga negativa do RNA viral, com o qual está associado.[2]

A prM é uma glicoproteína precursora da proteína M, a clivagem da prM durante a maturação viral dá origem à proteína M, responsável pela organização da estrutura superficial e pela infectividade do vírus. A proteína E é o maior componente da superfície viral, ela está envolvida em várias atividades biológicas do ciclo viral, incluindo a montagem viral, indução de anticorpos, neutralizantes, interação e fusão com receptores da superfície das células alvos e de possuir atividades hemaglutinantes.[1]

A proteína NS1, é uma glicoproteína e pode ser encontrada no meio extracelular de culturas infectadas ou na superfície celular, tem o desempenho de maturação viral e importância imunológica. A proteína NS3 tem a função de protease e de helicase, a NS5, apresenta atividade de RNA polimerase, essas duas proteínas são altamente conservadas entre os Flavivírus. As pequenas proteínas como a NS2A, NS2B, NS4A e NS4B, são pouco conhecidas, acredita-se que a NS2A esteja implicada no processamento da NS1, juntamente com a NS4A e a NS4B, esteja envolvida no

processo de replicação de RNA. A NS2B, seria um cofator essencial para a atividade de protease da NS3.[2]

Figura 1 - Partícula viral do DENV



Fonte: (Estudo da Imunopatogênese em múltiplos órgãos de casos fatais de dengue em crianças: Detecção do antígeno viral, perfil de citocinas e mediadores inflamatórios, 2020) [2].

5.4 – Transmissão

Esses vírus são adaptados aos seres humanos, no qual se mantém um ciclo endêmico e epidêmico, envolvendo humanos e mosquitos em centros urbanos tropicais, e o mosquito vetor principal é o a *Aedes aegypti*. A fêmea adulta deposita seus ovos na água, em recipientes como vasos de plantas, pneus de automóveis velhos e baldes com água parada, isso acima da linha da água. Os ovos são depositados individualmente em diversos recipientes para garantir a dispersão e sobrevivência dos ovos, em 48 horas em um ambiente úmido e quente o desenvolvimento embrionário é concluído.[3]

Ao entrarem em contato com a água, os ovos são rompidos, com isso a origem da primeira larva passando por 4 estágios L1, L2, L3 e L4, onde a duração do desenvolvimento pode depender da temperatura, disponibilidade de alimentos e a densidade larval. No 8° dia de desenvolvimento, as larvas dão origem as pupas, que se movimentam livremente nos recipientes. O estado de pupa geralmente pode durar de 2 a 3 dias, depois disso surgem os mosquitos adultos. As fêmeas possuem o hábito diurno, ao amanhecer e antes do pôr do sol, podendo realizar múltiplas ingestões de sangue em diferentes indivíduos. A fêmea é infectada quando faz uma refeição

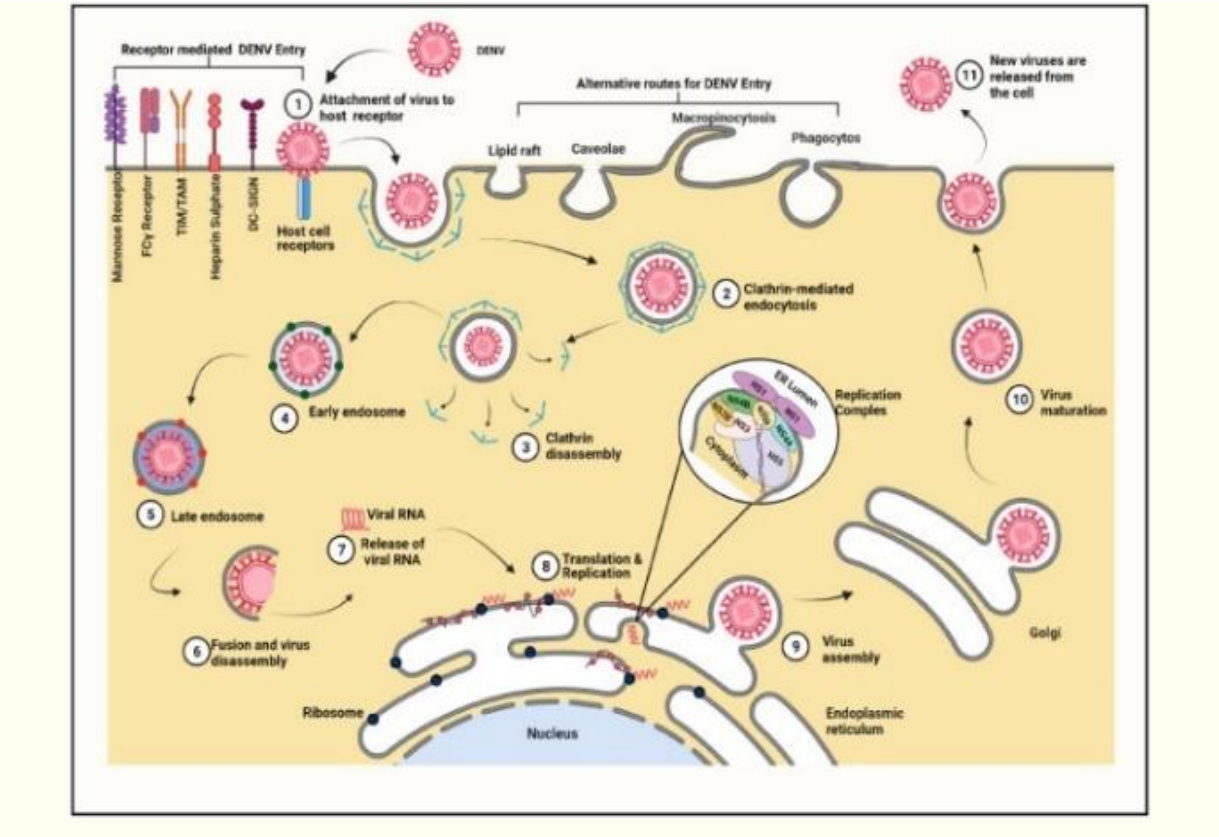
sanguínea durante a fase febril aguda da doença, uma vez que as glândulas salivares são infectadas o mosquito se torna infeccioso, infectando outras pessoas durante a alimentação sanguínea, o mosquito permanece infeccioso por toda sua vida.[3]

Os mosquitos adultos são pequenos e seu corpo e pernas são marcados com listras pretas e brancas. São altamente antropofílicos e domiciliados, além disso, possuem uma grande capacidade de adaptação às transformações ambientais impostas pelo homem. Somente as fêmeas são hematófagas, podendo se alimentar tanto de humanos como de outros mamíferos, o que é essencial para o desenvolvimento de seus ovos.[3]

5.5 - Ciclo de Replicação do Vírus da Dengue

É essencial que um vírus de RNA, como o DENV estabeleça contato, se ligue e penetre no hospedeiro (Fig. 2) vulnerável para obter à maquinaria celular do hospedeiro para sua própria multiplicação. Através das glândulas salivares da fêmea patogênica do mosquito *Aedes aegypti,* o vírus da dengue é liberado na pele do hospedeiro no repasto sanguíneo, a replicação viral se inicia no tecido secundário do vetor. Essa replicação viral leva à liberação de vírions na saliva antes da transmissão do vírus no hospedeiro humano. O DENV se liga em uma variedade de moléculas, ampliando seu horizonte para infectar diversas células, mas não estão restritas a células epiteliais, fibroblastos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B, células T, células endoteliais hepatócitos.[3]

Figura 2 - Ciclo de replicação do vírus da dengue:



Fonte: (Dengue Virus Infection: A Tale of Viral Exploitations and Host Responses. Viruses, 2021.)[4]

5.5.1 - Fusão e Liberação do Genoma

Após a ligação aos receptores cognatos das células hospedeiras, o vírus é internalizado em uma estrutura semelhante a uma bolha revestida de clatrina, também conhecida como endossomal (Fig. 2). O vírion é principalmente internalizado no endossomal inicial com Rab5, mais tarde amadurece ou se funde com o endossomo tardio pré-existente com Rab7. Quando o vírus internalizado experimenta um pH ácido dentro do endossomo, a proteína E (dímero) e a PrM-E (trímero) sofrem várias mudanças adicionais. Em casos de vírus maduro, a dissociação dos homodímeros da proteína E, onde o domínio II da proteína E se articula para fora da superfície do vírus, deixa a alça de fusão exposta, que é seguida por um reparo da proteína E. A alça de fusão na ponta do Domínio II interage com a membrana endossomal do hospedeiro levando a trimerização da proteína E se estendendo até a ponta da base, o que causa mudanças conformacionais, como a rotação do Domínio III, ocorrendo o deslocamento de trímero, levando à fusão do envelope viral e da membrana endossomal do hospedeiro. A presença de lipídeos aniônicos nos endossomos tardios atuam de uma maneira importante na fusão da membrana viral e endossomal, levando

à implantação do nucleocapsídeo viral no citosol. Poucas vias de alternativas de tráficos do vírus são relatadas que incluem a endocitose mediada por receptores independente de clatrina, penetração direta através da membrana plasmática da célula do hospedeiro através de fusão ou difusão, é também são conhecidas por liberar o nucleocapsideo no citoplasma do hospedeiro.[4]

5.5.2 - Transporte do Genoma viral

A proteína do capsídeo altamente básica liga-se ao RNA viral com uma grande afinidade, porém com pouca especificidade. A proteína C que reveste o genoma viral no nucleocapsídeo é perdida por meio de um mecanismo desconhecido, porém essa suspeita-se que essa etapa não degradativa da ubiquitinação desempenha um papel no desnudamento do genoma. Em estudos recentes afirmaram que a inibição da ubiquitinação bloqueou o desnudamento do genoma do DENV, que a inibição da enzima ativadora da ubiquitina E1 estabilizou o genoma viral, mantendo-o nos endossomos ou nucleocapsideos durante a infecção. Acredita-se que a maquinaria do citoesqueleto que sobre modificação constante, esteja facilitando a translocação do genoma viral não revestido para o reticulo endoplasmático rugoso, porém o mecanismo exato ainda é desconhecido. Esse RNA viral de sentido positivo transportado pode agir diretamente como mRNA para a síntese de proteínas e atuar como uma fita molde para a replicação do genoma viral.[4]

5.5.3 - Replicação viral

O genoma viral transportado para o reticulo endoplasmático, auxilia para sintetizar proteínas virais e replicar o genoma viral (FIGURA 2). A replicação do genoma viral é unida a tradução do polipeptideo, pois as proteínas virais pré-requisitos para a replicação do RNA. Um complexo proteico de múltiplas subunidades residente no reticulo endoplasmático, nomeado complexo de proteínas de membrana do reticulo endoplasmático ou EMC, desempenham um papel muito importante na biossíntese da poliproteina do vírus da dengue.[4]

O DENV se replica com a ajuda de um complexo de replicação, que é um compartimento citoplasmático que se projeta para o reticulo endoplasmático. A mesma fita de RNA de sentido positivo pode ajudar como molde tanto para proteínas sintetizadoras quando para a fita negativa complementar. A estrutura do genoma viral facilita ambos os processos, a forma circular é dedicada a transcrição e a forma linear é dedicada a tradução e síntese de proteínas. A extremidade C-terminal da proteína

NS3, consiste em três propriedades enzimáticas: uma 5' RNA-trifosfatase (RTP), um nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e uma helicase. A NS3 forma um complexo com NS5 e auxilia na replicação através do desenrolamento do RNA viral e desfosforilação antes da terminação 5'. A tradução e maturação de proteínas virais levam a mudança conformacionais nas membranas do reticulo endoplasmático, para formarem membranas convolutas e pacotes de vesículas que são conectadas ao citoplasma por meio de estruturas semelhantes a poros para suprir os fatores essenciais, como os nucleotídeos. Os pacotes de vesículas contêm NS5 (RdRp), NS3 (possuindo propriedades enzimáticas: helicase), 5' RNA-trifosfatase (RTP), um nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e outras proteínas NS virais, além dos fatores do hospedeiro que aceleram a replicação do RNA, coletivamente conhecido como o complexo de replicação.[4]

O SLA em 5’ URT atua como um promotor para NS5, o RdRp viral. A destinação de NS5 para a extremidade 3’ é facilitada pela ciclização do genoma para o início da síntese do RNA. O pareamento de bases entre as sequencias complementares de 5’ e 3’ UAR desembrulha 3’ SL tornando-o disponível para replicação. A iniciação necessária para o alongamento do RNA é realizada por NS5 via síntese de um nucleotídeo CU. O suporte negativo recém-sintetizado permanece ligado ao molde positivo formando dsRNA. Além do mais, essa fita negativa serve como um molde, e a fita positiva nascente recém-sintetizada desloca a preexistente e forma o intermediário de dsRNA.[4]

Esse intermediário de dsRNA amplifica fitas positivas de RNA viral, com isso a replicação do RNA é assimétrica gerando um número 10 vezes maior de copias de RNA de fitas positivas do que RNA de fitas negativas. O capeamento e a metilação do RNA de fita positiva ocorrem co-transcricionamente, observados no RNA viral genômicos, porém não ausente nos intermediários de dsRNA. Esses novos ssRNAs de sentido positivo podem ser traduzidos ou encapsulados para facilitar a criação de novas partículas virais.[4]

5.5.4 - Montagem de proteínas virais

A formação de nucleocapsídeo, é uma interação eletrostática que o resulta na ligação de proteínas do capsídeo carregada positivamente ao RNA carregado negativamente. O RNA viral de fitas positivas recém-sintetizado liga-se a NS2 por meio de interações entre 3’UTR do RNA. O NS2 também é observado para o recrutar as poliproteínas C-

prM-E e traduzidas juntas com proteases NS2B-3 para o local de montagem. As proteínas prM e C estão ligadas em uma âncora (um peptídeo sinal hidrofóbico), que atravessa a membrana do reticulo endoplasmático. A junção C-âncora é clivada por NS3B na presença de NS2B como um cofator chamado de NS2B-3, atuando como serina protease, que leva a prM livre e uma proteína madura do capsídeo para se ligar ao RNA, e assim formando o nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo surge com a membrana do reticulo endoplasmático na presença de proteínas E e prM no lúmen e percorre a via secretora como uma partícula de vírus imatura, em que o domínio pr de prM cobre a alça de fusão da proteína E, para evitar a fusão prematura do vírion imatura para a membrana do hospedeiro.[4]

5.5.5 - Maturação e saída do vírus

A proteína E do vírion imaturo que está parcialmente montada, sofre alterações conformacionais reversíveis dependendo do pH seguindo a via secretora durante a saída dos vírions. Trímeros de heterodímeros prM-E são as partes de partículas virais imaturas, enquanto um vírus maduro consiste em homodímeros da proteína E, e pode ser observado após a fusão da membrana endossomal viral do hospedeiro. A partícula do vírus viaja através do Golgi para o TGN (rede trans-Golgi), onde a proteína prM é clivada pela protease furina, causando uma transição da partícula do vírus imaturo (pontiagudo) para uma partícula lisa. Apesar disso a associação continuada do segmento pr com o vírion e observada até que seja liberada da célula hospedeira, essa retenção do segmento pr durante o trânsito do vírus no ambiente ácido TGN previne uma ligação prematura da proteína E à membrana exossomal.[4]

Além dessa retenção o pr pode ser necessário para outras atividades virais, como uma interação com as vacuolares ATPases, que podem reduzir a replicação do DENV enquanto extinta, constituindo um mecanismo para favorecer o tráfico de flavivírus, estabelecendo um ambiente de pH adequado para a secreção eficiente de vírus. As enzimas V-ATPases e multi-subunidades, são conhecidas por acidificar várias organelas, como os lisossomos e componentes da via secretora que ajudam o processamento e a degradação ácido-dependente de proteínas durante a infecção. Uma interação de resíduos V-ATPases com prM é essencial para a saída viral. Além disso, aas chaperonas que residem no reticulo endoplasmático, que são já são conhecidas por interagir com a proteína E, são sugeridas para participar do dobramento e montagem das proteínas virais. As partículas virais maduras, quando

são liberadas no TGN, entram nos citoplasmas e exocitose para a membrana celular externa. Com isso o pr e os vírions são clivados e liberados no meio extracelular. Um vírion maduro consiste em um RNA de fita simples de sentido positivo encapsulado em múltiplas cópias de proteína C, circulando livremente pela bicamada lipídica na qual as proteínas virais transmembranas estão inseridas, assim formando um invólucro de glicoproteína que consiste em 180 cópias de proteínas de envelope e membrana. [4]

5.6 - Método de diagnóstico

Até a década de 70 os testes realizados para o diagnóstico da dengue eram os testes de inibição de hemaglutinação (HI), fixação do complemento (CF) e teste de neutralização. Desde então houve o desenvolvimento da técnica ELISA isso ainda nos anos 70, e a chegada da biologia molecular na década de 80 que foram fundamentais para o avanço, não só para o avanço laboratorial da dengue, mas para o diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas no geral. Atualmente as técnicas disponíveis para o diagnóstico para a dengue incluem: o isolamento e detecção do vírus, detecção do RNA viral, detecção de antígenos ou anticorpos, ou a combinação delas. Levando em consideração a cronologia da infecção.[4]

5.6.1 - Isolamento viral

A detecção do vírus através do isolamento viral é considerada definitivo, porém alguns aspectos práticos limitam seu uso: o alto custo de manutenção do laboratório e de pessoas capacitadas, o breve período de viremia no qual o vírus pode ser recuperado, a termolabilidade do vírus que temos que levar em consideração nos procedimentos de coleta e o transporte e armazenamento das amostras.[5]

5.6.2 - RT-PCR (convencional e real time)

Desde os anos 90, diferentes protocolos de RT-PCR foram desenvolvidos e aplicados para a pesquisa e diagnostico de dengue. Os ensaios que envolvem a amplificação e detecção do RNA viral que envolve algumas etapas: extração e purificação do ácido nucleico, conversão do RNA em cDNA e amplificação, e detecção e caracterização do produto amplificado. Ainda pode ser realizada uma segunda etapa de amplificação, utilizando-se simultaneamente os indicadores sorotipo-específico para a identificação dos quatro sorotipos virais, chamada Nested PCR. O produto das reações é separado por eletroforese em um gel de agarose e visualizado como bandas. Com isso os diferentes sorotipos são identificados pelo peso molecular das bandas características.

Com a alta sensibilidade e especificidade, fazem com que esse método se torne uma ferramenta importante na confirmação do diagnóstico. Comparado ao isolamento viral, a PCR demostra sensibilidade em 93% e 100% entre os quatro sorotipos.[5]

A RT-PCR em tempo real, é um ensaio realizado em uma única etapa utilizando indicadores e sondas fluorescentes especificas para cada sorotipo do vírus. A utilização de uma sonda fluorescente permite a detecção dos produtos de reação em tempo real, através de um equipamento específico, sem a necessidade de utilização de eletroforese em gel de agarose. Recentemente, a metodologia RT-PCR em tempo real vem gradativamente sendo substituída pela PCR convencional para o diagnóstico de dengue em amostras de fase aguda. A vantagem dessa metodologia convencional é a sua maior rapidez, possibilidade de quantificação do RNA viral, maior sensibilidade e menor possibilidade de contaminação.[5]

5.6.3 - Detecção de Antígeno NS1

Estudos mencionaram a utilização do antígeno NS1 do vírus da dengue no diagnóstico precoce da doença. A proteína se mostra presente em altos níveis no soro de pacientes na fase aguda da doença e sua utilização para o diagnóstico precoce parece promissora. Atualmente, diversos kits que utilizam esse princípio estão sendo comercialmente disponíveis, e sua especificidade e sensibilidade podem variar entre 52% e 84% e entre 90% e 100%, respectivamente.[5]

Na tentativa de agilizar e facilitar o diagnóstico do paciente, os testes imunomatográficos, que também utilizam como alvo a proteína NS1, se tornou uma alternativa rápida, prática e barata. Sabe-se que a sensibilidade dos testes rápidos para a detecção de antígenos NS1 pode variar muito, desde 41% a 89%, a especificidade é alta, geralmente próximo a 100%. No momento atual o Ministério da Saúde disponibiliza kits de teste NS1 ELISA para a triagem das amostras para o isolamento viral em unidades de sentinelas. Para a execução do teste as amostras devem ser coletadas até o quinto dia do início dos sintomas, do contrário realiza-se a pesquisa de anticorpos.[5]

5.6.4 - Detecção de Anticorpos

Entre as metodologias utilizadas para a detecção de anticorpos específicos estão: fixação do complemento (CF), teste de inibição da hemaglutinação (HI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), testes imunocromatográficos, e testes de neutralização.[5] Durante algum tempo, o teste de fixação do complemento (CF) foi considerado um

dos mais importantes no sorodiagnóstico, é baseado no princípio de que se houver anticorpos específicos para o DENV, esses irão se complexar com os antígenos, ativando a cascata e consumindo o complemento. Em uma segunda etapa mede-se a atividade hemolítica do complemento remanescente, permitindo e quantificando a presença de anticorpos na amostra inicial. Atualmente tem pouca aplicação clínica e não é mais manuseada na rotina laboratorial para o diagnóstico de dengue, pois precisam de profissionais capacitados e de difícil execução para obter um bom resultado.[5]

Por muitos anos HI foi o método padrão utilizado para o diagnóstico de dengue. O método corresponde na capacidade dos anticorpos específicos para dengue, presentes em amostra de soro, inibirem a aglutinação de eritrócitos. As desvantagens do método são a falta de especificidade, necessidade de amostras pareadas (amostra de fase aguda e de convalescença) e a incapacidade de distinção do sorotipo viral infectante.[5]

Na década de 70 a metodologia ELISA foi aplicada para o diagnóstico de dengue, essa metodologia oferecia diversas vantagens sobre as técnicas sorológicas até então utilizadas. Oferecendo uma maior sensibilidade, a utilização do soro e a possibilidade de diagnóstico usando apenas uma amostra de soro, enquanto para o HI, havia a necessidade de comparação entre amostras pareadas.[2]

No Brasil o método de captura de IgM (MAC-ELISA) é o método de escolha para a confirmação laboratorial na rotina. Nesse ensaio, o IgM total presente no soro do paciente é capturado por anticorpos específicos e imobilizado na microplaca. Então adicionado uma solução de antígenos específicos proveniente dos quatros sorotipos, ligando a anticorpos marcados com enzimas, que formam um “sanduiche”, caso exista a presença de anticorpos específicos anti-vírus Dengue. Uma das desvantagens desse método é que um resultado negativo obtivo em amostra de soro coletada em fase recente da doença, não exclui o diagnóstico de dengue. Uma vez que em alguns casos os níveis de IgM se tornam detectáveis pelo teste somente após 10 dias. Com isso, para a confirmação do diagnostico talvez seja necessária uma nova coleta.[5]

O ensaio de neutralização em placa (PRNT), é um teste sorológico específico para os flavivírus, e é sorotipo específico para os quatros vírus da dengue. O princípio desse ensaio é permitir que aconteça a interação viral após o plaqueamento dessa mistura em células susceptíveis. Quanto maior a presença de anticorpos de um sorotipo

específico, maior será a capacidade neutralizante e menor é a infecção do vírus nas células. O PRNT atualmente é o teste padrão para a avaliação de anticorpos neutralizantes, sendo utilizado para a avaliação de níveis de proteção.[5]

5.6.5 - Prova do laço

A prova do laço deve ser realizada obrigatoriamente em todos os casos com suspeita de dengue. É importante na hora da triagem do paciente.

• desenhar um quadrado de 2,5cm no braço do paciente, ou uma área ao redor da falange distal do polegar no antebraço da pessoa e verificar a pressão arterial do paciente infectado pelo vírus.

• calcular o valor médio.

• assoprar novamente o manguito até o valor médio e manter por volte de cinco minutos em adultos e em crianças, 3 minutos, ou até o aparecimento de petéquias ou equimoses;

• contar o número de petéquias no quadrado, a prova do laço será positiva se houver 20 ou mais petéquias em adultos e 10 ou mais em crianças.

A prova do laço é muito importante na triagem do paciente com suspeita de dengue, pois é a única manifestação hemorrágica do grau I de FHD representando a fragilidade capilar.[6]

5.7 - Prevenção

Os métodos de prevenção contam a dengue servem para todos, sempre manter a caixa d'água bem fechada, não acumular lixo no quintal, não deixar água parada em pneus e vasos de plantas. Além desses cuidados gerais, para as gestantes, utilizar roupas (cores claras, de preferência) que cubram todo o corpo (calças e blusas). Aplique repelente nas áreas ainda expostas. Esteja em locais com tela de proteção (janelas e portas), mosquiteiros ou outras barreiras. Use ar-condicionado e ventilador, se possível e não deixe de vistoriar sua casa. Escolha um repelente que possa lhe proteger pelo maior tempo possível, não utilizar mais de 3 vezes ao dia, pois o uso de forma exagerada aumenta o risco de absorção e toxicidade. Escolha sempre repelente registrados na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que são seguros e eficazes. Repelentes "naturais" à base de andiroba, citronela, óleos de cravo, entre outros, tem rápida evaporação e curta proteção.[7]

5.8 - Tratamento

Dengue clássica: Não há um tratamento específico, apenas o uso de analgésicos e antitérmicos (paracetamol e dipirona). Devem ser evitados os anti-inflamatórios não hormonais e os salicilatos, já que o uso desses medicamentos pode favorecer o aparecimento de manifestações hemorrágicas e acidose. Orientar o paciente a permanecer em repouso e iniciar hidratação oral.[7]

Febre Hemorrágica da Dengue – FHD: Os pacientes devem ser observados cuidadosamente, para a identificação dos primeiros sinais de choque. A primeira observação deve ser a transição da fase febril para a afebril, que geralmente ocorre após o terceiro dia da doença. Em casos menos graves, quando os vômitos ameaçarem causar desidratação, acidose ou se houver sinais de hemoconcentração, a reidratação pode ser feita em nível ambulatorial.[7]

5.9 - Cenário de desenvolvimento das vacinas contra a Dengue

Atingir o objetivo de uma vacina eficaz e segura capaz de prevenir doenças clinicamente significativas causadas por qualquer um dos sorotipos da DENV está sendo um grande desafio. Além da necessidade de desenvolver uma vacina para cada tipo de DENV e depois combiná-los, um outro desafio é a ausência de um modelo animal de doença bem caracterizado que recapitule a imunopatologia humana. A única vacina licenciada com a dengue é a Dengvaxia da Sanofi Pasteur, que foi registrada em 20 países endêmicos da dengue, porém a implementação da imunização foi limitada a programas subnacionais de saúde pública em apenas dois países, Filipinas e Brasil.[8]

A preocupação desses países em relação a vacina é o aumento do risco de dengue grave em indivíduos soronegativos para dengue vacinados e a acessibilidade da vacina. Duas outras vacinas contra a dengue atualmente estão na fase 3 de testes. A vacina contra dengue da Takeda, TAK-003, está sendo avaliada em um estudo de fase 3 em alguns países na Ásia e na América Latina, temos também a vacina do Instituto Butantan, Butantan-DV, está sendo avaliada na fase 3 no Brasil. A Butantan-DV é uma vacina de vírus vivo atenuada por mutagênese direcionada com uma quimera DENV-DENV (DEN-1, DENV-4/-2, DENV-3 e DENV-4). O TAK-003 é baseado no backbone DENV-2 com quimeras DENV-DENV (DENVV-2/-2, DENV-2, DENV-2/-3 e DENV-2/-4).[8]

5.9.1 - Construção Dengvaxia

A Dengaxia é uma vacina viva atenuada, tetravalente é formada por quimeras composta por genes de pré-membrana estrutural (prM) e envelope (E) dos quatro sorotipos de DENV combinados com os genes não estruturais da cepa vacinal da febre amarela 17D (dengue de febre amarela quimérica – CYD). Essa abordagem quimérica originou-se na Universidade de St. Louise e foi utilizada pela primeira vez para desenvolver uma construção de vacinas contra a encefalite japonesa. As cepas originais de Dengvaxia consistem no tipo 1: Tailândia PUO-359/TVP-1140, tipo 2: Tailândia PUO-218, tipo 3: Tailândia PaH881/88 e tipo 4: Indonésia 1228 (TVP-980). Cada CYD DENV monovalente foi adquirido separadamente através da tecnologia de ácidos desoxirribonucleico (DNA) recombinantes.[8]

Foram identificadas nove mutações em todos os tipos de DENV, cinco na passagem tardia (p10 – p21), três em uma população mista com a sequência original e uma mutação silenciosa (todas estavam nas regiões não estruturais (NS) exceto uma). A morfologia viral observada por microscopia eletrônica foi típica para flavivírus, em diferentes estágios de maturação, a proporção de partículas infecciosas para não infecciosas foi consistente em todas as etapas de produção.[8]

A Dengvaxia é fornecida em pó e solvente para suspensão, contendo ~5 $\log^{10}$ dose infecciosa de cultura de células e 50% (CCID50) de cada tipo de DENV vivo, atenuado, é um produto estéril e liofilizado reconstituído antes da injeção com uma solução estéril de cloreto de sódio a 0,4%. Já a vacina e o diluente são apresentados em frascos de dose única. Três doses da são vacina são fornecidas com 6 meses de intervalo.[8]

6. RESULTADOS

6.1 - Patogênese do vírus da Dengue dentro do hospedeiro

As primeiras células a encontrar a infecção são os macrófagos e as células dendríticas. Quando essas células infectadas atingem os linfonodos, os monócitos e macrófagos são expostos a infecção, com isso a infecção pelo DENV evoluir par viremia devido à presença do vírus em drenos e linfonodos remotos. A infecção do DENV foi observada em principais órgãos como, pulmão e fígado através das células dendríticas, monócitos e macrófagos.[9]

A dengue tem uma curta duração, em média 2 a 7 dias. A febre ocorre durante a fase febril aguda, sendo a primeira manifestação da doença, com intensidade variável entre 39ºC e 40ºC, vem acompanhada de dois ou mais dos seguintes sintomas: dores de

cabeça, vômitos, dores nas articulações, fraqueza, dor atras dos olhos e manhas vermelhas na pele. Em crianças a febre é frequente, dores abdominais leve e diarreia podem ocorrer, porém são mais frequentes em crianças com menos de dois anos de idade e em adultos. A comparação entre criança, adolescente e adultos é que apresentam uma "síndrome semelhante a gripe" incluindo dor de cabeça, mal-estar e dores no corpo e sintomas sugestivos mais proeminentes. Depois do 7º dia pode ocorrer uma melhora dos pacientes, durante o período no qual a febre diminuiu, o que pode indicar o início da fase crítica. Essa fase coincide com o extravasamento de plasma levando ao choque, as características são pulso fraco, taquicardia e hipotensão o choque acontece com o baixo volume de sangue. As manifestações clínicas da dengue em gestantes são a trombocitopenia, o aumento da permeabilidade vascular e os distúrbios da coagulação, trazendo sérias consequências para a gestante e o concepto nos primeiros meses, o perigo para as gestantes com dengue está na possibilidade de a doença afetar na coagulação sanguínea, ocasionando na perda do bebê.[9]

6.2 - Febre Hemorrágica da Dengue (FHD)

A maioria dos vírus relacionados a FH estão associadas a animais como primatas, roedores e morcegos, mas também pode ocorrer a transmissão por picadas de vetores antropofílicos que é o caso da dengue. A diferença entre a FHD e a dengue clássica, é que no terceiro e sétimo dia do início da doença se tem uma queda brusca da febre com isso o surgimento de mais sintomas como, vômito, letargia, dores abdominais intensas, desconforto respiratório e hepatomegalia dolorosa, esses sintomas podem demostrar a possibilidade de uma evolução levando a forma hemorrágica da doença. Esses sinais e sintoma precisam ser bem observados, pois a caracterização da doença só é feita a partir de um critério clínico e laboratorial, observar a hemoconcentração, proteínas de plaquetas e albumina sérica para o diagnóstico de FHD, pois não há um exame específico para o diagnóstico. Em alguns casos hemorrágicos a dengue clássica pode apresentar, epistaxe, gengivorragias, a presença de petéquias e outros fenômenos menores.[10]

6.3 - Síndrome do Choque Associada à Dengue (SCD)

Em alguns casos a dengue hemorrágica acontece após reinfecções com dengue secundária, mas pode acontecer infecções primárias em lactante, pois apresentam carga viral mais alta, taxa mais lenta de redução da carga viral e complexos imunes

contendo vírus, em crianças é a presença de anticorpos maternos, transmitidos por via transplacentária durante o primeiro ano de vida do lactante. Os sintomas graves da infecção por vírus da dengue normalmente iniciam-se com o aumento repentino da temperatura corporal e com a queda bruta da temperatura, também pode ocorrer dores constantes abaixo das costelas, tonturas ou desmaios devido a hipotensão e suores frios por um tempo prolongado.[10]

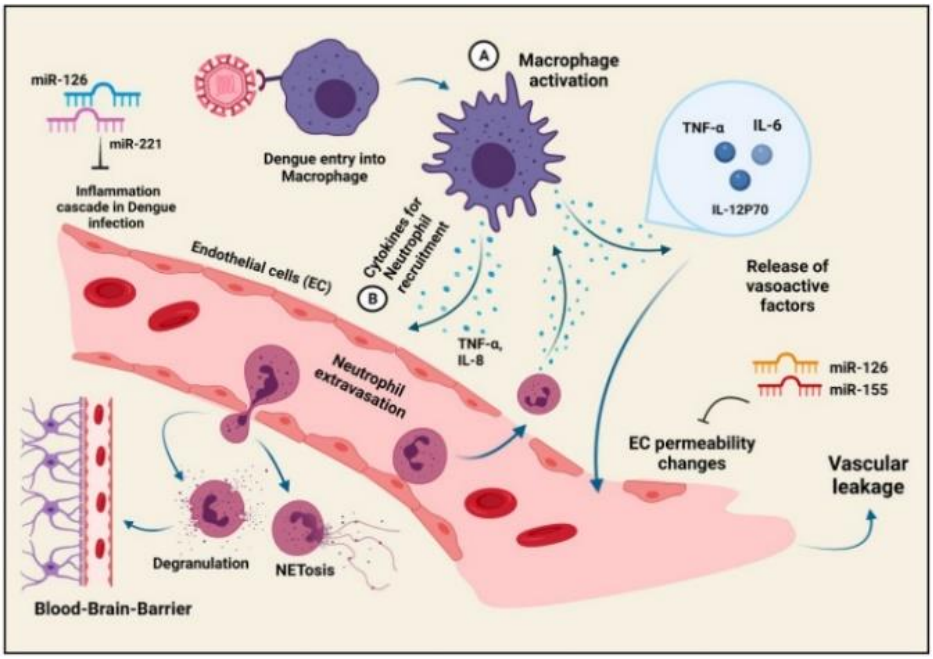
Observa-se também o aumento do volume do baço (esplenomegalia), aumento do tamanho do fígado(hepatomegalia), hemorragias mucosas e outros tipos de sangramento e fezes escuras como borra de café, indicando possível sangramento intestinal. Não sendo tratado o choque, o resultado é acidose metabólica e hemorragia do trato intestinal e de outros órgãos. Porém com o tratamento adequado a recuperação é rápida e sem complicações.[10]

6.4 - Inflamação durante a infecção pelo vírus da Dengue

Similar a qualquer outra infecção viral, a cascata de inflamação marca a resposta inicial do hospedeiro ao ataque do vírus (FIGURA 3). Uma resposta inflamatória representada por eventos como o recrutamento e extravasamento de neutrófilos, secreção de fatores vasoativos para ativação de células endoteliais (CE), bem como a formação de agentes quimiotáticos para recrutar os monócitos/macrófagos para os sítios de infecção primária. O que leva à síndrome de vazamento vascular, é um resultado de alterações na permeabilidade das células endoteliais que são induzidas pelas citocinas e quimiocinas vasoativas produzidas pelos macrófagos/monócitos ou pelas células dendríticas (DCs). Citocinas produzidas por macrófagos ou células dendríticas que apresentam níveis de expressão alteradas na infecção por DENV, são TNF- α, IL-6, MIF e certas metaloproteases. Apesar de que os macrófagos e as células dendríticas possam ser os principais indutores das alterações da permeabilidade do EC, o próprio EC participa da desregulação da inflamação. A formação de netose ou NET (neutrophil extracelular traps) por neutrófilos é uma característica observada em pacientes com febre hemorrágica da dengue (FHD).[10]

Apesar do DENV ser um vírus não neurotrópico, está associado a neuroinflamação e paralisia. As funções efetoras das células micróglias, células natural killer, neutrófilos, células T CD4+ e CD8+ no cérebro fortemente indicam neurodegeneração induzida por DENV como consequência de inflamação excessiva.[10]

Figura 3 **-** Respostas inflamatórias durante a infecção pelo vírus da Dengue:



Fonte: (Dengue Virus Infection: A Tale of Viral Exploitations and Host Responses. Viruses, 2021.)[4]

6.5 - Respostas das células imunes à infecção pelo vírus da Dengue

Tão intensamente o sistema imunológico inato e adaptativo da rede hospedeira se rebelam cooperativamente contra o ataque do DENV. As células dendríticas, Langerhans (LCs) e as células dérmicas no local da picada do mosquito são os primeiros a encontrar o DENV. Juntos com os macrófagos, são recrutados para o local da entrada do DENV por meio de sinais dos quimioatraentes. Os sinais de células dendríticas, como TNF- α, recrutam as células NK, que são cruciais para reduzir a replicação e patogênese do DENV durante os estágios iniciais da infecção. Os neutrófilos são recrutados pelos macrófagos para o local primário, residente nos tecidos através da secreção de IL-8, TNF- α E IFN- β. Fatores antivirais como defensinas e TNF- α são gerados por neutrófilos. No momento o sistema imunológico inato está limitando o vírus, o sistema imunológico adaptativo está se preparando para um ataque avançado de eliminação do vírus.[4]

As células B se ligam nos antígenos do DENV para induzir uma resposta de IgM, seguida por uma resposta de IgG específica do sorotipo DEN. A infecção secundaria é uma redução de IgM, mas uma resposta de IgG aumentada, basicamente os anticorpos têm como alvo as proteínas NS1, prM e E do DENV. O envolvimento das células B, aponta indiretamente para as células T na resposta a infecção, enquanto

as células T CD4+ destinam-se principalmente o capsídeo junto com as proteínas NS2A/B,3,5 e E, as células T CD8+ visam o capsídeo juntamente com as proteínas NS3, 4ª/B,5. Com isso essas respostas estimulam as células T CD8+ a secretarem granzimas e perforinas e as células T CD4+ a se envolverem em funções efetoras Th1. Além disto, outros subconjuntos de células T, atuam para regular a inflamação via TGF-β e IL-10, as células T foliculares atuam para ajuda as células B a gerar anticorpos altamente específicos.[4]

Embora todo o sistema imunológico trabalhe junto para uma luta incrível contra o DENV, algumas dessas respostas podem causar alguns danos ao hospedeiro, por meio de um evento chamado “tempestade de citocinas”. O evento da tempestade de citocinas nada mais é que o resultado do desequilíbrio entre as respostas das citocinas Th1 e Th2.[4] A superprodução de citocinas Th2, como IL-10 acaba superando as respostas de IFN, com isso levando ao aumento da carga viral de DENV, o que pode ser observado em pacientes com DHF. Os níveis aumentados de IL-10 podem contribuir para o vazamento de plasma. Além do mais, fatores citotóxicos liberados após a ativação de células Th CD4+ acionam os macrófagos para produzir espécies reativas de nitrogênio que sucessivamente estimulam as respostas Th2, instigando mudanças de permeabilidade e vazamento de plasma. Apesar dos anticorpos produzidos durante a infecção primária por DENV sejam bastante específicos, durante a infecção com um sorotipo heterólogo, as células de memória de baixa voracidade podem se cruzar com o antígeno para provocar uma tempestade de citocinas e resultar em complicações.[4]

6.6 - Morte celular induzida pelo vírus da Dengue

A morte celular durante infecções virais são cruciais na replicação e disseminação da patogênese viral. No estágio inicial da infecção, quando o vírus ainda não superou a maquinaria celular, os processos celulares buscam induzir a morte celular como um mecanismo para inibir a replicação e disseminação do vírus para as células não infectadas. Quando o vírus estabelece sua infecção, ele tenta alterar os processos de morte celular induzida para seu próprio benefício. O DENV é similar a outros vírus, modificar os processos de morte celular induzidos por apoptose e autofagia para definir uma infecção produtiva no hospedeiro.[4]

6.7 - Regulação da apoptose durante a infecção pelo Vírus Dengue

O vírus da dengue tem a capacidade de ter efeitos recíprocos na regulação do apoptose nas células. Os quatros sorotipos de DENV, induzem apoptose celular através do envolvimento das proteínas M citotóxicas. Proteínas indutoras de morte celular como Dax e RIPK2, são usadas durante a apoptose induzida pelo capsídeo. O DEV-1, induz apoptose pela ativação do fator transcrição NFkB e indução do estresse do RE, as proteínas C e prM do DENV-1 desencadeiam a apoptose baseada em mitocôndrias e p3 nas células HUH-7.[4]

A DEN-2, participa do processo pró e antiapoptose. As funções pró-apoptóticas envolvem ativação da Caspase-3, com a ativação do XAF-1, para desencadear a apoptose em 36h após a infecção. A via apoptótica intrínseca caracterizada por alterações morfológicas, como contração do citoplasma, formação de bolhas na membrana plasmática e inchaço das mitocôndrias, seguidas pela ativação de caspase-3 e caspase-9, resultam no apoptose e clivagem, relatado na infecção por DEN-2. A fosforilação de p53 e a redução do fator antiapoptótico Bcl-2, são indicativos da via apoptótica intrínseca.[4]

6.8 - Imunopatogênese da Dengue

Alguns casos de dengue, podem evoluir para uma dengue clássica, sem grandes complicações, para casos de dengue grave já podem evoluir para óbito.[10]

Pode se considerar fatores de risco para casos graves de dengue: o estado imunitário e genético do paciente, a cepa do sorotipo do vírus infectante, a infecção prévia por outro sorotipo viral da doença e a concomitância com outras doenças. A principal alteração fisiopatológica que faz a diferenciação de uma dengue clássica para uma dengue grave é o extravasamento plasmático, onde ocorre em consequência uma alteração na permeabilidade vascular. Em casos mais graves pode ocorrer choque hipovolêmico, devido a perda de grande volume plasmático.[2]

Acredita-se que essas alterações podem ser causadas mais pela ação de mediadores e citocinas do sistema imune do que pela ação direta do vírus em células endoteliais. Dos possíveis mediadores, os componentes C3a e C5A do sistema complemento estão elevados em pacientes que apresentam choque e doença grave. Entre as citocinas e mediadores químicos o TNF-α, lL-2, IL-6, IFN-γ, estavam elevados nos casos graves da doença. Pode ocorrer a apoptose das células endoteliais, levando a ruptura na parede de capilares e culminando com o extravasamento plasmático

generalizado. Os baixos níveis de albumina também estão relacionados com a gravidade da dengue, indicando intensa fragilidade capilar. A resposta fisiopatológica da dengue pode variar de acordo com o sistema imune do hospedeiro.[2]

6.9 - Patogênese da Dengue no fígado

O fígado é um dos principais alvos do DENV, o fígado de um paciente infectado pelo vírus apresenta variados graus de lesão. Alterações na morfologia dos hepatócitos são evidenciadas, como hipertrofia, vacuolização do citoplasma e desconexão dos cordões hepáticos. Além disso, alterações nucleares como fragmentação da cromatina (cariorrexe), redução do tamanho (picnose) ou perda do núcleo (cariólise) também são aparentes. Também podem ser observados infiltrado inflamatório mononuclear, na área periportal, contendo linfócitos, monócitos e neutrófilos.[2]

A detecção de CD68+ revela a presença de células de Kupffer e macrófagos circulantes, além da detecção de linfócitos TCD4+ e TCD8+ localizadas preferencialmente, margeando os capilares sinusoidais. Na região medizonal, foram observadas células mononucleares expressando citocinas como TNF-α, IFN-γ, IL-10, TGF-β e RANTES.[2]

TNF-α foi localizada em células de Kupffer e monócitos, o IFN-γ é encontrado predominantemente em linfócitos, monócitos e células de Kupffer. As células endoteliais dos capilares sinusoidais, linfócitos e monócitos expressam IL-10, macrófagos e células de Kupffer exmpressavam TGF-β. Em células endoteliais e células de Kupfer foram observadas a expressão da quimiocina RANTES.[2]

A localização do antígeno viral NS3 do DENV, foi observada em hepatócitos, células de endoteliais e nas células Kupffer. As células de Kupffer se apresentam hiperplásica, já as células endoteliais das áreas danificadas costumam se apresentar com os núcleos picnóticos. A correlação entre a presença de antígenos virais e os danos encontrados sugere que a replicação viral não é o único fator responsável por essa alteração, outros fatores como hipóxia, mediadores de hiper-reatividade imune e endotoxinas liberadas por macrófagos infectados também desempenham um papel. esta mudança na lesão hepática e apoptose.[2]

6.10 - A patogênese da Dengue no pulmão

Diversos graus de congestão foram observados em pacientes infectados pelo vírus da dengue. O septo alveolar se apresenta preenchido por células vermelhas do sangue infectado e com infiltrado inflamatório contendo linfócitos e monócitos. Diferentes graus de edema podem ser observados, com ou sem presença da membrana hialina. Pode ocorrer a dilatação dos espaços subpleurais, com ou sem presença de líquido. Através da imuno-histoquímica, é possível detectar a presença de macrófagos (CD68+) no septo alveolar e de células TCD4+ e TCD8+ nos capilares pulmonares. TNF-α, IFN-γ, IL-10 e TGF-β foram detectados em macrófagos e linfócitos, expressão de RANTES pelas células endoteliais e macrófagos alveolares no espaço perivascular.[2]

O antígeno pode ser localizado no interior dos pneumócitos tipo II e nos macrófagos alveolares. A patogênese da dengue na tranqueia é pouco estuda, porém em alguns adultos já foi confirmado placas eritematosas no epitélio respiratório. Foram relatados casos e hemorragia na luz traqueal devido a alterações vasculares. O vírus pode provocar um processo inflamatório local (traqueite) e com isso, estimular a migração de células inflamatórias mononucleares, que em uma grande quantidade pode provocar obstrução do lúmem traqueal, dificultando a respiração.[2]

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse trabalho, foi possível apresentar como o sistema imune age no organismo do hospedeiro diante de um ataque do vírus da dengue, e conclui que com o método de diagnóstico correto, tratamento e prevenção, o paciente infectado pelo vírus terá uma melhora significativa da doença.

Assim que o paciente é infectado pelo mosquito, o sistema imunológico começa a trabalhar, as células de defesa atuam no bloqueio e eliminação do antígeno se ligando e sinalizando que é ofensivo para o organismo. Semelhante a outras infecções virais, a cascata de inflamação marca a resposta inicial do hospedeiro, com uma resposta inflamatória.

Apesar de todo o sistema imune trabalhar em conjunto para combater o DENV, algumas vezes podem causar danos ao hospedeiro, por meio do evento chamado de tempestade de citocinas, levando ao agravamento da imunopatogenese da doença, como observado em pacientes com DHF.

REFERÊNCIAS

1 Mota A K M. Os efeitos da infecção pelo vírus da dengue na gestação, Rio de Janeiro (RJ), 2012. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/24283/1/838.pdf > Acesso em: 15 de agosto de 2022.

2 Moragas L J. Estudo da imunopatogênese em múltiplos órgãos de casos fatais de dengue em crianças: detecção do antígeno viral, perfil de citocinas e mediadores inflamatórios, Rio de Janeiro (RJ), 2020. Ministério da Saúde

3 Moura A J F. Avaliação da competência vetorial da população de *Aedes aegypti* da ilha de Santiago, Cabo Verde, a diferentes sorotipos do vírus Dengue, Recife (PE), 2014. Fundação Oswaldo Cruz Centro de pesquisas AGGEU Magalhães Mestrado Acadêmico em Saúde Publica. Disponivel em: > Acesso 18 de julho de 2022.

4 Nanaware N, BanerjeeA, Mullick Bagchi, S Bagchi, P Mukherjee. A. Dengue virus infection: A tale of viral exploitations and host responses. Viruses, Publicado on-line em 30 de setembro de 2021. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8541669/#B32-viruses-13-01967 [Pubmed] > Acesso em: 24 de Agosto de 2022.

5 Souza C G. Avaliação da sensibilidade de diferentes testes diagnósticos para a dengue, Vitória (ES), 2012. Disponível em: https://repositorio.ufes.br/bitstream/10/5960/1/Camila%20Giuberti%20de%20Souza.pdf > Acesso em: 18 de julho de 2022.

6 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adultos e criança / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. – 4. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/dengue_diagnostico_manejo_clinico_adulto.pdf > Acesso em: 16 de junho de 2022.

7 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. – 5. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021 Disponível em:

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed_rev.pdf> Acesso em: 16 de junho de 2022

8 Thomas SJ, Yoon IK. A review of Dengvaxia®: development to deployment. Hum Vaccin Immunother. Publicado on-line em 7 de outubro de 2019. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6816420/ > Acesso em: 15 de outro de 2022.

9 Khetarpal N, Khanna I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. J Immunol. Publicado on-line em 20 de julho de 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4971387/ > Acesso em: 15 de outubro de 2022.

10 Oliveira D A.; Soares I L, Serafim L. T. C, Rosa R. Febre hemorrágica pelo vírus da dengue, Londrina (PR), [s.d.] Disponível em: https://www.inesul.edu.br/revista/arquivos/arq-idvol_12_1295458979.pdf > Acesso em: 19 de Julho de 2022.

.