



Patrícia Leonor Coelho Santarém Vitória

# INFEÇÃO PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Patrícia Leonor Coelho Santarém Vitória

# INFEÇÃO PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA

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

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Monografia realizada sob orientação da Professora Doutora Paula Cristina Luxo Maia, no âmbito do Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

**A Orientadora,**

---

(Professora Doutora Paula Cristina Luxo Maia)

**A Orientanda,**

---

(Patrícia Leonor Coelho Santarém Vitória)

Eu, Patrícia Leonor Coelho Santarém Vitória, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010634, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 1 de Setembro de 2015

---

(Patrícia Leonor Coelho Santarém Vitória)

## **Agradecimentos**

Os meus sinceros agradecimentos à Professora Doutora Cristina Luxo, pela orientação, dedicação, disponibilidade e simpatia ao longo da execução da minha monografia.

Aos Professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelos ensinamentos ao longo destes anos.

Aos meus colegas e amigos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por todos os momentos passados e pela partilha de conhecimentos.

Um agradecimento especial à minha família pelo apoio e incentivo na conquista dos meus objetivos e por tornarem tudo isto possível.

Aos amigos que sempre me acompanharam.

Ao Luís, pelo apoio constante, pela motivação, pelos bons momentos e por ser um elemento sempre presente.

## Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>2</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Vírus da Febre Amarela</b> .....	<b>4</b>
1.1 Taxonomia Viral – nomenclatura .....	4
1.2 Estrutura Viral.....	4
1.3 Replicação do vírus.....	5
<b>2. Febre Amarela – infecção viral</b> .....	<b>7</b>
2.1 Enquadramento histórico .....	7
2.2 Epidemiologia atual .....	8
2.3 Ciclos de transmissão do vírus.....	8
2.4 Etapas clínicas da infecção pelo vírus .....	9
2.5 Patogénese da infecção pelo vírus .....	10
2.6 Diagnóstico.....	11
2.7. Tratamento.....	12
2.8. Prevenção da Febre Amarela .....	12
2.8.1 Prevenção da picada do mosquito.....	13
2.8.2 Vacinação.....	13
<b>3. Vacinas aprovadas para uso humano: vacina I7D-204 e vacina I7DD</b> .....	<b>14</b>
3.1 Origem e desenvolvimento .....	14
3.2 Eficácia da vacinação e resposta imune.....	14
3.3 Indicações, Contraindicações e Precauções .....	15
3.4 Certificados de Vacinação.....	15
3.5 Efeitos Adversos .....	16
<b>4. Vacinas em estudo</b> .....	<b>18</b>
4.1 Vacina inativada .....	18
4.2 Vacina de DNA.....	20
<b>Conclusão</b> .....	<b>22</b>
<b>Bibliografia</b> .....	<b>23</b>

## **Abreviaturas**

**AN** - Anticorpos Neutralizantes

**CIV** - Certificado Internacional de Vacinação

**CIVP** - Certificado Internacional de Vacinação ou Profilaxia

**CMH I** - Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe I

**CMH II** - Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II

**DNAV** - Doença Neurotrópica Associada à Vacina contra a Febre Amarela

**DVAV** - Doença Viscerotrópica Associada à Vacina contra a Febre Amarela

**FA** - Febre Amarela

**LAMP** - *Lysosome - Associated Membrane Protein* (Proteína de Associação à Membrana Lisossomal)

**RT-PCR** - *Reverse-Transcription – Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa)

**(+) ssRNA** – *positive-sense single-stranded RNA* (RNA de cadeia simples com polaridade positiva)

**TMG** - Título Médio Geométrico

**WHO** - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

**VFA** - Vírus da Febre Amarela

## **Resumo**

A febre amarela é uma doença viral hemorrágica, endêmica em regiões tropicais e subtropicais de África e América do Sul. O vírus da febre amarela infeta humanos e primatas não humanos, sendo transmitido através da picada de mosquitos infetados. A infecção viral caracteriza-se por três períodos diferentes: período de infecção, período de remissão e período de intoxicação. O diagnóstico pode ser feito através de ensaios serológicos, detecção do genoma viral, isolamento viral, imunohistoquímica e/ou histopatologia. A prevenção da doença através da vacinação é fundamental, uma vez que não existe tratamento específico. A vacina atualmente usada é uma vacina viva atenuada, denominada vacina 17D. É considerada uma vacina eficaz, no entanto pode desencadear reações adversas graves, embora raramente. Assim sendo, têm sido desenvolvidas e estudadas vacinas mais seguras e alternativas à vacina 17D, como a vacina inativada e a vacina de DNA.

**Palavras-chave:** vírus da febre amarela; febre amarela; vacina

## **Abstract**

Yellow fever is a viral hemorrhagic disease, endemic in tropical and subtropical regions of Africa and South America. The yellow fever virus affects humans and nonhuman primates and is transmitted through the bite of infected mosquitoes. The viral infection is characterized by three stages: period of infection, period of remission and period of intoxication. The diagnosis may be made by serology, detection of viral genome, virus isolation, immunocytochemistry and/or histopathology. The disease prevention through vaccination is capital, because there is no specific treatment. The vaccine currently used is a live attenuated vaccine, called 17D vaccine. It is considered an effective vaccine, however it may cause serious adverse reactions, although rarely. Therefore, efforts are underway to develop and study safer and alternatives vaccines to 17D vaccine, such as inactivated vaccine and DNA vaccine.

**Keywords:** yellow fever virus; yellow fever; vaccine



## **Introdução**

A febre amarela é causada pelo membro protótipo do género *Flavivirus* e da família *Flaviviridae*. É uma doença que afeta humanos e primatas não humanos, sendo transmitida através da picada de mosquitos infetados. As manifestações clínicas incluem disfunção hepática, insuficiência renal, coagulopatia e choque, sendo uma doença com elevada taxa de mortalidade. A infeção viral denomina-se febre amarela devido ao facto de poder ocorrer icterícia, resultante da lesão hepática que o vírus provoca.

A febre amarela é endémica em áreas tropicais e subtropicais de África e América do Sul e, por isso, indivíduos residentes nessas áreas e indivíduos que pretendam viajar para essas áreas devem ser vacinados. A vacina atualmente usada é uma vacina viva atenuada, no entanto têm sido desenvolvidas e estudadas vacinas alternativas, uma vez que a vacina atual pode despoletar reações adversas graves.

Neste trabalho realizou-se uma revisão bibliográfica da informação disponível acerca do vírus da febre amarela, da infeção que o vírus provoca, da vacina atualmente utilizada na prevenção da doença e das vacinas em estudo que têm mostrado ser promissoras e possíveis alternativas à vacina atual.

## I. Vírus da Febre Amarela

### I.1 Taxonomia Viral – nomenclatura

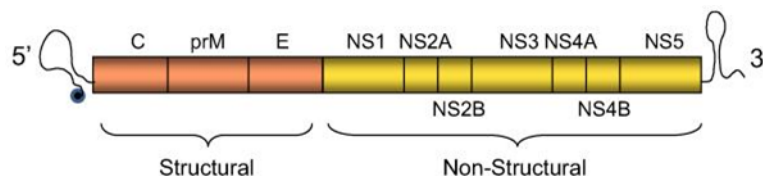
De acordo com a nomenclatura proposta pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses*, o vírus da febre amarela (VFA) pertence à família *Flaviviridae*, género *Flavivirus* e espécie vírus da febre amarela<sup>1</sup>.

### I.2 Estrutura Viral

O VFA é um vírus com genoma de RNA de cadeia simples com polaridade positiva [(+)ssRNA – positive-sense single-stranded RNA], que contém cerca de 10 760 - 11 008 nucleótidos<sup>2</sup>.

O genoma viral possui uma única região codificante (10 236 - 10 239 nucleótidos), que codifica dez proteínas virais (três estruturais e sete não estruturais) e é flanqueada por duas regiões não codificantes<sup>2,3</sup>. (Figura 1) A região 5' não codificante é muito semelhante em tamanho com a região correspondente noutros flavivirus (aproximadamente 100 nucleótidos), enquanto a região 3' não codificante é muito variável em tamanho, inclusivamente entre estirpes de diferentes genótipos do VFA (406 - 654 nucleótidos)<sup>2</sup>.

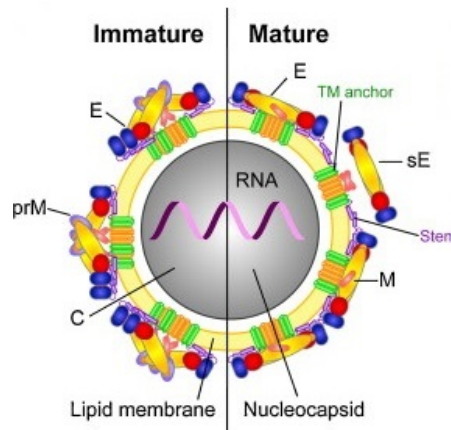
O genoma viral é traduzido numa única poliproteína que é clivada por proteases celulares e proteases virais em três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais. As proteínas estruturais incluem a proteína C (proteína da cápside) que se liga ao RNA viral, a proteína prM (proteína precursora da membrana) e a proteína E (proteína do envelope), que medeia a ligação do vírus à célula hospedeira, a fusão da membrana e a montagem viral. As proteínas não estruturais NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5 regulam a transcrição e a replicação viral e interferem com as respostas do hospedeiro ao vírus<sup>4</sup>.



**Figura 1** – Genoma do vírus da febre amarela (GARDNER, Christina L. et al<sup>5</sup>).

São conhecidas duas formas do virião: o virião imaturo intracelular e o virião maduro extracelular. O virião imaturo intracelular contém a proteína prM, que é clivada

proteoliticamente durante a maturação para produzir a proteína M. O virião maduro tem um diâmetro de 50 nm e as três proteínas estruturais (proteína C, proteína M e proteína E).<sup>2</sup> A superfície dos viriões imaturos é composta por 60 projeções pontiagudas constituídas por trímeros de heterodímeros compostos pela proteína prM e proteína E. Já a superfície dos viriões maduros é lisa (não contem projeções pontiagudas), sendo formada após a clivagem da proteína prM, e contem 90 homodímeros da proteína E, organizados em 3 dímeros paralelos<sup>5</sup>. (Figura 2)



**Figura 2** – Estrutura do vírus da febre amarela (GARDNER, Christina L. et al<sup>5</sup>).

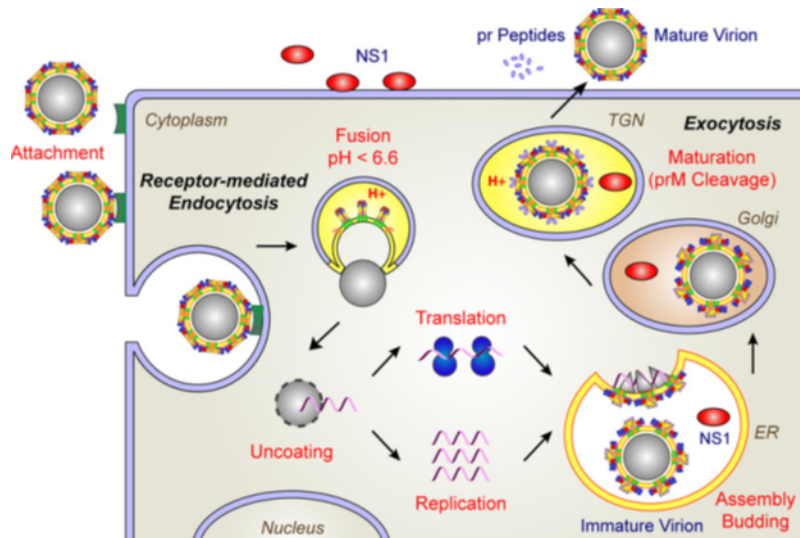
### 1.3 Replicação do vírus

A ligação do vírus à superfície da célula hospedeira é mediada pela proteína E e o vírus entra na célula por endocitose mediada por recetor. O pH baixo no compartimento endossomal desencadeia a fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira por reorganização estrutural da proteína E, que conduz à libertação da nucleocápside e do RNA viral no citoplasma<sup>4</sup>. (Figura 3)

A região codificante do genoma viral é traduzida numa única poliproteína, que subsequentemente é clivada por enzimas da célula hospedeira e por um complexo enzimático de origem viral, constituído pelas proteínas não estruturais NS2B e NS3<sup>2</sup>.

A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático rugoso, levando à formação de partículas virais imaturas não infecciosas que são transportadas através da via exocítica da célula. O pH ácido na rede trans do complexo de Golgi provoca um rearranjo das proteínas E e a clivagem proteolítica da proteína prM em péptido pré-transmembranar e proteína M por ação da furina, uma protease celular. O péptido pré-transmembranar permanece ligado à partícula viral até à saída do vírus para o espaço extracelular, onde o pH é neutro. O

processamento da proteína prM e a libertação do péptido pré-transmembranar são necessários para que o vírus seja infeccioso. A proteína não estrutural NS1 é a única proteína não estrutural que é libertada das células infetadas<sup>6,7</sup>.



**Figura 3** - Ciclo de replicação do vírus da Febre Amarela (HEINZ, Franz; STIASNY, Karin<sup>7</sup>).

## **2. Febre Amarela – infecção viral**

### **2.1 Enquadramento histórico**

A FA surgiu em África e foi importada para a Europa e América como consequência do tráfico de escravos para esses continentes<sup>8</sup>.

A primeira evidência definitiva de FA acredita-se ter sido em 1648 em Yucatan e Guadalupe. Nos anos seguintes, foram relatados surtos de FA na costa leste dos EUA<sup>8</sup>.

Em 1700 a FA espalhou-se para a Europa e em 1730 foi descrita uma das primeiras epidemias em Espanha, seguida de surtos em portos franceses e britânicos. No século seguinte, foram registadas epidemias em áreas tropicais e subtropicais da América<sup>8</sup>.

Até meados de 1800, os cientistas acreditavam que a FA era transmitida por contacto direto com indivíduos infetados ou objetos contaminados. No final dos anos de 1800 foi descoberto pelo cientista cubano Carlos Finlay que os responsáveis pela disseminação da FA eram mosquitos<sup>8</sup>.

Em 1898 foi formada a Comissão da Febre Amarela liderada por Walter Reed, que provou em 1900 a teoria de Carlos Finlay<sup>8</sup>.

Em 1915 a Comissão da Febre Amarela estabeleceu como objetivo principal eliminar o mosquito que transmitia a doença em áreas onde a FA era predominante. Em alguns locais, isso foi possível, já noutros a FA manteve-se e durante muitos anos não foi possível explicar tal situação<sup>9</sup>.

Mais tarde ficou claro que o reservatório natural do vírus eram os macacos. O vírus foi transmitido ocasionalmente de macacos infetados a seres humanos por uma variedade de vetores diferentes<sup>9</sup>.

Foram desenvolvidas duas vacinas vivas atenuadas na década de 1930: a vacina 17D e a vacina neurotrópica francesa. A primeira foi desenvolvida por Max Theiler, tendo este recebido o prémio Nobel em Fisiologia ou Medicina. Foram realizadas campanhas utilizando a vacina 17D na América do Sul e a vacina neurotrópica francesa em África. No entanto, devido às elevadas taxas de encefalite pós-vacinal, a vacina neurotrópica francesa foi abandonada em 1982 e a vacina 17D tornou-se o padrão para uso na imunização para a FA em todo o mundo<sup>9</sup>.

Na primeira década de 2000 foram relatados à WHO casos de febre amarela de países endémicos da América do Sul e África<sup>8</sup>.

## 2.2 Epidemiologia atual

A FA é endêmica nas áreas tropicais e subtropicais de África e América do Sul<sup>10</sup>. A maioria dos casos e mortes ocorre na África subsaariana, onde ocorrem epidemias de FA<sup>11</sup>.

Atualmente, trinta e dois países africanos são considerados países em risco de FA. Segundo a WHO, “o risco de surtos grandes e incontroláveis em áreas urbanas de África é mais provável do que nunca”, devido ao aumento acelerado da urbanização que se tem verificado nos últimos tempos<sup>11</sup>.

No que diz respeito à América do Sul, países como a Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela são considerados os países de maior risco de FA. Esta doença provoca geralmente casos esporádicos e pequenos surtos nos países sul-americanos, no entanto quase todos os grandes centros urbanos nas regiões tropicais da América do Sul têm sido reinfestados com o mosquito vetor e a maioria da população que aí reside é susceptível à doença devido à baixa cobertura de vacinação<sup>11</sup>.

De acordo com a WHO, estima-se que a cada ano existam 200 000 casos de FA, causando 30 000 mortes em todo o mundo, sendo que 90% deles ocorre em África<sup>12</sup>.

Apesar da circulação do VFA se ter mantido dentro das fronteiras de países historicamente endêmicos, pode espalhar-se rapidamente e causar epidemias em áreas com elevada densidade de vetores e uma população não imune. Isto porque atualmente a maioria das cidades estão ligadas através de meios de transporte rápidos e o vírus pode ser importado e propagar-se a nível internacional<sup>13</sup>.

## 2.3 Ciclos de transmissão do vírus

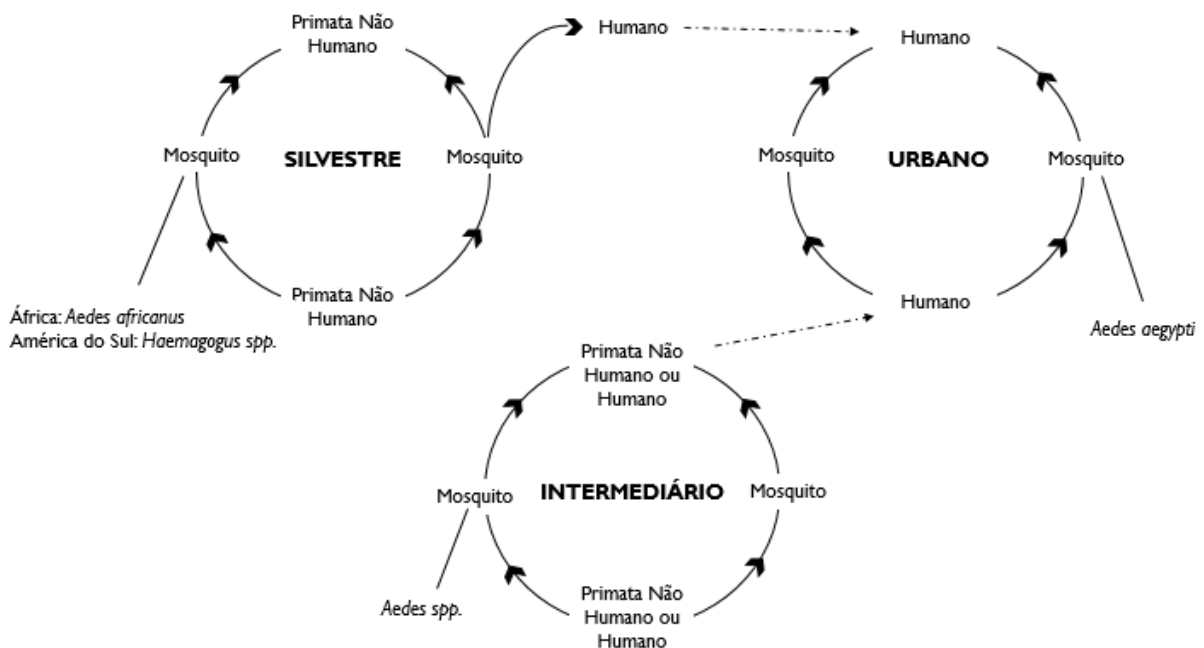
Diferentes espécies de mosquitos dos géneros *Aedes* e *Haemogogus* podem transmitir o VFA<sup>12</sup>. Os mosquitos adquirem o vírus através da alimentação em primatas infectados (não-humanos ou humanos) e, em seguida, podem transmitir o vírus a outros primatas (não humanos ou humanos)<sup>14</sup>.

Existem três tipos de ciclos de transmissão da FA: silvestre, intermediário e urbano (figura 4)<sup>14</sup>. Todos eles existem em África, no entanto na América do Sul apenas existe FA silvestre e urbana<sup>12</sup>.

O ciclo de transmissão silvestre ocorre em florestas tropicais, onde macacos infetados por mosquitos transmitem o vírus para outros mosquitos e esses mosquitos, por sua vez, picam e infetam os seres humanos que vão à floresta, maioritariamente homens que trabalham em zonas florestais, sendo por isso casos esporádicos<sup>12,14</sup>.

O ciclo intermediário de transmissão da FA ocorre em zonas selvagens húmidas ou semi-húmidas de África e pode produzir epidemias de pequena escala em aldeias rurais. Os mosquitos infetam tanto macacos como hospedeiros humanos. Esta área é muitas vezes chamada "zona de emergência", em que o aumento do contacto entre o Homem e os mosquitos infetados leva à doença<sup>12,14</sup>.

A FA urbana é iniciada quando o vírus é introduzido em áreas de elevada densidade populacional, resultando em epidemias de larga escala. Neste ciclo, os hospedeiros primários são os humanos e os vetores são os mosquitos *Aedes aegypti*<sup>12,14</sup>.



**Figura 4** - Ciclos de transmissão do vírus da Febre Amarela (Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention*<sup>14</sup>).

## 2.4 Etapas clínicas da infeção pelo vírus

A infeção pelo VFA apresenta um amplo espectro de severidade, com uma apresentação clínica que varia de infeção assintomática a doença fatal. Trata-se de uma doença aguda, de duração breve e com três períodos diferentes: período de infeção, período de remissão e período de intoxicação. Na maioria dos casos é uma doença febril auto-limitada, mas em alguns casos pode progredir para icterícia, síndrome hemorrágico, doença renal e culminar em morte<sup>2,5</sup>.

O VFA é introduzido por via subcutânea no hospedeiro primata, por injeção da saliva do mosquito infetado. O período de incubação após a picada do mosquito é geralmente de 3 a 6 dias e é seguido pelo aparecimento abrupto de sintomas, como febre e dores de cabeça. Em alguns casos, os doentes podem sentir febre, calafrios, mal-estar, dor de cabeça, mialgias, vômitos e, por vezes, sinal de Faget (aumento da temperatura com diminuição do pulso). Neste período a virémia é elevada<sup>5</sup>.

O segundo período da doença (período de remissão) começa 3-4 dias após o início dos primeiros sintomas e caracteriza-se por uma rápida redução da febre e dos outros sintomas durante 24 horas. Nesta fase, muitas infeções resolvem-se sem mais sintomas e o vírus deixa de estar presente na circulação sanguínea. No entanto, noutros casos (cerca de 20 %) pode haver evolução para o período de intoxicação. Este período caracteriza-se por febre alta, vômitos, dor epigástrica, prostração. Surgem manifestações hemorrágicas severas, nomeadamente equimoses, epistaxe e vômito escuro (devido a hematemeses e hemorragias intestinais). Como consequência da lesão a nível hepático, ocorre o aparecimento de icterícia. A lesão nos rins leva frequentemente a insuficiência renal aguda. 7 a 10 dias após o início da doença ocorrem tipicamente manifestações tardias do Sistema Nervoso Central, tais como confusão, convulsão e coma e o doente morre. Neste período, podem ser detetados anticorpos, no entanto a virémia está normalmente ausente<sup>2,5</sup>.

## 2.5 Patogénese da infeção pelo vírus

Após a inoculação do vírus na pele a partir da picada de um mosquito infetado, o VFA replica nos tecidos locais e é detetado pelas células dendríticas nesses tecidos. Estas células levam o vírus até aos nódulos linfáticos drenantes, onde o vírus replica e é apresentado aos linfócitos T CD4+. Depois da replicação, o vírus é libertado nos ductos linfáticos, resultando em virémia. O vírus dissemina-se e replica-se nos tecidos periféricos, como o fígado, rins, baço, coração e outros tecidos. Nestes tecidos o vírus causa lesões, como consequência do efeito citopático que provoca ou devido a alterações resultantes da resposta imune do hospedeiro, desencadeada pelos linfócitos T CD4+<sup>15,16</sup>.

O fígado é o órgão mais afetado pela infeção causada pelo VFA. As lesões hepáticas ocorrem principalmente na região médio-zonal do lóbulo do fígado. Pensa-se que o VFA tem elevado tropismo para esta zona, o que explica que as lesões se processem maioritariamente nessa área<sup>16</sup>. O fígado apresenta-se normal ou ligeiramente aumentado em tamanho e ictérico<sup>5</sup>. A presença de corpúsculos de Councilman, resultantes da apoptose dos hepatócitos, é típica da FA e a sua morfologia varia muito, desde células pleomórficas a células bizarras



distribuídas em todo o tecido hepático, mas mais intensas na região médio-zonal do lóbulo hepático. Em paralelo com a apoptose ocorre necrose lítica dos hepatócitos, sendo estas lesões irreversíveis. Já a micro e macroesteatose que comumente ocorrem em doentes com FA são lesões reversíveis<sup>16</sup>.

Os rins podem apresentar necrose tubular aguda, esteatose e edema<sup>5,17</sup>. No coração pode ocorrer inflamação do miocárdio (miocardite)<sup>16</sup>.

As hemorragias que ocorrem em casos severos são sobretudo resultado da síntese diminuída dos fatores de coagulação pelo fígado e da coagulação intravascular disseminada<sup>5,17</sup>.

Os eventos terminais da doença ocorrem precipitadamente e são caracterizados clinicamente por choque cardiovascular e falência de múltiplos órgãos<sup>16</sup>.

## 2.6 Diagnóstico

Um diagnóstico presuntivo da FA é baseado nas características clínicas do doente, história de viagens, estado de vacinação, atividades e história epidemiológica do local onde a suposta infecção ocorreu<sup>18</sup>. O diagnóstico clínico de um caso isolado de FA é particularmente difícil, pois os sintomas são semelhantes aos sintomas de outras doenças, como por exemplo, dengue, ébola, malária, hepatite viral, febre tifóide, entre outras. Assim sendo, a confirmação laboratorial é essencial para o diagnóstico diferencial da FA<sup>5,12</sup>.

O diagnóstico laboratorial da FA é geralmente realizado recorrendo a testes serológicos para deteção da imunoglobulina M (IgM) específica para o VFA e da imunoglobulina G (IgG). No entanto, torna-se aqui importante ter conhecimento da história da vacinação do doente para interpretação do resultado destes testes, uma vez que os níveis de IgM podem persistir durante anos após a vacinação contra a FA. Para além disso, a confirmação do diagnóstico é dificultada pela possibilidade de reatividade cruzada com outros flavivirus. Como tal, resultados positivos devem ser confirmados com outros testes<sup>18,19</sup>.

O RNA do VFA pode ser detetado no sangue ou tecidos recorrendo a testes de amplificação de ácidos nucleicos, como o *Reverse-Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). No entanto, um resultado negativo em amostras de sangue não significa que o doente não esteja infetado com o VFA, uma vez que quando se manifestam os sintomas o RNA viral é normalmente indetetável<sup>18</sup>.

A deteção do antigénio do VFA por coloração imunohistoquímica de tecidos pode fornecer um diagnóstico definitivo. Contudo, uma biópsia ao fígado durante a infeção aumenta o risco de complicações hemorrágicas<sup>20</sup>.

Mudanças histopatológicas no fígado, como necrose, esteatose e corpúsculos de Councilman, podem ser observadas e ajudar no diagnóstico da FA<sup>20</sup>.

Ainda como meio de diagnóstico pode ser feito o isolamento do VFA<sup>18</sup>.

De acordo com a WHO, um caso é classificado como suspeito quando se caracteriza por início agudo de febre, seguido de icterícia dentro de duas semanas após o início dos primeiros sintomas, enquanto um caso confirmado é um caso suspeito que é confirmado laboratorialmente ou epidemiologicamente ligado a um surto<sup>21</sup>.

É exigido pelo Regulamento Sanitário Internacional que todos os casos de FA sejam relatados à WHO no prazo de 24 horas após a sua detecção<sup>21</sup>.

## **2.7. Tratamento**

Não existe tratamento específico para a infeção causada pelo VFA. O tratamento é apenas sintomático, destinado a reduzir os sintomas do doente. Os analgésicos e antipiréticos podem ser usados para aliviar a dor e a febre, no entanto deve evitar-se usar ácido acetilsalicílico e outros anti-inflamatórios não esteróides, pois aumentam o risco de hemorragia<sup>22</sup>.

Ainda assim, ao longo dos anos têm sido descritos vários compostos com atividade antiviral, incluindo a ribavirina e o interferão-alfa. A ribavirina tem tido sucesso no tratamento em hamsters, quando administrada em doses elevadas até dois dias após a infeção pelo vírus (antes do aparecimento do vírus no fígado), contudo não mostrou ser um tratamento promissor em primatas não humanos. O interferão-alfa e outros imunomoduladores administrados antes do início da infeção (ou pouco tempo após a picada do mosquito infetado) em macacos têm-se mostrado eficazes ao reduzir o início da virémia e a doença, mas não se têm mostrado eficazes quando administrados após a infeção já estar estabelecida<sup>5,15</sup>.

Uma terapia efetiva para a FA deve ser eficaz após o aparecimento da doença clínica, deve ser relativamente barata, ter boa estabilidade e baixa toxicidade e deve poder ser administrada oralmente ou através de injeção<sup>23</sup>.

## **2.8. Prevenção da Febre Amarela**

Como não existe tratamento específico para a FA, a prevenção é fundamental. Esta é realizada evitando a picada do mosquito e através da vacinação<sup>24</sup>.

### 2.8.1 Prevenção da picada do mosquito

O risco de transmissão da FA pode ser reduzido através do uso de inseticidas. Os inseticidas passíveis de uso são os registados na *Environmental Protection Agency* e, para o efeito, são por exemplo DEET, icaridina, IR3535 e o óleo de eucalipto. Para além disso, a pulverização da roupa com um repelente confere proteção extra, uma vez que os mosquitos podem picar através de roupa fina. O uso de mangas compridas, calças compridas e meias e ter o conhecimento dos momentos do dia em que o mosquito mais ataca (para muitas espécies de mosquitos é ao amanhecer e anoitecer, mas para *Aedes aegypti* é durante todo o dia) são também uma mais-valia para evitar a picada do mosquito<sup>25</sup>.

### 2.8.2 Vacinação

A vacinação é a medida mais importante para prevenir a FA<sup>12,26</sup>. Isto porque protege as populações que habitam nas áreas endémicas da FA, protege os indivíduos que viajam para essas mesmas áreas e impede a propagação internacional do vírus<sup>27</sup>.

Em zonas de alto risco de transmissão da FA e onde a cobertura vacinal é baixa, controlar surtos através da vacinação torna-se importante para evitar epidemias. A cobertura da vacinação deve atingir pelo menos os 60 a 80 % de uma população em risco para que se consiga evitar surtos. No entanto, segundo a WHO, alguns países endémicos africanos que recentemente tiveram campanhas de vacinação não têm este nível de cobertura<sup>12</sup>.

Em zonas de risco de transmissão da FA, a vacinação pode ser disponibilizada sob a forma de campanhas de vacinação em massa e campanhas de vacinação de rotina em crianças<sup>12</sup>.

As vacinas contra a FA disponíveis atualmente são vacinas vivas atenuadas, sendo produzidas com base na estirpe I7D, das quais se falará a seguir mais detalhadamente<sup>27</sup>.

### 3. Vacinas aprovadas para uso humano: vacina 17D-204 e vacina 17DD

#### 3.1 Origem e desenvolvimento

Em 1927, o vírus da FA foi isolado pela primeira vez de uma amostra de sangue de Asibi, um indivíduo africano infetado com o VFA<sup>5,9</sup>. O sangue de Asibi foi injetado em *Macacus Rhesus* e estes ficaram infetados, conseguindo-se pela primeira vez infetar animais em laboratório<sup>28</sup>.

Em 1930, Theiler e seus colaboradores da Fundação Rockefeller descobriram que o VFA crescia bem em tecido cerebral de ratos e que, após várias passagens nesses tecidos, havia aumento de neurotropismo, mas diminuição da lesão hepática e de doença sistémica (viscerotropismo), quando feita inoculação em macacos. A primeira estirpe atenuada tinha sido então criada, no entanto com aumento de neurotropismo<sup>5,31</sup>. Para tentar contornar o problema, Theiler e seus colaboradores usaram doses mínimas do vírus, no entanto a tentativa falhou. Perceberam que doses baixas de vírus faziam aumentar a frequência de encefalites em macacos<sup>9</sup>.

Foram realizadas várias centenas de passagens do vírus em diferentes tipos de culturas de tecidos e repetidamente testadas para a sua atividade neurotrópica<sup>9</sup>.

Quando a estirpe Asibi foi sujeita a passagens repetidas em embriões de galinha desprovidos de Sistema Nervoso Central, observou-se que entre passagens ocorreu uma mutação na estirpe. Esta mutação ao acaso que tinha surgido mostrou não ter efeitos viscerotrópicos e neurotrópicos, sendo segura e capaz de conferir imunidade. A esta estirpe foi dado o nome 17D<sup>9,28</sup>.

As subestirpes 17D-204 e 17DD são derivadas de 204 passagens e 195 passagens da estirpe 17D, respetivamente, e são as estirpes usadas atualmente para a produção de vacinas contra a FA<sup>28,29</sup>.

A vacina 17DD é produzida e usada no Brasil, enquanto a vacina 17D-204 é usada no resto do Mundo<sup>30</sup>.

#### 3.2 Eficácia da vacinação e resposta imune

A vacina é administrada por via subcutânea num volume de 0,5 ml<sup>26</sup>. Produz níveis elevados de proteção, com uma taxa de seroconversão superior a 95 % em adultos e crianças<sup>31</sup>.

A vacina estimula a resposta imune inata e adaptativa. A resposta imune inata é forte, rápida e precede a resposta imune adaptativa. Esta última é também rápida, extremamente forte e duradoura, com formação de anticorpos neutralizantes (AN), considerados os principais agentes correlacionados com a proteção da doença<sup>32,33</sup>. Devido ao papel da proteína E na

entrada do vírus na célula – ligação aos recetores celulares e fusão da membrana – a proteína E é o alvo dos AN, que vão inibir estas funções e assim prevenir a infeção<sup>7</sup>. Aproximadamente 90 % dos indivíduos que foram vacinados desenvolvem AN nos 10 dias seguintes à vacinação e 99 % desenvolve dentro de 30 dias<sup>5,31</sup>.

### 3.3 Indicações, Contraindicações e Precauções

A vacina é recomendada para residentes nas áreas endémicas da FA e indivíduos que pretendam viajar para áreas endémicas<sup>34</sup>. Estes últimos devem ser vacinados pelo menos 10 dias antes da viagem.<sup>31</sup> A vacinação é também indicada a profissionais de saúde que trabalham em laboratórios onde há manipulação de material infeccioso<sup>26</sup>.

A vacina não deve ser administrada nas seguintes condições: idade menor que 6 meses, alergia a um componente da vacina, infeção por HIV sintomática ou contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 200 células/mm<sup>3</sup>, doenças do timo com função imunológica anormal, imunodeficiências primárias, neoplasias malignas, transplantação de órgãos e terapias imunossupressoras e imunomoduladoras<sup>34</sup>.

As condições em que a vacina pode ser administrada mas com precaução incluem: idades dos 6 aos 8 meses, idade superior a 60 anos, infeção por HIV assintomática e contagem de linfócitos T CD4+ entre 200 e 499 células/mm<sup>3</sup>, gravidez e amamentação<sup>34</sup>.

### 3.4 Certificados de Vacinação

Alguns países exigem que todos os viajantes mostrem o Certificado Internacional de Vacinação (CIV), muitas vezes chamado “Cartão Amarelo”, como prova da vacinação contra a FA antes da entrada nesses países. Outros países exigem o certificado apenas a indivíduos que tenham viajado recentemente para áreas endémicas<sup>35</sup>.

De acordo com o Portal da Saúde, “ O Regulamento Sanitário Internacional em vigor estipula que a única vacina que poderá ser exigida aos viajantes na travessia das fronteiras é a vacina contra a FA.” Assim sendo, os Centros de Vacinação Internacional devem administrar a vacina contra a FA aos utentes que a eles se dirijam e que apresentem prescrição médica<sup>36</sup>. O CIV é válido a partir de 10 dias após a data da vacinação. Os viajantes que cheguem a esses países sem a prova da vacinação podem ser impedidos de entrar no país, podem ser postos em quarentena até 6 dias ou serem vacinados no local<sup>26</sup>.

Um indivíduo com contraindicação para a vacina da FA deve, antes de embarcar, solicitar uma declaração médica que contenha a razão da não vacinação<sup>26</sup>.

Desde 2007, o CIV foi substituído pelo Certificado Internacional de Vacinação ou Profilaxia (CIVP). Os indivíduos que receberam a vacina contra a FA após 15 de dezembro de 2007, devem apresentar o CIVP, no entanto para os indivíduos que receberam a vacina antes de 15 de dezembro de 2007, o CIV original ainda é válido, desde que a vacina tenha sido administrada há menos de dez anos<sup>37</sup>.

De acordo com a WHO, em junho de 2016, o período de proteção conferido pela vacina e o prazo de validade do CIVP passarão de 10 anos para a duração da vida do indivíduo vacinado<sup>38</sup>.

### 3.5 Efeitos Adversos

As reações à vacina contra a FA são geralmente suaves e ocorrem em 5 a 30 % dos indivíduos vacinados. Os efeitos adversos suaves incluem dores de cabeça, mialgias e febre baixa, que começam alguns dias após a vacinação e duram cerca de 5 a 10 dias. Podem também incluir inflamação no local da injeção 1 a 5 dias após a vacinação<sup>34,39</sup>. No entanto, há relatos de efeitos adversos graves após a vacinação contra a FA, que incluem reações de hipersensibilidade graves, doença neurotrópica associada à vacina contra a febre amarela (DNAV) e doença viscerotrópica associada à vacina contra a febre amarela (DVAV)<sup>34</sup>.

Idade avançada, doenças do timo e imunossupressão são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de efeitos adversos graves, no entanto há relatos de efeitos adversos graves em casos com fatores de risco desconhecidos. Os mecanismos subjacentes a estes acontecimentos não são ainda conhecidos. Embora já se tenham levantado várias hipóteses, pensa-se que fatores do hospedeiro, como a resposta imune, possam estar na origem destes eventos<sup>40</sup>.

As reações de hipersensibilidade graves podem incluir reações anafiláticas e até mesmo choque anafilático<sup>34</sup>. Estas podem ocorrer como resposta a proteínas do ovo, proteínas de galinha, gelatina ou outro componente utilizado na produção das vacinas<sup>39</sup>.

A DNAV (antigamente conhecida como “encefalite pós vacinal”) foi no passado o evento adverso grave mais comum associado à vacina contra a FA, sobretudo em crianças<sup>31</sup>. É um evento adverso grave, mas raramente fatal. Foi relatado na maioria dos casos após vacinação primária, ocorrendo entre o 3º e 28º dia após a vacinação<sup>39</sup>.

Existem três síndromes neurológicas associados à vacina contra a FA: a meningoencefalite, a encefalomielite disseminada aguda e a síndrome de Guillain-Barre<sup>24,41</sup>.

A meningoencefalite é uma doença neurotrópica, secundária à infeção do vírus da vacina no Sistema Nervoso Central, que se pode manifestar com febre, dores de cabeça, sintomas neurológicos focais, alterações do estado mental e convulsões<sup>41</sup>.

A encefalomielite disseminada aguda e a síndrome de Guillain-Barré são doenças neurológicas autoimunes em que os anticorpos induzidos pela imunização e/ou as células T reativas reagem com proteínas dentro do Sistema Nervoso Central ou Periférico. Podem manifestar-se por fraqueza muscular, anormalidades do nervo craniano, ausência de reflexos tendinosos, estado mental alterado e ataxia<sup>41</sup>.

A DVAV caracteriza-se por proliferação do vírus da vacina em múltiplos órgãos, causando disfunção ou insuficiência de múltiplos órgãos e morte em pelo menos 60% dos casos. Os sintomas iniciais são inespecíficos e incluem febre, mal-estar, cefaleias, mialgias, vômitos e diarreia. Em certos casos pode haver progressão para dor abdominal grave, icterícia, insuficiência hepática e renal, hemorragias, dispneia e hipotensão<sup>39,41</sup>. Os casos relatados são em indivíduos vacinados pela primeira vez contra a FA e ocorreram nos primeiros 8 dias seguintes à vacinação<sup>39</sup>.

O *Centers for Disease Control and Prevention* indica que a incidência de reações de hipersensibilidade graves é de cerca de 1 caso em 55 000, de DNAV é de cerca de 1 caso em 125 000 e de DVAV é de cerca de 1 caso em 250 000, sendo que mais de metade dos indivíduos que têm este último efeito morrem<sup>42</sup>.

Para cada indivíduo, é necessário que os profissionais de saúde equilibrem os riscos de eventos adversos associados à vacina e os benefícios da vacinação antes da decisão da administração da vacina<sup>24</sup>.

## 4. Vacinas em estudo

### 4.1 Vacina inativada

A ocorrência de efeitos adversos graves causados pela vacina 17D estimulou o desenvolvimento de uma alternativa mais segura, uma vacina inativada<sup>43</sup>.

XRX-001 é uma vacina inativada inteira contra a FA, fabricada por Xcellerex a partir da estirpe 17D do VFA, sendo produzida em culturas de células Vero. O vírus inteiro é purificado a partir de fluido da cultura, inativado com  $\beta$ -propiolactona, adsorvido a 0,2% de hidróxido de alumínio e formulado com estabilizantes<sup>48</sup>. A inativação do vírus é feita com B-propiolactona, que alquila resíduos de purina de ácidos nucleicos de modo a destruir a infectividade do vírus. Esta possui vantagens em relação à formalina<sup>43</sup>.

A patogénese da DVAV e da maioria dos casos de DNAV envolve a replicação do vírus da vacina 17D em órgãos viscerais como o fígado, rins e coração (em DVAV) ou invasão do Sistema Nervoso Central via corrente sanguínea (em DNAV). A principal vantagem da vacina inativada é a sua incapacidade de replicar em tecidos do hospedeiro, o que se traduz numa maior segurança<sup>43</sup>.

Esta vacina não contém proteínas, como a ovalbumina e outras proteínas derivadas do ovo, nem gelatina, usadas na produção da vacina 17D<sup>43</sup>.

Relativamente à segurança não clínica da vacina, constatou-se em estudos em ratos que apenas ocorreu inflamação ligeira no local da injeção, elevação transitória de interleucina 6 e hiperplasia linfóide, fenómenos relacionados com a estimulação do sistema imunitário<sup>43</sup>.

A vacina provou ser muito imunogénica em modelos animais, como hamsters e macacos, proporcionando proteção contra o VFA<sup>43</sup>.

Num estudo em hamsters, três grupos de dez hamsters foram vacinados com três doses diferentes da vacina XRX-001 (dose elevada, dose média e dose baixa), através de injeções intramusculares, nos dias 0 e 21. Outro grupo recebeu uma única injeção de dose elevada da vacina XRX-001 no dia 21. Dois outros grupos receberam a vacina 17D, sendo que um desses grupos recebeu a vacina 17D diluída dez vezes (1:10). A um outro grupo foi injetado placebo (0,2 % de hidróxido de alumínio em 0,9 % de cloreto de sódio)<sup>43</sup>. No dia 49 foi administrado a todos os grupos uma estirpe do VFA, mas antes dessa administração foram medidos os níveis de AN<sup>43</sup>.

Aquando dessa medição, verificou-se que todos os hamsters a quem foi dada uma única injeção de dose elevada da vacina (dia 21) e duas injeções de dose elevada da vacina (dias 0 e 21) desenvolveram níveis elevados de AN. Uma única inoculação da vacina XRX-001 desenvolveu níveis de AN semelhantes aos níveis observados depois da inoculação da vacina



I7D. Duas inoculações resultaram em níveis muito elevados de AN, níveis estes maiores do que os níveis de AN observados após inoculação da vacina I7D<sup>43</sup>.

Constatou-se que há uma relação entre a resposta de AN à vacina XRX-001 e a dose administrada, na medida em que a seroconversão e o Título Médio Geométrico (TMG) de anticorpos diminuem com a diminuição da dose. A dose média foi moderadamente efetiva, ocorrendo 80 % de seroconversão e o TMG é reduzido comparado com a dose elevada. A dose baixa foi fracamente imunogénica<sup>43</sup>.

Depois da administração de uma estirpe do VFA (depois de dia 49) nos grupos do estudo, verificou-se que 78% dos hamsters inoculados com placebo morreram. Por outro lado, todos os animais a quem se deu uma ou duas inoculações de XRX-001 ou da vacina I7D (não diluída ou diluída) sobreviveram<sup>43</sup>.

Em primatas não humanos (*Cynomolgus macaques*) também foi testada a vacina XRX-001. Dois grupos de macacos receberam injeção intramuscular de XRX-001 de uma determinada dose, sendo que um grupo recebeu inoculação nos dias 0 e 21 e o outro recebeu nos dias 0,10 e 21. A um grupo de controlo de macacos foi inoculada a vacina I7D no dia 0<sup>43</sup>.

Verificou-se que os títulos de AN estavam elevados 21 dias após inoculação da vacina XRX-001 e da vacina I7D<sup>43</sup>.

Duas doses de vacina XRX-001 nos dias 0 e 10 desenvolveram uma resposta imune similar a uma dose da vacina I7D<sup>43</sup>.

A maioria dos macacos não apresentaram aumento significativo de AN após uma segunda ou terceira dose da vacina XRX-001. Isto levou a pensar que uma dose única de XRX-001 poderia fornecer níveis suficientes de imunidade, no entanto esta teoria tinha de ser confirmada em estudos em humanos<sup>43</sup>.

Foi realizado um estudo clínico de fase I, com 60 indivíduos saudáveis, para investigar a imunogenicidade e a segurança da vacina XRX-001. Tratou-se de um estudo duplo-cego, com escalada de doses e controlado por placebo<sup>44</sup>.

Os 60 indivíduos foram divididos em dois grupos, cada um com 30 indivíduos. Em cada grupo, os indivíduos foram distribuídos aleatoriamente para receber injeções intramusculares da vacina XRX-001 com dose baixa de antigénio (0,48 mg), com dose elevada de antigénio (4,8 mg) ou placebo<sup>44</sup>.

Os níveis de AN foram medidos no início do estudo (dia 0) e nos dias 21 (antes da segunda injeção), 31 e 42<sup>44</sup>.

Uma única injeção da vacina XRX-001 induziu o desenvolvimento de AN em 46 % dos indivíduos do grupo a quem foi inoculada a vacina com dose elevada de antigénio e 13 % dos indivíduos do grupo que recebeu a vacina com dose baixa de antigénio. A resposta de AN

após a segunda injeção foi rápida, com anticorpos presentes em 100% dos indivíduos no grupo que recebeu dose elevada e 88% dos indivíduos no grupo que recebeu dose baixa, dentro de 10 dias. Portanto, foram necessárias duas injeções para uma imunização eficaz. Concluiu-se que as respostas imunes contra a vacina XRX-001 foram dependentes da dose, sugerindo que maiores TMG e respostas imunológicas mais duradouras podem ser conseguidos com doses mais elevadas de antigénio. No entanto, esta hipótese necessita ser estudada em ensaios clínicos de fase 2<sup>44</sup>.

Dor local e sensibilidade foram mais frequentes nos dois grupos que receberam a vacina XRX-001 do que no grupo placebo, mas a frequência destes acontecimentos não diferiu de acordo com a dose. As reações locais foram ligeiras e menos frequentes após a segunda injeção do que após a injeção inicial. Reações moderadas foram raras e não foram relatadas reações graves. Não houve reações febris<sup>44</sup>.

O próximo passo para o desenvolvimento da vacina XRX-001 tem como objetivo avaliar a durabilidade da resposta imunológica, num ensaio clínico de fase 2<sup>44</sup>.

## 4.2 Vacina de DNA

As vacinas de DNA são potenciais candidatas a substituir as vacinas vivas atenuadas. Uma vez que não são de natureza infecciosa, não desencadeiam efeitos adversos graves, sendo por isso consideradas seguras. Para além disso, são mais facilmente manipuladas e não necessitam de baixas temperaturas para o seu acondicionamento e distribuição<sup>45</sup>.

Têm sido desenvolvidas vacinas baseadas em sequências de DNA que codificam proteínas específicas do VFA e que podem ser alternativas à vacina 17D<sup>45</sup>.

Tendo em conta que a proteína E do VFA é a principal proteína da superfície do VFA e o principal alvo para os AN, foram desenvolvidas vacinas baseadas neste antigénio, isto é, vacinas que consistem em construções de DNA que contêm sequências que codificam a proteína E do vírus<sup>45</sup>.

Antígenos codificados por vacinas de DNA são expressos no meio intracelular e preferencialmente apresentados ao sistema imune através de moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe I (CMH I). A apresentação do antigénio por esta via é geralmente associada a uma resposta celular citotóxica e, muitas vezes, não provoca uma resposta humoral satisfatória. Para induzir níveis satisfatórios de AN, pode direcionar-se o antigénio codificado pelas vacinas de DNA para o Complexo Maior de Histocompatibilidade classe II (CMH II). A apresentação antigénica via CMH II induz a ativação das células T CD4+, que por sua vez é fundamental para induzir resposta das células T CD8+, o

desenvolvimento de células de memória e a expansão clonal das células B<sup>48</sup>. Assim sendo, para direcionar o antígeno para a via CMH II, pode utilizar-se uma estratégia que consiste em expressar o antígeno fundido com a Proteína de Associação à Membrana Lisossomal (LAMP)<sup>45</sup>.

Fez-se um estudo em ratos para comparar as propriedades imunológicas de duas construções de DNA distintas e da vacina I7D. Uma construção consiste apenas numa sequência de DNA que codifica a proteína E do VFA e outra consiste na sequência de DNA que codifica a proteína E do VFA mas com o domínio transmembranar da proteína E substituído por uma sequência que codifica a porção C-terminal da LAMP<sup>46</sup>.

Verificou-se que ambas as construções de DNA foram capazes de induzir respostas muito fortes de células T e de magnitude semelhante às respostas induzidas pela vacina I7D. Constatou-se também que a construção de DNA que continha a porção C-terminal da LAMP fundida com a sequência codificadora da proteína E induziu níveis mais elevados de AN do que a vacina I7D. Para além disso, esta construção conferiu 100 % de proteção contra o VFA aquando da sua inoculação via intracerebral em ratos<sup>45,46</sup>.

A vacina de DNA formada pela fusão da sequência codificadora da proteína E com a sequência codificadora da LAMP mostrou ser bastante promissora. Os resultados obtidos encorajam estudos noutros modelos animais, nomeadamente em primatas não humanos. A duração da proteção é um ponto importante e que se pretende estudar em estudos posteriores<sup>45</sup>.

## Conclusão

A febre amarela é uma doença infecciosa que ocorre em África e América do Sul, mas devido à facilidade com que se viaja atualmente de país para país, o vírus responsável por esta infeção pode propagar-se a nível mundial. É necessário implementar medidas preventivas para que o vírus não se dissemine, nomeadamente aumentar a cobertura vacinal em áreas de risco com baixa cobertura, como é o caso de alguns países africanos, e dar continuidade à vacinação de indivíduos que pretendam viajar para áreas endémicas. Para além disso, respostas rápidas com campanhas de vacinação de emergência são essenciais para controlar surtos e evitar epidemias.

A vacina atualmente usada é uma vacina viva atenuada, denominada vacina 17D. É uma vacina eficaz mas que apresenta algumas limitações. É contra-indicada em indivíduos com idade inferior a 6 meses, alergia a um componente da vacina, neoplasias malignas, transplantação de órgãos, entre outros casos e deve ser dada com precaução a indivíduos com mais de 60 anos, na gravidez, amamentação, entre outras situações. Para além disso, embora raramente, pode desencadear reações adversas graves, como doença neurotrópica, doença viscerotrópica e reações de hipersensibilidade. Assim, têm sido desenvolvidas novas vacinas, através da inativação do vírus inteiro e através de construções de DNA. Estas têm mostrado ser tão ou mais eficazes e mais seguras que a vacina atual, revelando-se por isso promissoras na prevenção da febre amarela, podendo constituir potenciais alternativas à vacina 17D, a única atualmente usada em todo o Mundo.

## Bibliografia

- 1) **International Committee on Taxonomy of Viruses.** (2014) [Acedido a 29 de março de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
  
- 2) BEASLEY, David et al- **Yellow fever virus: genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy.** Antiviral Research. Vol. 115, (2015), p. 48-70. [Acedido a 18 de março 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25545072>
  
- 3) VASCONCELOS, Pedro. - **Yellow fever.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 36, nº2 (2003), p. 275-293. [Acedido a 29 de março de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12806465>
  
- 4) YE, Jing et al - **Immune evasion strategies of flaviviruses.** Vaccine. Vol. 31, nº3 (2013), p. 461-471. [Acedido a 19 de março 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153447>
  
- 5) GARDNER, Christina L. et al – **Yellow fever: a reemerging threat.** Clin Lab Med. Vol. 30, nº1 8 (2010), p. 237-260. [Acedido a 20 de abril]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513550>
  
- 6) PIERSON, Theodore; KIELIAN, Margaret. - **Flaviviruses: Braking the entering.** Current opinion in virology. Vol. 3, nº1 (2013), p. 3-12. [Acedido a 25 de março de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23352692>
  
- 7) HEINZ, Franz; STIASNY, Karin - **Flaviviruses and flavivirus vaccines.** Vaccine. Vol. 30, nº 29 (2012), p. 4301-4306. [Acedido a 23 de março de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682286>
  
- 8) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 21 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.cdc.gov/travel-training/local/HistoryEpidemiologyandVaccination/page27568.html>

- 9) NORRBY, E. - **Yellow fever and Max Theiler: the only Nobel Prize for a virus vaccine.** The Journal of experimental medicine. Vol. 204, nº12 (2007), p. 2779-2784. [Acedido a 24 de abril de 2015]. Disponível na internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2118520/>
- 10) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 24 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.cdc.gov/yellowfever/>
- 11) **World Health Organization.** [Acedido a 22 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/impact1/en/>
- 12) **World Health Organization.** [Acedido a 27 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/>
- 13) **World Health Organization.** [Acedido a 22 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/csr/disease/yellowfev/risk/en/>
- 14) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 27 de abril de 2015]. <http://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html>
- 15) MONATH, Thomas P. – **Treatment of yellow fever.** Antiviral research. Vol. 78, (2008), p.116-124. [Acedido a 29 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18061688>
- 16) QUARESMA. Juarez et al – **Immunity and immune response, pathology and pathologic changes in the immunopathology of yellow fever.** Reviews in Medical Virology. Vo.l 2, (2013), p.305-318. [Acedido a 30 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873723>
- 17) PAESSLER, Slobodan and WALKER, David H. – **Pathogenesis of the Viral Hemorrhagic Fevers.** The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. Vol 8, (2013), p.411-440. [Acedido a 1 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23121052>

18) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 29 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.cdc.gov/yellowfever/healthCareProviders/healthCareProviders-ClinLabEval.html>

19) MONATH, Thomas P.; VASCONCELOS, Pedro F.C. – **Yellow fever.** Journal of Clinical Virology. Vol. 64, (2015), p.160-173. [Acedido a 1 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25453327>

20) BUSOWSKI, Mary et al. - **Yellow fever workup.** Medscape. (2014). [Acedido a 29 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://emedicine.medscape.com/article/232244-workup#showall>

21) **World Health Organization.** [Acedido a 29 de abril de 2015]. Disponível na Internet: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/vpd/surveillance\\_type/passive/YF\\_standards/en/](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/YF_standards/en/)

22) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 28 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.cdc.gov/yellowfever/symptoms/index.html#>

23) JULANDER, Justin – **Experimental therapies of yellow fever.** Antiviral Research. Vol. 97, nº2 (2013), p.169-179. [Acedido a 2 de abril de 2015]. Disponível na internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237991>

24) LOWN, Beth A. et al – **Vaccine Administration Decision Making: The case of yellow fever vaccine.** Clinical Infection Disease. Vol. 55, nº6 (2012), p. 837-843. [Acedido a 7 de abril 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22670048>

25) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 30 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.cdc.gov/yellowfever/prevention/index.html>

26) VERMA, Ramesh et al - **Yellow fever vaccine: an effective vaccine for travelers.** Human Vaccines and Immunotherapeutics. Vol. 10, nº1 (2014), p. 126-128. [Acedido a 6 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4181013/>

- 27) **World Health Organization.** [Acedido a 3 de maio de 2015]. Disponível na Internet: [http://www.who.int/immunization/diseases/yellow\\_fever/en/](http://www.who.int/immunization/diseases/yellow_fever/en/)
- 28) FRIERSON, J.Gordon – **The Yellow Fever Vaccine: A History.** Yale Journal of Biology and Medicine. Vol. 83, nº2 (2010), p. 77-85. [Acedido a 20 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2892770/>
- 29) MELO, Andréa et al - **Description of a prospective 17DD yellow fever vaccine: Cohort in Recife, Brazil.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. Vol. 85, nº4 (2011), p. 739-747. [Acedido a 21 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3183786/>
- 30) MINOR, Philip D. – **Live attenuated vaccines: historical successes and current challenges.** Virology. Vol 479–480, (2015), p. 379-392. [Acedido a 23 de abril de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25864107>
- 31) BARNETT, Elizabeth D. - **Yellow fever: epidemiology and prevention.** Clinical Infection Diseases. Vol. 28, nº 22 (2007), p.850-856. [Acedido a 11 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304460>
- 32) VRATSKIKH, Oksana et al – **Dissection of Antibody Specificities Induced by yellow fever vaccination.** PLOS pathogens. Vol 9, nº6 (2013). [Acedido a 10 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818856>
- 33) JONKER, Emile et al - **Advances and controversies in yellow fever vaccination.** Therapeutic advances in vaccines. Vol. 1, nº 4 (2013), p. 144-152. [Acedido a 12 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991151/>
- 34) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 18 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.cdc.gov/yellowfever/vaccine/index.html>
- 35) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 16 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/diseases/yellow-fever>



- 36) **Portal da Saúde.** [Acedido a 1 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.portaldasaude.pt/portal/conteudos/informacoes+uteis/saude+em+viagem/cconsul+de+saude+do+viajante.html>
- 37) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 19 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/infectious-diseases-related-to-travel/yellow-fever>
- 38) **World Health Organization.** [Acedido a 1 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.who.int/ith/updates/20140605/en/>
- 39) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 14 de junho]. Disponível na Internet: <http://www.cdc.gov/travel-training/local/HistoryEpidemiologyandVaccination/>
- 40) SILVA, ML et al. - **Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination.** Clinical and Vaccine Immunology. Vol. 17, nº1 (2010), p. 118-126. [Acedido a 11 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906894>
- 41) YACTAYO, Sergio et al. - **Yellow fever: Detection and investigation of serious adverse events following yellow-fever vaccination.** World Health Organization, 2008. [Acedido a 11 de junho de 2015]. Disponível na Internet: [http://www.who.int/csr/resources/publications/HSE\\_GAR\\_ERI\\_2010\\_2/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/HSE_GAR_ERI_2010_2/en/)
- 42) **Centers for Disease Control and Prevention.** [Acedido a 15 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.cdc.gov/vaccines/hcp/vis/vis-statements/yf.html>
- 43) MONATH, Thomas et al. - **Inactivated yellow fever 17D vaccine: development and nonclinical safety, immunogenicity and protective activity.** Vol. 28, nº22 (2010), p.3827-3840. [Acedido a 30 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347059>
- 44) MONATH, Thomas et al. - **An Inactivated Cell-Culture Vaccine against Yellow Fever.** The New England Journal of Medicine. Vol. 364, nº14 (2011), p. 1326-1333 [Acedido a 1 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21470010>

45) MACIEL, Milton et al. - **A DNA vaccine against Yellow Fever Virus: Development and Evaluation.** PLOS Neglected Tropical Diseases. Vol. 9, nº4 (2015), p. 1-19. [Acedido a 10 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4395287/>

46) DHALIA, Rafael et al. - **Membrane and envelope virus proteins co-expressed as lysosome associated membrane protein (LAMP) fused antigens: a potential tool to develop DNA vaccines against flaviviruses.** Anais da Academia Brasileira de Ciência. Vol. 81, nº4 (2009), p. 663-669. [Acedido a 4 de julho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=19893892>