

Linfócitos atípicos em pacientes com dengue: valor clínico e diagnóstico

Atypical lymphocyte in dengue fever patients: clinical and diagnostic value

Luciana Souza Chavasco¹

¹Aluna do curso de pós graduação em Hematologia Clínica e Laboratorial da Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto –SP.

RESUMO: Dengue é a arbovirose de maior prevalência em humanos no mundo, considerada de alta morbidade e mortalidade em crianças e adultos, tem alta prevalência em países tropicais. O quadro epidemiológico caracteriza-se como epidemias recorrentes, mais frequentes nos grandes centros urbanos, levando milhares de pessoas a quadros sintomatológicos que variam de leve a grave. Os achados laboratoriais hematológicos mais frequentemente encontrados são hemoconcentração, plaquetopenia, leucopenia, linfocitose com presença de linfócitos atípicos. Esta revisão tem como objetivo avaliar o papel dos linfócitos atípicos no diagnóstico e prognóstico da dengue.

PALAVRAS-CHAVE: Dengue; parâmetros hematológicos; linfócitos atípicos.

ABSTRACT: Dengue is the most prevalent arboviral disease in humans in the world, considered high morbidity and mortality in children and adults and has high prevalence in tropical countries. Epidemiologically is characterized by recurrent epidemics, more frequent in large urban centers, causing symptoms ranging from mild to severe. Haematologic parameters most commonly found are hemoconcentration, thrombocytopenia, leukopenia, lymphocytosis with atypical lymphocytes. The aim of this review is to evaluate the role of atypical lymphocytes in the diagnosis and prognosis of dengue.

KEYWORDS: Dengue; haematological parameters; atypical lymphocytes.

INTRODUÇÃO

Considerada atualmente uma das principais endemias no Brasil e no mundo, a dengue vem se destacando nas últimas décadas como um problema reemergente de saúde pública, tanto pelo número de casos e óbitos, como pelo expressivo contingente de pessoas expostas ao risco de contraí-la (1).

A prevalência mundial da dengue cresceu dramaticamente nas últimas décadas e, por isso, vem trazendo preocupação com a frequência com que tem causado epidemias, levando milhares de pessoas a quadros sintomatológicos que variam de leve a grave (1,6). A doença tornou-se endêmica em 112 países da África, das Américas, da Região Leste do Mediterrâneo, do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental (1,2). Todos os anos, cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue, 500.000 casos de dengue hemorrágica e no mínimo 12.000 mortes são relatados no mundo (2).

A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa, de etiologia viral, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, o qual possui um nucleocapsídeo icosaédrico envolvendo seu RNA viral de fita simples, complexado com múltiplas cópias da proteína C (2,4). O vírus da dengue (DENV) é transmitido ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos hematófagos, principalmente o *Aedes aegypti*, presentes nas áreas tropicais e subtropicais mais povoadas do mundo (8). Outros mosquitos do gênero *Aedes* como o *Aedes albopictus* e *Aedes africanus* têm sido relacionados como transmissores secundários na Ásia e na África, respectivamente (5).

Com base em testes de neutralização, foram descritos quatro sorotipos virais, imunologicamente distintos, classificados como DEN-1, DEN-2, DEN-3 E DEN-4, distribuídos em todos os continentes (2,3). A infecção natural por um dos quatro sorotipos produz uma imunidade duradoura contra uma reinfecção pelo sorotipo específico, mas a proteção estereotípica é temporária e parcial, resultando em infecções

sequenciais. O estabelecimento dos quatro sorotipos nas Américas levou ao ressurgimento da febre clássica e da febre hemorrágica da dengue nessa região (7).

Clinicamente, a dengue pode cursar de forma assintomática ou apresentar quadros clínicos como: doença febril indiferenciada, febre clássica da dengue e dengue hemorrágica com ou sem choque. A doença clássica apresenta-se como uma enfermidade aguda, febril, autolimitada, que perdura por aproximadamente 4 a 5 dias (9). A doença começa abruptamente, com febre elevada, dor retro-orbitária, cefaléia de grau variável, erupção maculopapular, mialgias, artralgias, astenia e prostração. Também são observados manifestações gastrointestinais, linfadenopatias, plaquetopenia e fenômenos hemorrágicos de grau moderado (9,10).

Na dengue hemorrágica, além dos sintomas iniciais da doença clássica, nota-se uma intensificação dos fenômenos hemorrágicos e plaquetopenia (11). Também observa-se hepatomegalia e insuficiência circulatória. Um achado importante que determina a gravidade da dengue hemorrágica, diferenciando-a da dengue clássica, é o extravasamento plasmático, seguido de choque hipovolêmico e óbito (12).

Alterações hematológicas também são comumente observadas em pacientes com dengue, como por exemplo: hemoconcentração, leucopenia, plaquetopenia e alterações de hemostasia sanguínea com presença frequente de manifestações hemorrágicas (13). Outro achado importante é a presença de linfócitos atípicos, definidos como formas intermediárias de ativação dos linfócitos T em decorrência de estímulos antigênicos virais, representando, portanto, um bom marcador celular para diagnóstico desta infecção. O objetivo desta revisão é descrever a etiopatologia dos linfócitos atípicos presentes nos hemogramas de pacientes com dengue.

CARACTERÍSTICAS E ESTRUTURA VIRAL

Os vírus da dengue são esféricos, envelopados, medem entre 40-60 nm de diâmetro. O genoma é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, de aproximadamente 11.000 nucleotídeos (14). Seu capsídeo icosaédrico é circundado por uma bicamada lipídica com pequenas projeções na superfície, nas quais estão ancoradas as glicoproteínas de superfície.

O genoma viral consiste de uma única fase aberta de leitura (*open reading frame*, ORF), codificando uma longa poliproteína que, após clivagem por proteases celulares e virais, gera sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) e três proteínas estruturais: a proteína C ou proteína nuclear, localizada no nucleocapsídeo; a proteína M, que está associada à membrana; e a proteína E, do envelope viral, considerada a principal proteína estrutural, estando diretamente relacionada com a imunidade e virulência (15,16). A glicoproteína E é responsável por atividades biológicas do ciclo viral, tais como: montagem da partícula viral, interação com receptores celulares e fusão de membrana, além de ser o principal alvo de anticorpos neutralizantes e possuir atividade hemaglutinante (15). A interação entre C, M e E resulta na própria conformação estrutural do vírus.

A sequência de aminoácidos entre as várias proteínas é altamente conservada entre os DENV e estas regiões podem corresponder aos domínios envolvidos em funções biológicas determinantes para o ciclo biológico do vírus. Em contraste, algumas regiões são altamente variáveis, possivelmente refletindo uma rápida evolução, forte seleção imune de epitopos ou mesmo restrições na estrutura secundária do RNA (17).

Os quatro sorotipos do vírus dengue são antígenicamente diferentes, porém existem evidências de que pode existir subcomplexo sorológicos em cada grupo. Atualmente estes vírus têm sido analisados através dos estudos moleculares, por sequenciamento dos vírus que permite uma visualização maior das relações genéticas, permitindo reuni-los em grupos genômicos ou em subgrupos (17,18). A técnica de sequenciamento possibilita uma melhor análise das relações genéticas entre as amostras virais. Investigações realizadas na década de 90 sobre a evolução filogenética dos diversos sorotipos do vírus dengue identificaram subtipos e genótipos, por meio de sequenciamento de fragmentos do RNA viral, demonstrando a evolução molecular ocorrida dentro de um mesmo sorotipo (17). Essas diferenças genotípicas parecem estar associadas com a diferença de virulência (19).

Embora todos os sorotipos possam estimular a formação de anticorpos específicos, a imunidade induzida por um sorotipo é apenas parcialmente protetora contra outros sorotipos (imunidade heteróloga ou cruzada) e desaparece rapidamente. Por outro lado, a imunidade conferida pela infecção do vírus (homóloga) é permanente para o sorotipo que causou a infecção (20).

ASPECTOS CLÍNICOS E FISIOPATOLÓGICOS

O ciclo de replicação viral inicia-se após a introdução de partículas virais no hospedeiro através da picada de fêmeas de mosquitos hematófagos. Este consiste no desencadeamento de uma série de eventos ao nível da célula hospedeira permissiva, os quais são: adsorção, penetração, desnudamento, transcrição, tradução, replicação, montagem, e brotamento das partículas virais. Estudos mostram que o DENV tem a capacidade de infectar numerosas células humanas, incluindo células dendríticas, monócitos, macrófagos, linfócitos B, linfócitos T, células endoteliais, hepatócitos e células neuronais, assim como algumas linhagens celulares usadas para propagação viral (21).

A dengue pode ocorrer de forma assintomática ou sintomática. Ela se apresenta com uma grande variedade de sintomas, que vão desde a forma leve, a dengue clássica (DC), até a febre hemorrágica da dengue (FHD) (22). A dengue em sua forma clássica é uma doença febril, não fatal, com duração de 5 a 7 dias. Os principais sinais e sintomas consistem de febre súbita, dor retro-orbitária associada com o movimento dos olhos e congestão conjuntival, cefaléia, artralgia, mialgia, prostração, exantema máculopapular generalizado, prurido, astenia, náuseas, vômitos, dor abdominal, sabor metálico nos alimentos, mudança no estado psicológico, podendo ocorrer depressão pós-doença (23).

A grande maioria dos pacientes apresenta a forma leve da doença, a dengue clássica que tem uma evolução benigna. Em uma proporção menor dos casos, entre 1 a 2%, a doença apresenta evolução muito mais grave, como a FHD (24). A fisiopatologia primária encontrada na FHD é um aumento abrupto da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento do plasma para o espaço extravascular, resultando em hemoconcentração e diminuição da pressão sanguínea (25).

Durante a fase inicial da infecção ocorre uma trombocitopenia como resultado da hipocelularidade da medula óssea, resultante da infecção direta do vírus sobre as células estaminais hematopoiéticas e células do estroma. Quando a febre se instala, ocorre a hiper celularidade da medula óssea e o aumento da destruição imuno-mediada das plaquetas, (diminuição da contagem plaquetária no sangue periférico pela produção de anticorpos antiplaquetários) levando assim à trombocitopenia (25).

Existem fortes evidências de que a forma clínica da dengue hemorrágica esteja correlacionada a uma infecção secundária por um sorotipo diferente da infecção anterior. Esta correlação sugere o envolvimento do sistema imune no aumento da gravidade da dengue e patogenia da FHD (26). Estas evidências se baseiam no fato de que a memória imunológica induzida pela infecção primária do dengue por um sorotipo, não seria capaz de controlar a infecção por outro sorotipo. Isto se deveria à presença de vários epítomos não protetores, reconhecidos pelos linfócitos B e T, que reagiriam de forma cruzada entre os sorotipos. A presença de epítomos similares, porém não idênticos, com afinidades alteradas pelos anticorpos e linfócitos T, seriam os determinantes de uma resposta imunológica anormal e deletéria (26). Deste modo, a participação dos linfócitos T de memória ativados em uma infecção secundária com sorotipos heterólogos pode contribuir para o desenvolvimento da FHD.

Durante uma infecção secundária, as células T em contacto com macrófagos infectados tornam-se ativadas. Os linfócitos T ativados apresentam uma resposta imune inapropriada para um sorotipo heterólogo, devido à expansão clonal de células T, que apresentam reação cruzada a uma infecção prévia. Estas células possuem baixa afinidade para o sorotipo do vírus causador da infecção, produção alterada de citocinas, tornando-se ineficientes a eliminar o vírus, aumentando assim a viremia e contribuindo para o desenvolvimento da FHD (27).

Foi demonstrado que em muitos pacientes com infecção secundária heteróloga aguda pelo DENV, os linfócitos T CD8+ gerados ligam-se fracamente ao complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) que apresentam epítomos do vírus causador da infecção. Ao contrário, estes linfócitos ligam-se mais fortemente aos epítomos do vírus causador da infecção primária, além de, apresentarem um fenótipo apoptótico que parece destinar estas células a morte celular programada antes de exercerem sua função antiviral e controlarem a infecção (28,29). Uma das consequências da infecção secundária e ativação de células T é a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , IL-1 β , IL-8 e FNT- α , e citocinas anti-inflamatórias como IL-6 e IL-10 (30).

Estudos revelaram que citocinas como FNT- α de origem macrófágica e linfocitária encontram-se em níveis séricos elevados no caso de FHD. O FNT- α estimula as células do endotélio vascular e monócitos a libertar fator de ativação plaquetária (PAF) e óxido nítrico (ON) o que contribui para o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento do plasma. Estimula ainda a trombocitopenia e a libertação de histamina pelos basófilos. O FNT- α também tem a capacidade de regular a expressão de fator tecidual em monócitos e diminui a expressão de trombosmodulina no endotélio, possui um efeito direto na produção de IL-6 e um efeito indireto na coagulação e fibrinólise (31,32,33).

A IL-6 sérica elevada é observada em alguns pacientes com FHD, atua como um pirógeno endógeno aumentando a hipertermia e juntamente com outros mediadores promove inicialmente a coagulação intravascular, induzindo monócitos sanguíneos e as células endoteliais vasculares a expressarem fator tecidual, o que resulta na ativação de ambas as vias de coagulação, extrínseca e intrínseca, culminando na geração de fibrina e no aumento da destruição das plaquetas o que leva a trombocitopenia (32,14).

A IL-8, juntamente com a elastase secretada por neutrófilos ativados facilita o dano endotelial, ativa o complemento, coagulação e a cascata fibrinolítica. Encontra-se elevado na efusão pleural de doentes que apresentam FHD (32,35,36). A IL-10 é produzida por monócitos e, está associada à diminuição dos níveis das plaquetas, à regulação da resposta inflamatória e inibe a expressão de fator tecidual (32,34).

Deste modo, a participação de linfócitos T, juntamente com produção de citocinas e mediadores químicos, apresentam efeito sinérgico que acabam por aumentar a permeabilidade vascular, a indução de trombocitopenia e a ocorrência de hemorragia o que contribui para o desenvolvimento de FHD/SCD (32).

LINFÓCITOS ATÍPICOS

Os linfócitos atípicos são variantes morfológicas benignas de linfócitos circulantes presentes no sangue periférico que desempenham um papel importante na resposta imune, sendo definidos como formas intermediárias de ativação dos linfócitos T em decorrência a estímulos antigênicos virais. Estas células apresentam variações nos detalhes morfológicos e nas características dos marcadores de superfície, mostrando constituir uma mistura heterogênea de tipos celulares, principalmente linfócitos T e B (37).

As células atípicas foram descritas em 1907, por Türk, em pacientes com mononucleose infecciosa. Posteriormente, vários autores descreveram essas células em condições variáveis, sendo que o termo células mononucleares atípicas foi introduzido para descrever essas atipias, devido à natureza incerta das mesmas. Assim, observou-se que linfócitos atípicos também estavam presentes em outras infecções virais e em infecções por protozoários (38). Em infecções virais, como por exemplo, na dengue, essas células são facilmente identificadas sendo consideradas intermediárias entre os linfócitos e plasmócitos, podendo ser denominados de linfócito plasmocitóide ou plasmócito linfocitóide. O achado dessas células no hemograma de pacientes com suspeita de dengue é uma informação útil que direciona e auxilia o diagnóstico clínico, uma vez que os sintomas e achados laboratoriais da doença não são patognômicos e a comprovação sorológica geralmente é demorada.

Morfologicamente são descritos como células de tamanho aumentado (12-40 μm) em relação aos linfócitos típicos (10-12 μm), de formato poliédrico e bordas citoplasmáticas irregulares, citoplasma abundante, basofílico, contendo zonas claras perinucleares e eventual microvacuolização. O núcleo apresenta-se excêntrico, lobulado, com carioteca irregular e cromatina fina e não condensada, o que ocasionalmente nos permite observar a presença de nucléolos. Estudos recentes sugerem que estes linfócitos atípicos são linfócitos T ativados, produzidos em resposta a linfócitos B (**FIGURA 1**). A imunohistoquímica mostra que os linfócitos atípicos apresentam concentrações elevadas de fosfatase ácida, fosforilase quinase, estearase não específica e glicogênio citoplasmático (37).

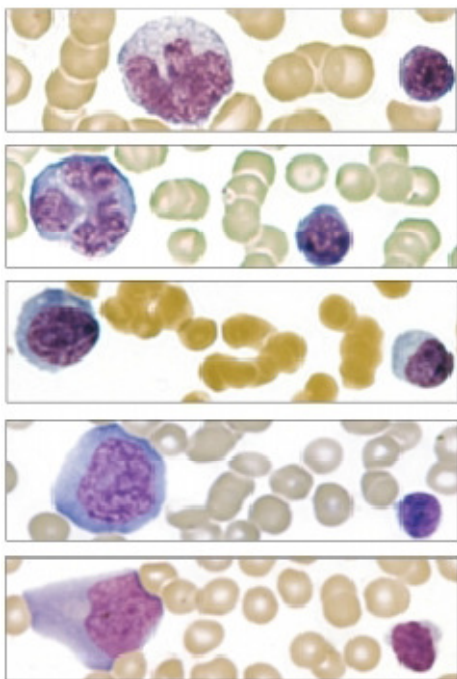


FIGURA 1. Morfologia dos linfócitos atípicos.

As características morfológicas típicas incluem: citoplasma aumentado e intensamente basofílico, frequentemente vacuolizado; cromatina nuclear fina e difusa, núcleos irregulares e nucléolos. Os cinco painéis ao lado são de diferentes pacientes e demonstram a variabilidade morfológica dessas células. Para comparação, linfócitos normais são demonstrados no lado direito de cada painel. *Adaptado de Wintrobe, 2010.*

Estudos baseados em microscopia eletrônica revelam que algumas organelas citoplasmáticas dos linfócitos atípicos como retículo endoplasmático e aparelho de Golgi mostram diferentes graus de desenvolvimento. O retículo endoplasmático é escasso, a cromatina nuclear é finamente distribuída, as mitocôndrias são arredondadas com cristas finas e alongadas, o aparelho de Golgi é bem desenvolvido e os ribossomos são abundantes, dispostos livremente no citoplasma ou agrupados em rosetas (37). Algumas células apresentam intenso conteúdo de RNA citoplasmático, o que as confere intensa basofilia citoplasmática, situação esta frequentemente observada em esfregaços sanguíneos de pacientes com dengue.

Em adultos saudáveis o achado dessas células no sangue periférico pode ocorrer numa frequência de 1 a 5%. Em crianças esta porcentagem pode ser um pouco maior, o que não significa necessariamente uma condição patológica. Entretanto, o aumento no número dessas células no curso da infecção, está fortemente associado a uma resposta celular aguda inespecífica a estímulos antigênicos (39,40).

No caso particular da infecção por dengue, a presença de linfócitos atípicos tem sido relatada há mais de três décadas no sangue periférico de pacientes portadores desta infecção (40). Sabe-se que estes começam a predominar no hemograma a partir do 5º dia de curso da infecção e que sua presença é mais frequente em casos de FHD do que na DC. Observa-se também uma inversão da razão CD4/CD8 (13).

Quando se compara o dengue com outras patologias infecciosas virais, de quadro clínico semelhante, constata-se que a presença de no mínimo 10% de linfócitos atípicos no sangue periférico é bom indicador para diagnóstico de dengue. Esses resultados são consistentes com análises de marcadores celulares que demonstraram predomínio de linfócitos atípicos na febre hemorrágica do dengue através da citometria de fluxo. Esses linfócitos atípicos são, na maioria, linfócitos CD 19 positivos, além disso, são mais frequentes no dia da alta do que na admissão do paciente, relacionando-se com o início da fase de convalescença da doença (13,41).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, as principais alterações hematológicas encontradas no sangue periférico de pacientes com dengue são leucopenia, plaquetopenia e linfocitose com presença de linfócitos atípicos. Sabe-se que a presença de linfócitos atípicos, apesar de não apresentar um achado patognomônico da infecção por dengue, auxilia no prognóstico da doença, pois sua presença pode ser correlacionada ao tempo de curso da infecção, já que estes predominam a partir do 5º dia da doença e também pode ser um dos parâmetros para avaliar a evolução da DC para FHD, já que estas células predominam no hemograma de pacientes com FHD. Novos estudos ao nível molecular, envolvendo principalmente os linfócitos CD 19 devem ser feitos para novas evidências científicas, afim de que a contagem de CD 19, por citometria de fluxo também seja avaliada no acompanhamento clínico e laboratorial dessa infecção viral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Fact sheet, 117. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>.
2. World Health Organization. Scientific working group on dengue. Meeting report, Geneva, Switzerland, 3-5 April 2000. Geneva: WHO; 2000.

3. Chang GJ. Molecular biology of dengue viruses. In: Dengue and dengue hemorrhagic fever. Gubler DJ, Kuno G, eds. Cambridge: CAB International; 1997. p. 175-98.
4. Lindenbach, B.D., H.-J. Thiel, C.M. Rice. "Flaviviridae: The Viruses and Their Replication." Chapter 33 in D.M. Knipe, et al. (eds.), Fields Virology, 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins, New York, NY. 2006.
5. Bennett, S.N., Drummond, A.J., Kapan, D.D., Suchard, M.A., Munoz-Jordan, J.L., Pybus, O.G., Holmes, E.C., Gubler, D.J., 2010. Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. *Molecular Biology and Evolution* 27, 811–818.
6. Cavalcanti, Luciano Pamplona de Góes et al. Clinical and epidemiological characterization of dengue hemorrhagic fever cases in northeastern, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Aug 2010, vol.43, no.4, p.355-358.
7. Pinheiro FP. Dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS) in the Americas. Proceedings of the first International Seminar on Dengue, Rio de Janeiro, Brazil, 1996.
8. Forattini OP. *Culicidologia Médica: identificação, biologia e epidemiologia*. Vol. 2. São Paulo: Edusp; 2002.
9. Cardoso, Ivana Macedo et al. Dengue: clinical forms and risk groups in a high incidence city in the southeastern region of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Aug 2011, vol.44, no.4, p.430-435.
10. Narayanan M, Aravind MA, Thilothammal N, et al. Dengue fever epidemic in Chennai—a study of clinical profile and outcome. *Indian Pediatr* 2002.
11. Sunit, Singhi; Niranjana, Kissoon; Arun, Bansal. Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. *J. Pediatr. (Rio J.)*; 83(20); S22-S35; 2007.
12. Hayes EB, Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J*. 1992.
13. Éveny Cristine Luna de, Oliveira; Elenir Rose Jardim Cury, Pontes; Rivaldo Venâncio da, Cunha; Íris Bucker, Fróes; Delso do Nascimento. Alterações hematológicas em pacientes com dengue. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 42(6); 682-685; 2009.
14. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis.*; 2:33–42, 2002.
15. Guzman MG, Kouri G. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol.*; 3:621 7, 1996.
16. Rothman, A. L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, Ann Arbor, v. 113, p. 946-951, 2004.
17. Deubel, V. The contribution of molecular techniques to the diagnosis of dengue infection. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. New York: CAB International, p.335-365. 1997.
18. Lewis, J. A.; Chang, G. J.; Lanciotti, R. S.; Kinney, R. M.; Mayer, L. W. & Trent, D.T. Phylogenetic relationship of dengue-2 viruses: Correlations with epidemiology. *Virology*, 197:216-224. 1993.
19. Pires Neto, R. J. et al. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 38, p. 843-852, 2005.
20. Torres, E. M. A transmissão. In: *Dengue y dengue hemorrágico*. (E. M. Torres & Laboratorio ELEA, Ed.), pp. 43-58. Buenos Aires. Editora da Universidad Nacional de Quilmes. 1998.
21. Anderson, R. Manipulation of cell surface macromolecules by flaviviruses. In: *Advances in Virus Research: The Flavivirus: structure, replication and evolution*. Chambers T.J., Monath T.P. (Eds.). California, Elsevier, v. 59.p. 229 - 274. 2003.
22. Gubler, D. J.; Clark, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v.1, n.2, p.55-7, 1995.

23. Dietz, V. J. et al. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: evaluation of a clinically based dengue surveillance system. *American Journal of Epidemiology*, Baltimore, v.131, n.4, p.693-701, 1990.
24. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, Geneva, New Edition, 2009.
25. Teo D, Ng L, Lam S. Is dengue a threat to the blood supply? *Transfusion Medicine*. 19(2):66-77. 2009.
26. Halstead, S. B. et al. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. *Reviews in Infectious Diseases*, Chicago, v.11 Suppl. 4, p.S830-839, 1989.
27. Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical microbiology reviews*. 22(4):564. 2009.
28. Nielsen DG. The relationship of interacting immunological components in dengue pathogenesis. *Virology Journal*.6 (1):1 - 7. 2009.
29. Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 47(2):155-66. 2006.
30. Stephenson JR. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. *Bulletin of the World Health Organization*.83(4):308-14. 2005.
31. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*. 80(23):11418 - 31. 2006.
32. Martina BEE, Koraka P, Osterhaus ADME. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical microbiology reviews*. (4): 564. 2009.
33. George FHM. Abordagem Clínica para casos de dengue. In: saúde D-Gd, editor. Lisboa: Mionistério da saúde; 2008.
34. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*. 80(23):11418 - 31. 2006.
35. Faheem M, Raheel U, Riaz MN, Kanwal N, Javed F, Zaidi NSS, et al. A molecular evaluation of dengue virus pathogenesis and its latest vaccine strategies. *Molecular Biology Reports*. 1-10. 2010.
36. Kurane I. Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 30(5-6):329-40. 2007.
37. Simon MW. The atypical lymphocyte. *International Pediatrics*. 18:20-22, 2003.
38. Türk W. Septische Erkrankungen Bei Verkümmerng DES Granulozytensystems. *Wien Klin Wchnschr*. 20:157-62. 1907.
39. Hudnall SD, Patel J, Schwab H, Martinez J. Comparative immunophenotypic features of EBV positive and EBV-negative atypical lymphocytosis. *Cytometry B Clin Cytom*. 55 (1): 22-8. 2003.
40. Rey-Caro LA, Villar-Centeno LÁ. Linfocitos atípicos en dengue: papel en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. *Revisión sistemática de la literatura. Rev Cienc Salud*. 10 (3): 323-335. 2012.
41. Jampangern W, Vongthoung K, Jittmittraphap A, Worapongpaiboon S, Limkittikul K, Chuansumrit A, Tarunotai U, Chongsa-Nguan M. Characterization of atypical lymphocytes and immunophenotypes of lymphocytes in patients with dengue virus infection. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 25:27-36, 2007.
42. Tkachuk D, Hirschmann JV. *Wintrobe Atlas Colorido de Hematologia*. Rio de Janeiro: Revinter. p. 135-8. 2010.