

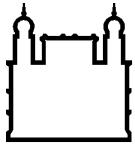
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATO DE PRODUTOS NATURAIS EM  
MODELOS DE INFECÇÃO *IN VITRO* PELOS ARBOVÍRUS DENGUE E  
CHIKUNGUNYA

RAQUEL CURTINHAS DE LIMA

Rio de Janeiro,  
Janeiro de 2020



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Raquel Curtinhas de Lima*

Atividade antiviral de extrato de produtos naturais em modelos de infecção *in vitro* pelos arbovírus dengue e chikungunya

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

**Orientador (es):** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elzinandes Leal de Azeredo

**RIO DE JANEIRO**

Janeiro de 2020

de Lima, Raquel Curtinhas .

Atividade antiviral de extrato de produtos naturais em modelos de infecção *in vitro* pelos arbovírus dengue e chikungunya / Raquel Curtinhas de Lima. - Rio de Janeiro, 2020.

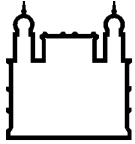
xx, 128 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientadora: Elzinandes Leal de Azeredo.

Bibliografia: f. 109-128

1. Uncaria tomentosa. 2. DENV. 3. CHIKV. 4. Antiviral. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: RAQUEL CURTINHAS DE LIMA**

**Atividade antiviral de extrato de produtos naturais em  
modelos de infecção *in vitro* pelos arbovírus dengue e chikungunya**

**ORIENTADOR (ES): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elzinandes Leal de Azeredo**

**Aprovada em: 09/01/2020**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr<sup>ª</sup>.** Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp - **Presidente** (FIOCRUZ/IOC)

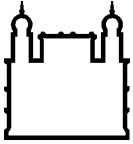
**Prof. Dr<sup>ª</sup>.** Carmen Penido Monteiro (FIOCRUZ/CDTS)

**Prof. Dr<sup>ª</sup>.** Kamilla Rodrigues Rogerio (CEDERJ)

**Prof. Dr<sup>ª</sup>.** Natália Fonseca do Rosário (UFF/RJ)

**Prof. Dr<sup>ª</sup>.** Débora Ferreira Barreto Vieira (FIOCRUZ/IOC)

Rio de Janeiro, 09 de janeiro de 2020.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Raquel Curtinhas de Lima**, sob orientação do Dr. Elzinandes Leal de Azeredo. Ao nono dia do mês de janeiro de dois mil e vinte, realizou-se às dez horas, na Sala 1 - Módulo de Expansão do Pavilhão Arthur Neiva /FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Atividade antiviral de extrato de produtos naturais em modelos de infecção *in vitro* pelos arbovirus dengue e chikungunya**", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Carmen Penido Monteiro - CDTS/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Kamilla Rodrigues Rogerio - CEDERJ/RJ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Natália Fonseca do Rosário – UFF/RJ e Dr<sup>a</sup>. Debora Ferreira Barreto Vieira – IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 09 de janeiro de 2020.

Dr<sup>a</sup>. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp (Presidente da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Carmen Penido Monteiro (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Kamilla Rodrigues Rogerio (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360  
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: [atendimento@ioc.fiocruz.br](mailto:atendimento@ioc.fiocruz.br) Site: [www.fiocruz.br/iocensino](http://www.fiocruz.br/iocensino)

Dedico esta dissertação aos meus pais José Eduardo e Cristiana, que sempre acreditaram no meu potencial e me apoiaram em todas as minhas decisões. Ao meu irmão Diego, de quem eu sempre quis seguir o exemplo, e despertou em mim o gosto pelo estudo.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Eduardo e Cristiana, que me ensinaram a importância da responsabilidade e do estudo, e acreditaram no meu potencial quando eu mesma duvidei. Obrigada por dedicar todos esses anos de suas vidas para me criar e educar com tanto amor, carinho e confiança. Espero poder retribuir tudo isso um dia;

Ao meu irmão Diego, que me aconselhou a continuar quando eu pensei em desistir. Quando criança, eu te observava estudando e pensava que queria ser igual a você. Hoje estou me tornando uma mestra e muito disso devo a você!

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Elzinandes Leal de Azeredo pelos ensinamentos, oportunidade e paciência. Você foi uma orientadora presente, mesmo passando por momentos difíceis, e sempre me passou calma quando eu estava com os nervos à flor da pele. Obrigada por me aceitar como aluna mesmo sem me conhecer.

À Dr<sup>a</sup> Priscila Nunes. Sem você eu não chegaria até aqui. Obrigada por estar sempre disponível para me ajudar, pelos ensinamentos sempre feitos com muita paciência e pelo ombro amigo para eu chorar nos momentos em que a ansiedade tomou conta.

À pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Lígia Marino Valente (UFRJ) pela parceria e concessão do extrato utilizado neste estudo.

Às Msc. Caroline Fernandes e Msc. Débora Familiar, minhas companheiras de mestrado que se tornaram amigas para a vida toda. A companhia de vocês torna a volta para Niterói uma das melhores horas do dia, independentemente do tamanho do engarrafamento na Avenida Brasil ou na ponte (ou nos dois).

Aos amigos do LIV: Msc. Jéssica Badolato, Msc. Iury Paiva, Msc. Helver Dias, Msc. Thiara Souza, Suellen Costa, Msc. Patrick Souza. Vocês tornaram os dias de trabalho mais felizes. Nossos almoços juntos, regados de muita conversa e risadas, sempre me deram ânimo para continuar o dia. Espero que tenhamos muito mais deles!

À Dr<sup>a</sup> Luzia Pinto por todo o carinho desde que entrei no LIV. Obrigada pelos conselhos, pelos abraços fortes nos momentos em que eu estava mais ansiosa e pelas contribuições para aprimoramento deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Monique Lima e Dr<sup>a</sup> Renata Maia pelos conselhos e pelas nossas conversas na b118.

À Dr<sup>a</sup> Flávia Barreto dos Santos, meu primeiro contato no LIV, que me recebeu tão carinhosamente e me encaminhou para a minha atual orientadora, tendo, portanto, papel fundamental no início desse trabalho.

À Priscila da Matta, minha amiga desde os tempos de UFF. Mesmo não nos vendo quase todos os dias, como ocorria na graduação, nossa amizade se mantém firme e forte. Obrigada por sempre me ouvir, seja nos momentos de felicidade, seja nos de desespero.

À Msc. Natália de Oliveira, meu primeiro contato na Fiocruz e hoje grande amiga. Você sempre foi um exemplo de profissional para mim. Serei eternamente grata pela oportunidade que você me deu, por tudo que você me ensinou, e também pelos conselhos e incentivo.

À FIOCRUZ, ao IOC e todos seus trabalhadores que contribuem com o funcionamento da instituição. Agradeço especialmente à Rita Gomes, sempre tão simpática, compreensiva e disposta a ajudar e tirar as (muitas) dúvidas que surgiram ao longo do mestrado, principalmente nesses momentos finais, e à Cleide Nascimento nossa querida técnica.

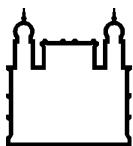
Aos doadores de sangue, que, com esse gesto tão bonito, salvaram vidas e ainda contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Laboratório de Hemoterapia da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela colaboração, reservando as bolsas de sangue sempre que solicitado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de mestrado e às outras agências de apoio financeiro ao projeto.



Quem acredita sempre alcança  
(Renato Russo)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATO DE PRODUTOS NATURAIS EM MODELOS DE INFECÇÃO *IN VITRO* PELOS ARBOVÍRUS DENGUE E CHIKUNGUNYA

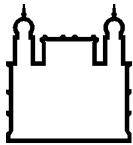
#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA.

Raquel Curtinhas de Lima

Os vírus dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV) são arbovírus de importância médica mundial. A dengue é uma doença febril aguda causada por qualquer um dos quatro sorotipos virais (DENV-1-4), cujas manifestações clínicas variam desde quadros assintomáticos até quadros clínicos graves e fatais. Na febre do chikungunya, a principal característica é o acometimento das articulações, com sintomas que podem persistir por anos. Ainda não existem medicamentos específicos para essas doenças, apesar de serem sérios problemas de saúde pública. A busca por terapias alternativas, como as plantas medicinais, apresenta-se viável e promissora, já que o uso destas plantas é baseado no conhecimento popular adquirido empiricamente. A espécie *Uncaria tomentosa* (Ut) é empregada pela medicina tradicional no tratamento de doenças inflamatórias e degenerativas, e infecções virais. Nosso objetivo foi investigar o efeito antiviral do extrato hidroalcoólico da casca da Ut em modelos de infecção *in vitro* por cepas brasileiras dos DENVs e CHIKV. Foi realizada a padronização do modelo de infecção *in vitro* utilizando linhagem contínua de hepatócitos humanos (HuH-7), células Vero e monócitos humanos purificados de doadores saudáveis. Diferentes ensaios foram aplicados para avaliação da infecção viral tais como a detecção intracelular do antígeno viral pela citometria de fluxo, dosagem da proteína NS1 do DENV e quantificação da carga viral (RT-qPCR) nos sobrenadantes das culturas infectadas pelo DENV e/ou CHIKV. Os resultados demonstraram que as diferentes células-alvos estudadas foram susceptíveis à infecção pelas cepas brasileiras dos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e CHIKV. Em relação ao DENV-1, a taxa de produção da proteína NS1 foi crescente ao longo de 72h, enquanto para os DENV-2 e DENV-3 o pico da infecção foi em 48h. O vírus CHIKV apresentou carga viral crescente durante a infecção nas células Vero, HuH-7 e monócitos, com pico do número de cópias de RNA em 72h de infecção. De acordo com o ensaio de MTT, a viabilidade das células HuH-7 não reduziu após o tratamento com o extrato nas concentrações testadas até 100 µg/mL. A análise dos resultados demonstrou que as concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL reduziram a carga viral e/ou o percentual de células infectadas frente à infecção pelo DENV-1 e DENV-2 nas células HuH-7 e/ou monócitos, sugerindo a atividade antiviral do extrato. O tratamento das células Vero infectadas pelo CHIKV na concentração de 100 µg/mL reduziu o efeito citopático e o número de cópias de RNA de CHIKV. Ademais, células HuH-7 infectadas pelo CHIKV e tratadas com 100 µg/mL do extrato, apresentaram redução no número de cópias do RNA viral presente no sobrenadante (70%). Além disso, monócitos humanos infectados pelo CHIKV e tratados com 100 µg/mL também apresentaram redução no número de cópias do RNA durante 48h (\*P=0,0310) e 72h (\*P=0,0391) de infecção e tratamento. Através da técnica de citometria de fluxo, observou-se que monócitos infectados e tratados com 50 µg/mL e 100 µg/mL apresentaram baixa frequência de células positivas para CHIKV, com redução de 49 e 41%, respectivamente, de células infectadas, sugerindo atividade antiviral do extrato de Ut. Nossos resultados indicaram atividade antiviral da Ut frente à infecção *in vitro* pelas as cepas brasileiras de DENV-1, DENV-2 e CHIKV, ressaltando a importância de estudos com produtos naturais nas arboviroses de importância médica.

Palavras-chave: *Uncaria tomentosa*, DENV, CHIKV, antiviral.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ANTIVIRAL ACTIVITY OF EXTRACT OF NATURAL PRODUCTS IN *IN VITRO* INFECTION MODELS BY DENGUE AND CHIKUNGUNYA ARBOVIRUS

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Raquel Curtinhas de Lima

Dengue (DENV) and chikungunya (CHIKV) viruses are arboviruses of worldwide medical importance. Dengue is an acute febrile illness caused by any of the four viral serotypes (DENV-1-4), whose clinical manifestations range from asymptomatic to severe and fatal clinical conditions. In chikungunya fever, the main feature is joint involvement, with symptoms that may persist for years. There are no specific drugs for these diseases yet, although they are serious public health problems. *Uncaria tomentosa* (Ut) is used in traditional medicine to treat inflammatory and degenerative diseases and viral infections. The aim of this study was to investigate the antiviral effect of the hydroalcoholic extract of Ut extracts *in vitro* infection models by Brazilian DENVs and CHIKV strains. Standardization of the *in vitro* infection model was performed using continuous human hepatocyte lineage (HuH-7), Vero cells and purified human monocytes from healthy donors. Different assays were applied to evaluate viral infection such as intracellular detection of viral antigen by flow cytometry, DENV NS1 protein dosage and quantification of viral load (RT-qPCR) in DENV and/or CHIKV infected supernatants respectively. The results showed that the different target cells studied were susceptible to infection by the Brazilian DENV-1, DENV-2, DENV-3 and CHIKV strains. In relation to DENV-1, the production rate of NS1 protein increased over 72h while for DENV-2 and DENV-3 the infection peaked at 48h. The CHIKV virus showed increasing viral load during infection in Vero, HuH-7 cells and monocytes, with peak RNA copy number within 72h of infection. According to the MTT assay, HuH-7 cell viability was not reduced after treatment with the extract at the tested concentrations up to 100 µg/mL. Analysis of the results demonstrated that 50 µg/mL and 100 µg/mL concentrations reduced viral load and/or percentage of infected cells against DENV-1 and DENV-2 infection in HuH-7 and/or monocytes suggesting antiviral activity. Treatment of CHIKV-infected Vero cells at a concentration of 100 µg/ml reduced the cytopathic effect and CHIKV RNA copy number. Furthermore, CHIKV-infected HuH-7 cells treated with 100 µg/mL showed a reduction in the copy number of viral RNA present in the supernatant (70%). In addition, CHIKV-infected human monocytes treated with 100 µg/mL also showed RNA copy numbers reduction during 48h (\*P= 0.0310) and 72h (\*P= 0.0391) of infection and treatment. Using the flow cytometry assay, we observed that infected and treated monocytes with 50 µg/ml and 100 µg/mL presented low frequency of CHIKV positive cells with 49 and 41% reduction, respectively, of infected cells suggesting antiviral activity of Ut extract. Our results indicated Ut antiviral activity against *in vitro* infection by the Brazilian DENV-1, DENV-2 and CHIKV strains, highlighting the importance of natural products studies in arboviruses of medical importance.

**Key Words:** *Uncaria tomentosa*, DENV, CHIKV, antiviral.

# ÍNDICE

	<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>vi</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
	<b>ÍNDICE.....</b>	<b>xi</b>
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xiv</b>
	<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>xvii</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
	<b>1.1 Arbovírus .....</b>	<b>21</b>
	<b>1.2 O vírus dengue .....</b>	<b>22</b>
	1.2.1 Histórico da dengue.....	22
	1.2.2 Epidemiologia da dengue no Brasil .....	24
	1.2.3 Características estruturais e replicação do DENV .....	25
	1.2.4 Espectro clínico da infecção por DENV .....	27
	1.2.5 Classificação dos casos de dengue.....	29
	1.2.6 Resposta imunológica e patogênese .....	31
	1.2.7 Tratamento .....	34
	<b>1.3 O vírus chikungunya .....</b>	<b>35</b>
	1.3.1 Histórico.....	35
	1.3.2 Epidemiologia no Brasil .....	37
	1.3.3 Características estruturais e replicação do CHIKV .....	39
	1.3.4 Espectro clínico da infecção por CHIKV .....	41
	1.3.5 Imunopatogênese e resposta imunológica .....	42
	1.3.6 Tratamento .....	45
	<b>1.4 Antivirais .....</b>	<b>47</b>
	<b>1.5 <i>Uncaria tomentosa</i> .....</b>	<b>48</b>
	<b>1.6 Justificativa.....</b>	<b>51</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>52</b>
	<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>52</b>
	<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
	<b>3.1 Materiais e reagentes .....</b>	<b>53</b>
	3.1.1 Meios de cultura .....	53

3.1.2	Reagentes .....	53
3.1.3	Soluções .....	54
3.1.4	Soluções para citometria de fluxo .....	54
<b>3.2</b>	<b>Desenho experimental .....</b>	<b>55</b>
<b>3.3</b>	<b>Cepas virais .....</b>	<b>57</b>
<b>3.4</b>	<b>Produção da massa viral .....</b>	<b>57</b>
3.4.1	Produção da massa viral de DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e CHIKV .....	57
3.4.2	Titulação viral.....	58
<b>3.5</b>	<b>Células.....</b>	<b>59</b>
3.5.1	Cultura de células Vero e HuH-7 .....	59
3.5.2	Monócitos do sangue periférico .....	60
<b>3.6</b>	<b>Preparo das amostras vegetais.....</b>	<b>60</b>
<b>3.7</b>	<b>Ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT ({brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}.....</b>	<b>61</b>
<b>3.8</b>	<b>Infecção e tratamento das células .....</b>	<b>62</b>
<b>3.9</b>	<b>Citometria de fluxo .....</b>	<b>62</b>
3.9.1	Marcação extracelular.....	62
3.9.2	Marcação intracelular.....	63
<b>3.10</b>	<b>Detecção semi-quantitativa da proteína NS1 de DENV .....</b>	<b>64</b>
<b>3.11</b>	<b>Extração de RNA .....</b>	<b>64</b>
<b>3.12</b>	<b>RT-qPCR.....</b>	<b>65</b>
<b>3.13</b>	<b>Análises estatísticas .....</b>	<b>65</b>
<b>3.14</b>	<b>Considerações éticas.....</b>	<b>66</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Produção da massa viral de DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e CHIKV em células Vero e titulação viral .....</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade do extrato de Ut em células HuH-7.....</b>	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>Dengue .....</b>	<b>69</b>
4.3.1	Linhagem de células HuH-7.....	69
4.3.2	Monócitos .....	78
<b>4.4</b>	<b>Chikungunya.....</b>	<b>83</b>
4.4.1	Padronização do modelo de infecção pelo CHIKV em células Vero .....	83

4.4.2	Padronização do modelo de infecção pelo CHIKV em células HuH-7 .....	85
4.4.3	Monócitos .....	87
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>109</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2017 e 2018. ....	25
<b>Figura 2:</b> Vírus dengue.....	26
<b>Figura 3:</b> Ciclo replicativo do DENV. ....	27
<b>Figura 4:</b> Classificação dos casos de dengue de acordo com os critérios propostos em 2009 pela OMS. ....	30
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática da teoria da interação multifatorial.....	34
<b>Figura 6:</b> Mapa da dinâmica espaço-temporal da disseminação global do CHIKV, baseado em reconstruções filogenéticas.. ....	37
<b>Figura 7:</b> Distribuição de incidência de casos prováveis de chikungunya por Região de Saúde, até a semana epidemiológica 36 .....	38
<b>Figura 8:</b> Ciclo de replicação do CHIKV em células de mamíferos.. ....	40
<b>Figura 9:</b> Espectro clínico da chikungunya .....	41
<b>Figura 10:</b> Infecção e disseminação sistêmica do CHIKV. ....	43
<b>Figura 11:</b> <i>U. tomentosa</i> ou unha-de-gato.....	49
<b>Figura 12:</b> Distribuição da Ut na América Latina. ....	49
<b>Figura 13:</b> Desenho experimental para o DENV. ....	56
<b>Figura 14:</b> Desenho experimental para o CHIKV. ....	56
<b>Figura 15:</b> Viabilidade celular (%) da linhagem de células HuH-7 tratada com Ut, após 24h (a) e 72h (b).....	68
<b>Figura 16:</b> Viabilidade celular (%) da linhagem de células Vero tratada com Ut (72h). ....	69
<b>Figura 17:</b> Padronização da infecção <i>in vitro</i> de células HuH-7 com cepas brasileiras de DENV-1 (a), DENV-2 (b), DENV-3 (c) e DENV-4 (d).....	70
<b>Figura 18:</b> Padronização da infecção das células HuH-7 com a cepa brasileira de DENV-4.....	71
<b>Figura 19:</b> Cinética da infecção de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em células HuH-7 durante 24, 48 e 72h. ....	72
<b>Figura 20:</b> Estratégia de análise por citometria de fluxo, das células HuH-7 quanto à atividade antiviral do extrato de Ut. ....	74
<b>Figura 21:</b> Frequência de infecção (a,b) e viabilidade (c,d) das células HuH-7.....	75

<b>Figura 22:</b> Detecção da proteína não estrutural NS1 nos sobrenadantes de cultura de HuH-7, 24h, 48h e 72h após infecção com DENV-1 e tratamento com concentrações não citotóxicas de Ut.....	76
<b>Figura 23:</b> Detecção da proteína não estrutural NS1 nos sobrenadantes de cultura de HuH-7, 24h, 48h e 72h após infecção com DENV-2 e tratamento com concentrações não citotóxicas de Ut.....	77
<b>Figura 24:</b> Detecção da proteína não estrutural NS1 nos sobrenadantes de cultura de HuH-7, 24h, 48h e 72h após infecção com DENV-1 e tratamento com concentrações não citotóxicas de Ut.....	77
<b>Figura 25:</b> Estratégia de análise por citometria de fluxo de monócitos, quanto à citotoxicidade do extrato de Ut. ....	79
<b>Figura 26:</b> Estratégia de análise por citometria de fluxo de monócitos, quanto a infecção por DENV-2.....	80
<b>Figura 27:</b> Análise de monócitos infectados por DENV-2 quanto à atividade antiviral de Ut.....	80
<b>Figura 28:</b> Dosagem da proteína não estrutural NS1 nos sobrenadantes de monócitos humanos, 24h, 48h e 72h após infecção com DENV-2, e em tratamento com concentrações não citotóxicas do extrato de Ut.. ....	81
<b>Figura 29:</b> Detecção e quantificação do RNA viral nos sobrenadantes de cultura de monócitos humanos, 24h, 48h e 72h de infecção pelo DENV-2, e em tratamento com 50 e 100 µg/mL do extrato de Ut.....	82
<b>Figura 30:</b> Viabilidade (%) das células Vero após 72h de infecção pelo CHIKV, utilizando-se diferentes MOI.....	83
<b>Figura 31:</b> Cinética de 24h, 48h e 72h da infecção em células Vero com CHIKV, aferida através da quantificação do RNA viral em sobrenadante de cultura. ....	84
<b>Figura 32:</b> Detecção e quantificação do RNA viral nos sobrenadantes de cultura de células Vero, infectadas pelo CHIKV e tratadas com 50 e 100 µg/mL do extrato de Ut.....	84
<b>Figura 33:</b> Micrografia óptica do ECP em células Vero após 48h de infecção pelo CHIKV. ....	85
<b>Figura 34:</b> Padronização da infecção das células HuH-7 pelo CHIKV. ....	86
<b>Figura 35:</b> Detecção e quantificação do RNA viral nos sobrenadantes de cultura de células HuH-7, infectadas pelo CHIKV e tratadas com 10 e 100 µg/mL do extrato de Ut.....	87



<b>Figura 36:</b> Estratégia de análise por citometria de fluxo para a detecção da infecção pelo CHIKV, com MOI 0,1, em monócitos.....	89
<b>Figura 37:</b> Estratégia de análise por citometria de fluxo para a detecção da infecção pelo CHIKV, com MOI 0,01, em monócitos.....	89
<b>Figura 38:</b> Análise de monócitos infectados por CHIKV quanto à atividade antiviral de Ut. ....	90
<b>Figura 39:</b> Cinética da infecção de células HuH-7 por CHIKV, avaliada através da RT-qPCR quantitativa.. ....	90
<b>Figura 40:</b> Detecção e quantificação do RNA viral nos sobrenadantes de cultura de monócitos, infectados pelo CHIKV, e tratados com 50 e 100 µg/mL do extrato de Ut. ....	92

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Cepas dos quatro sorotipos de DENV e do CHIKV, identificadas por RT-qPCR em tempo real antitativa.....	57
<b>Quadro 2:</b> Titulação dos quatro sorotipos de DENV e do CHIKV, realizada através da técnica de RT-qPCR e do método de <i>plaque</i> .....	67

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C = antes de Cristo

ADE = facilitação dependente de anticorpo (do inglês *antibody dependent enhancement*)

AIE = anti-inflamatório esteroidal

AINE = anti-inflamatório não esteroidal

BSA = proteína albumina do soro bovino (do inglês *bovine serum albumin*)

EtOH = etanol

C6/36 = células de glândula salivar de mosquito da espécie *Aedes albopictus*

CB = controle branco

CCL = quimiocina de motivo C-C ligante (do inglês *chemokine C-C motif ligand*)

CHIKV = vírus chikungunya

CN = controle negativo

CO<sub>2</sub> = dióxido de carbono

Cols. = colaboradores

CP = controle positivo

CXCL = quimiocina ligante com motivo C-X-C (do inglês *chemokine C-X-C motif ligand*)

d.C = depois de Cristo

DC-SIGN = ligante da molécula de adesão intracelular não integrina específica de célula dendrítica

DENV = vírus dengue

DENV-1 = vírus dengue sorotipo 1

DENV-2 = vírus dengue sorotipo 2

DENV-3 = vírus dengue sorotipo 3

DENV-4 = vírus dengue sorotipo 4

DH = dengue hemorrágica

DMARD = drogas antirreumáticas modificadoras da doença (do inglês *disease modifying antirheumatic drugs*)

DMSO = dimetilsulfoxido

D.O. = densidade óptica

ECP = efeito citopático

ECSA = Leste-Centro-Sul Africano (do inglês *East-Central-South African*)

ELISA = método imunoenzimático (do inglês *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*)

EUA = Estados Unidos das Américas

FACS = classificação das células ativadas por fluorescência (do inglês *Fluorescence-activated cell sorting*)

FcγR = receptor Fc γ (do inglês *Fc γ receptor*)

FD = febre do dengue

FHD = febre hemorrágica do dengue

FIOCRUZ = Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA = Fundação Nacional de Saúde

H<sub>2</sub>O = fórmula química da água

hab. = habitantes

HMEC = célula de microvasculatura endotelial humana (do inglês *human microvascular endothelial cells*)

HCV = vírus da hepatite C

HuH-7 = célula de hepatocarcinoma humano-7

ICAM-1 = molécula de adesão intracelular I

IFN = Interferon

IL = interleucina

IOL = linhagem do oceano Índico (do inglês *Indian Ocean Lineage*)

LIV = Laboratório de Imunologia Viral

MCP-1 = proteína quimiotática de monócitos – 1 (do inglês *Monocyte chemoattractant protein-1*)

MA = Massachussets

MIG = monocina induzida por interferon gama (do inglês *Monokine induced by gamma interferon*)

mL = mililitro

MMP2 = metaloproteinase 2

MS = Ministério da Saúde

MTT = 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NO = Óxido nítrico

nm = nanômetros

Ns1 = Proteína viral não estrutural 1

OMS = Organização Mundial de Saúde

PFU = unidade formadora de plaque (do inglês *plaque forming unit*)

PAHO = Organização Panamericana de Saúde (do inglês *Pan-American Health Organization*)

ORF = Fase aberta de leitura (do inglês *Open reading frame*)

PBMC = Células mononucleares periféricas (do inglês *Peripheral blood mononuclear cells*)

PBS = tampão salina fosfato

PFA = Paraformaldeído

prM = precursor da proteína M

Proteína C = Proteína de capsídeo

Proteína E = Proteína de envelope

Proteína M = Proteína de membrana

q.s.p. = quantidade suficiente para

RANTES = proteína regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (do inglês *regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*)

RNA = Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)

RPMI = *Instituto Memorial Roswell Park* (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*)

RT-qPCR = reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (do inglês *reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*)

SCH = síndrome do choque hemorrágico

TLR = receptores do tipo toll (do inglês *toll like receptor*)

SVS = Secretaria de Vigilância em Saúde

UFRJ = Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ut = *Uncaria tomentosa*

WHO = Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization*)

YFV = vírus da febre amarela

ZIKV = vírus zika

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Arbovírus

O termo arbovírus (*arthropod-born virus*) começou a ser utilizado em 1942 para designar um grupo de vírus capazes de se replicar em artrópodes e serem transmitidos por eles a hospedeiros vertebrados. Conforme foi sendo descoberto que os vírus com essas propriedades pertenciam a grupos taxonômicos distintos, o Subcomitê de Nomenclatura Viral, em 1963, cunhou o termo arbovírus para abrangê-los (World Health Organization 1985).

Atualmente, os arbovírus constituem um grupo ecológico de vírus dotados da capacidade de serem transmitidos de um vertebrado infectado para outro vertebrado suscetível através da picada de artrópodes hematófagos, ou seja, de forma biológica e não mecânica. Pode haver a transmissão vertical de uma fêmea infectada para a prole, tanto machos quanto fêmeas, ou, a mais conhecida, transmissão horizontal através da picada de artrópodes infectados e infectantes. Após serem ingeridos pelo artrópode durante o repasto sanguíneo em um vertebrado virêmico, esses vírus se replicam nos tecidos do hospedeiro invertebrado, inclusive em suas glândulas salivares, e são assim transmitidos a outros vertebrados durante o repasto sanguíneo (Pauvolid-corrêa 2012).

O Catálogo Internacional de Arbovírus (Centers for Disease Control and Prevention 2016) tem atualmente 537 vírus descritos, dos quais as famílias de importância médica, por serem capazes de infectar humanos e outros seres homeotérmicos, são: *Flaviviridae*, *Togaviridae* e *Bunyaviridae*. Essas famílias têm em comum o genoma constituído de RNA com polaridade positiva, o que as torna mais suscetíveis a mutações, já que sua DNA polimerase RNA dependente não apresenta atividade exonuclease (Schrank 2014).

O ciclo dos arbovírus costuma ser silencioso, acontece na natureza até que ocorra alguma alteração ambiental ou que seres humanos se tornem hospedeiros acidentais ao se introduzirem em seu habitat. As infecções pelos arbovírus em geral podem apresentar três formas clínicas diferentes: febre sistêmica, febre hemorrágica ou meningoencefalite, e o mesmo vírus pode causar manifestações diferentes em cada hospedeiro (Gubler 2001).

No Brasil, os arbovírus circulantes mais conhecidos são o vírus dengue (DENV), o vírus da febre amarela (YF) e o vírus zika (ZIKV), pertencentes à família *Flaviviridae*, e o vírus chikungunya (CHIKV) da família *Togaviridae*.

## 1.2 O vírus dengue

### 1.2.1 Histórico da dengue

Os relatos mais antigos de uma doença com sintomas semelhantes aos da dengue datam de 265-420 dC, durante a dinastia Chin, e foram registrados em uma enciclopédia de medicina. Já nesta época, acreditava-se haver relação da doença com insetos voadores associados à água, e por essa razão sendo chamada de “veneno da água” (Gubler 1998; Nobuchi 1979).

O tráfico de escravos entre a África Ocidental e as Américas foi responsável pela introdução e distribuição geográfica do mosquito *Aedes aegypti* no Novo Mundo, e conseqüentemente a dispersão do vírus. Os primeiros registros de dengue nas Américas foram nas ilhas de Martinica e Guadalupe em 1635 e no Panamá, em 1699, mas a escassez de informações sobre a clínica torna difícil afirmar que o vírus dengue foi causador dessa epidemia. Mais adiante, em 1780, houve uma epidemia na Filadélfia, nos Estados Unidos da América (EUA), cujas características eram muito semelhantes àsquelas observadas para dengue (Rush 1979).

Durante o século XIX as epidemias se concentravam nas cidades portuárias das Américas e do Caribe (Guzman & Kouri 2003; Dick et al. 2012). Neste período, destacaram-se surtos pontuais, como o ocorrido no Peru, de uma doença com sintomas semelhantes aos de dengue que atingiu aproximadamente 50.000 pessoas (Gubler 1998; Guzman & Kouri 2003). Em Cuba, em 1828, a doença foi chamada pela primeira vez de “dunga” e, mais tarde então, de dengue (Espinoza 2008). Posteriormente, em 1873, mais de 40.000 pessoas foram afetadas em Nova Orleans, nos EUA, e a epidemia se espalhou por outras cidades próximas nos anos seguintes (Dick et al. 2012).

No começo do século XX a doença semelhante à dengue já havia se espalhado por todas as Américas, chegando a regiões mais ao norte dos EUA e mais ao sul da América do Sul, como o Chile e Argentina. Em 1934, 10% da

população de Miami foi afetada por uma epidemia que se espalhou pela Flórida e Georgia (Salles et al. 2018).

A pesquisa sobre a dengue obteve um grande avanço após o isolamento do vírus DENV-1 e DENV-2 (Sabin & Schlesinger 1945; Hotta 1952), o que possibilitou também o desenvolvimento de testes diagnósticos. Os registros anteriores se baseavam em características clínicas e epidemiológicas, o que torna difícil distinguir infecção por outros arbovírus como chikungunya, febre amarela, mayaro e zika (Dick et al. 2012). DENV-3 e DENV-4 foram isolados em 1960, por um grupo que estudava a etiologia das epidemias ocorridas na Tailândia e nas Filipinas (Hammon et al. 1960).

Em 1906, foi sugerida a participação do mosquito *Ae. aegypti* na transmissão da dengue, o que foi comprovado em 1918. Simmons descreveu em 1931 que *Ae. albopictus*, comum de regiões temperadas, seria outro possível vetor da doença (Gubler 1997; Nunes 2018). O apontamento do mosquito como vetor não só da dengue mas também da febre amarela, que na época já havia acometido Cuba e o Brasil, fez com que a Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO) aprovasse em 1947 o Plano de Erradicação Continental do *Ae. aegypti*. Como resultado, em 1962, 18 países e algumas ilhas caribenhas erradicaram o mosquito (PAHO 1997). Todavia, Cuba, EUA, Venezuela e várias ilhas do Caribe não atingiram o objetivo de erradicação e nos anos seguintes, a deterioração do plano de controle somada ao grande crescimento urbano, resultaram na reintrodução e expansão geográfica do mosquito, e conseqüentemente, do vírus (Dick et al. 2012).

No Brasil a circulação do vírus dengue só foi comprovada em 1982, quando foram isolados DENV-1 e DENV-4 em Roraima (RR). Novas ocorrências foram registradas apenas quatro anos depois, em 1986, envolvendo o sorotipo 1, desta vez no Rio de Janeiro, com casos fatais confirmados em laboratório (Schatzmayr et al. 1986; Nogueira et al. 1990). Juntamente com a cocirculação dos vírus foram registradas epidemias, com ocorrência inclusive do que foi classificado na época como dengue hemorrágica (DH), tornando necessária a notificação dos casos de dengue hemorrágica e de óbitos pela doença (Cunha & Nogueira 2013). Exatos quatro anos depois, no final de 1990, o DENV-2 foi detectado pela primeira vez no país, na região metropolitana do Rio de Janeiro (Nogueira et al. 1990).

Em 2001 foi feito o isolamento do DENV-3, também no estado do Rio de Janeiro, e já em 2002 ocorreu a maior epidemia de dengue já vista até então no



estado, envolvendo DENV-3, o qual passou a cocircular com DENV-1 e DENV-2 em outros estados (Nogueira et al. 2005).

Em 2010, DENV-4 foi isolado novamente em Boa Vista (RR), após 30 anos sem registro de sua ocorrência no país. No ano seguinte, em março de 2011, o vírus já era isolado no município de Niterói, no Rio de Janeiro (Nogueira & Alf 2011).

### **1.2.2 Epidemiologia da dengue no Brasil**

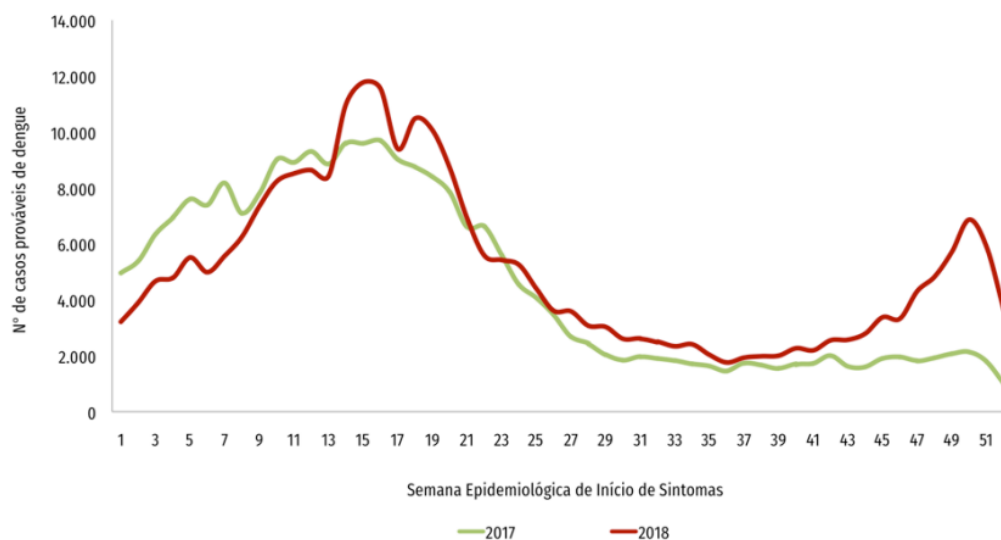
No Brasil ocorrem a emergência e re-emergência dos sorotipos de dengue desde sua reinserção no país, na década de 80. Entre 1981-1982, no primeiro registro do vírus em território nacional após a erradicação do vetor *Ae. aegypti*, aproximadamente 7.000 casos foram registrados, restritos à Boa Vista (RR) e causados pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4 (Osana 1983). Em 1986, após a inserção do DENV-1 no Rio de Janeiro e dispersão para outros estados, o número de casos prováveis aumentou em mais de 100 vezes, chegando 175.608 (FUNASA 2002).

Entre 1990 e 1998, a cocirculação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2 causou grandes epidemias, inclusive a ocorrência dos primeiros casos da síndrome do choque do hemorrágico (SCH) (Nogueira et al. 1990). Nesse período foram registrados mais de 777 mil casos suspeitos de dengue (FUNASA 2002).

A cocirculação dos sorotipos 1 e 2 se manteve até a detecção do DENV-3, inicialmente no Rio de Janeiro, em 2000. Dois anos depois, ocorreu a mais grave epidemia já vivenciada no país, na qual os números de dengue grave (1.831) e de óbitos (91) foram maiores do que os registrados entre 1986 e 2001 em todo território brasileiro (1.621 e 76, respectivamente) (Nogueira et al. 2005).

Em 2015, foram registrados 1.688.688 casos suspeitos de dengue no país, com as maiores incidências ocorrendo nas regiões Centro-Oeste e Sudeste (1.304,6 e 1.146,1 casos/100 mil habitantes, respectivamente). O alto número de casos suspeitos se manteve no ano seguinte, chegando a 1.500.535 em 2016, com 642 óbitos confirmados e incidência de 733,4 casos/100 mil hab. (SVS/MS 2017a). Em 2017, houve uma queda, sendo registrados 239.389 casos prováveis de dengue no país com as regiões Nordeste e Centro-Oeste apresentando a maior taxa de incidência (502,7 casos/100 mil hab. e 151,8 casos/100 mil hab., respectivamente).

O ano de 2018 manteve um perfil semelhante ao do ano anterior (Figura 1), registrando 265.934 casos prováveis de dengue no país, com incidência de 127,5 casos/100 mil hab., sendo a região Centro-Oeste a mais afetada (SVS/MS 2019a).



**Figura 1:** Casos prováveis de dengue, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2017 e 2018. (Fonte: SVS/MS 2018).

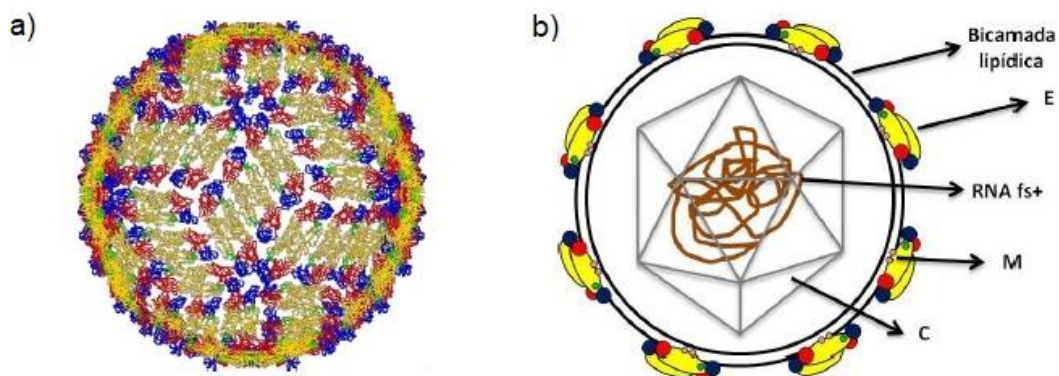
Até a 36ª semana epidemiológica de 2019 foram registrados 1.455.898 casos suspeitos de dengue, 617 óbitos confirmados da doença. Com excessão do Nordeste, onde circula mais o DENV-1, o sorotipo predominante no país é o DENV-2 (68,2%). Em São Paulo já foram detectados os quatro sorotipos (SVS/MS 2019b).

### 1.2.3 Características estruturais e replicação do DENV

O DENV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Possui quatro sorotipos relacionados, mas antígenicamente distintos (DENV-1,-2,-3,-4) (Calisher et al. 1989) e todos podem causar doença grave e fatal em humanos (Gubler 2006).

A partícula viral é esférica, envelopada, com nucleocapsídeo de simetria icosaédrica e 50 nm de diâmetro (Figura 2). O material genético é composto por uma fita de RNA de polaridade positiva que codifica proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais consistem na proteína de capsídeo (C), precursor/proteína de membrana (prM/M) e proteína de envelope (E). A partícula é envolta por uma bicamada lipídica, na qual são inseridas 180 cópias das proteínas E e M, e dentro dela encontram-se o nucleocapsídeo formado por uma cópia de RNA envolto por repetições da proteína de capsídeo (Byk & Gamarnik 2016). As proteínas não estruturais são NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, as quais

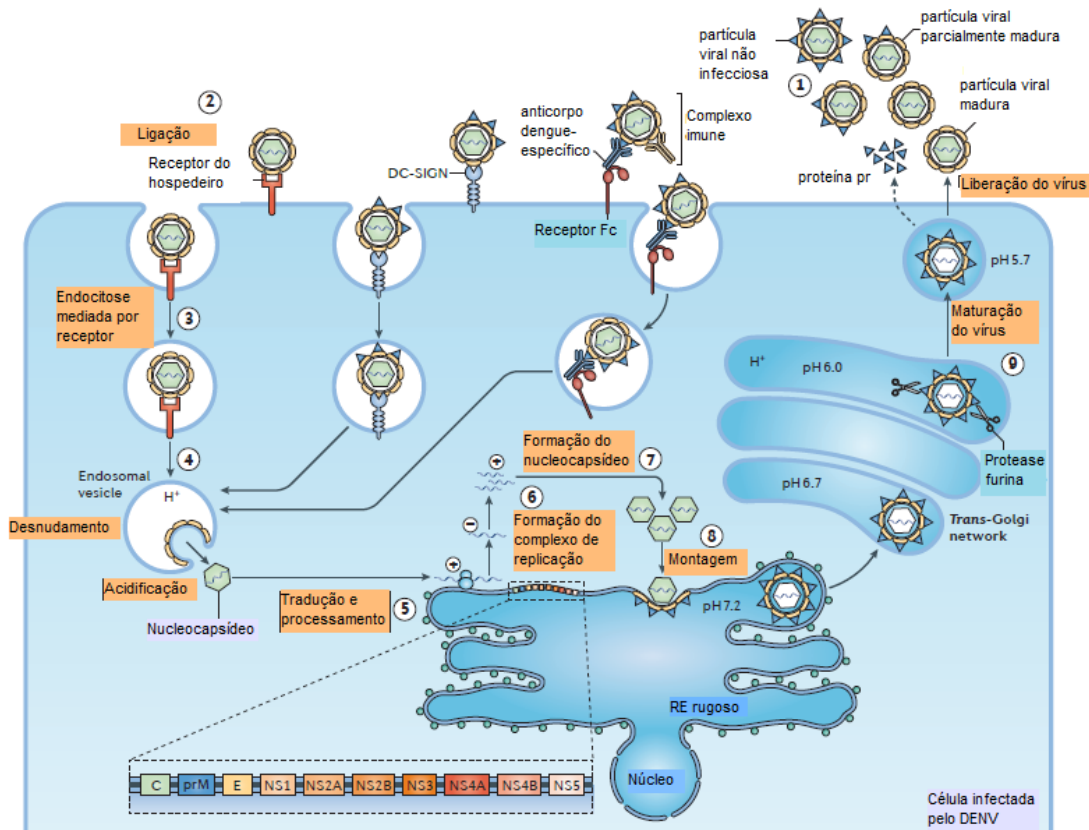
participam da replicação e também tornam o meio propício para tal evento (Guzman et al. 2016; Vasilakis et al. 2012; Kuhn et al. 2014). A proteína NS1 é também secretada pelas células infectadas, podendo ser detectada no soro desde um dia antes e até 5 dias após o início dos sintomas, sendo por isso usada para diagnóstico laboratorial no início da infecção (Shu et al. 2004; Bisordi et al. 2011).



**Figura 2:** Vírus dengue. **(a)** Partícula viral madura (Fonte: Kuhn et al., 2014) **(b)** Esquema representativo das estruturas da partícula viral (C = capsídeo icosaédrico, M = proteína de membrana após maturação da partícula viral, RNAfs+ = RNA fita simples polaridade positiva e E = proteína do envelope) (Fonte: Nogueira, 2018).

O ciclo replicativo do DENV se inicia com a interação do domínio III da proteína E da partícula viral madura com receptores celulares. Ainda não se conhece o receptor específico na célula alvo mas já foi demonstrada a interação do DENV com DC-SIGN, receptor de manose, CLEC5A, TIM-1 e TIM-4 (Perera-Lecoin et al. 2013). Essa interação leva à endocitose mediada por clatrina. Após a internalização ocorre a acidificação do endossomo, que causa mudanças conformacionais na proteína E, a qual se torna um trímero, permitindo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira. No citoplasma, o capsídeo se dissocia e o RNA viral livre é traduzido no retículo endoplasmático rugoso. A tradução gera uma poliproteína que é clivada por proteases da própria célula hospedeira, formando o complexo de replicação. O RNA das novas partículas virais é sintetizado a partir da transcrição de uma fita RNA antissenso, e é envolvido pelas proteínas de capsídeo, formando o nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo é internalizado pelo retículo endoplasmático rugoso, onde recebe as proteínas E e prM, sendo então transportado para fora da célula pelo complexo de Golgi. Ainda dentro desta organela, o pH ácido expõe as regiões de clivagem, o que permite às furinas a clivagem da proteína em pr e M, sendo a primeira mantida próxima à

partícula viral até a liberação dela fora da célula (Screaton et al. 2015). Um esquema do ciclo replicativo do DENV pode ser visto na Figura 3. Os vírus são considerados maduros e infectantes quando estão desprovidos da proteína pr.



**Figura 3:** Ciclo replicativo do DENV. A partícula viral madura (1) se liga ao receptor presente na membrana ou a anticorpos via receptor Fc (2) e entra na célula alvo por endocitose (3). O desnudamento do vírus promove a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (4), onde ele é desintegrado e o RNA é traduzido em uma poliproteína (5). Com a formação do complexo de replicação (6), inicia-se então a síntese da fita antissenso para replicação do RNA viral e das proteínas virais. O RNA (+) é envolvido pelas proteínas de capsídeo (7). A partícula viral imatura é montada no retículo endoplasmático rugoso (8), transportada para o complexo de Golgi, e enviada para fora da célula. Durante esse transporte o vírus atinge sua forma madura (9), com clivagem da proteína pr. (Adaptado de Screaton et al. 2015)

#### 1.2.4 Espectro clínico da infecção por DENV

A maioria das infecções pelo DENV são assintomáticas ou causam uma doença autolimitante que se estende de 4 a 8 dias com sintomas inespecíficos, como mialgia, febre e dor de cabeça. Entretanto, uma pequena parcela de indivíduos infectados pode desenvolver formas mais graves, com comprometimento de órgãos como fígado e coração ou hemorragias intensas. O período de incubação pode variar de 2 até 15 dias, mas costuma ser de 5 a 7 dias (Cunha & Nogueira 2013;

Brasil/MS 2016). Nos casos sintomáticos, podem ocorrer 3 fases clínicas: febril, crítica e recuperação

A dengue manifesta-se primeiramente como uma febre alta de início súbito (39 a 40°C) que se estende por 5 a 7 dias, a qual caracteriza a fase febril da doença. Simultaneamente ocorrem também cefaleia, mialgia, artralgia e dor retroorbital. Nessa fase pode ocorrer também manifestações gastrointestinais, como enjojo, náusea, vômitos e diarreia, que podem ser diferenciadas de gastroenterites devido ao aspecto pastoso das fezes, e às evacuações ocorrerem 3 a 4 vezes no dia (Brasil/MS 2016).

Nas primeiras 24 horas de febre ou no período de defervescência podem aparecer exantema maculopapular ou morbiliforme na face, planta dos pés, tronco e palma das mãos. Podem haver também manifestações hemorrágicas leves como sangramentos no nariz e gengiva (Cunha & Nogueira 2013). Não é possível distinguir os casos graves dos não graves nessa fase, por isso é necessário o acompanhamento do paciente (Brasil/MS 2016).

Em até 90% dos casos, após o 4-6º dia de doença, a febre cessa e o quadro evolui para cura. Entretanto, uma parcela evolui para a fase crítica da dengue, na qual ocorrem sinais de alarme que indicam a possibilidade da ocorrência das formas graves da doença e determinam a necessidade de se adotar medidas diferenciadas de acompanhamento e prevenção de complicações (Brasil/MS 2016).

Segundo o Manejo Clínico da Dengue, publicado em 2016 pelo Ministério da Saúde, entre os sintomas considerados sinais de alerta na dengue estão: dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos (ascite, derrame pleural e derrame pericárdico), sangramento de mucosa, letargia e/ou irritabilidade e aumento progressivo do hematócrito. A maioria destes sinais ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular. A reidratação intravenosa pode reverter os sinais de alarme mas, ainda assim, há pacientes que evoluem para as formas mais graves, com comprometimento de órgãos como pulmões, rins, coração e fígado, podendo vir a óbito (World Health Organization 2009; Brasil/MS 2016).

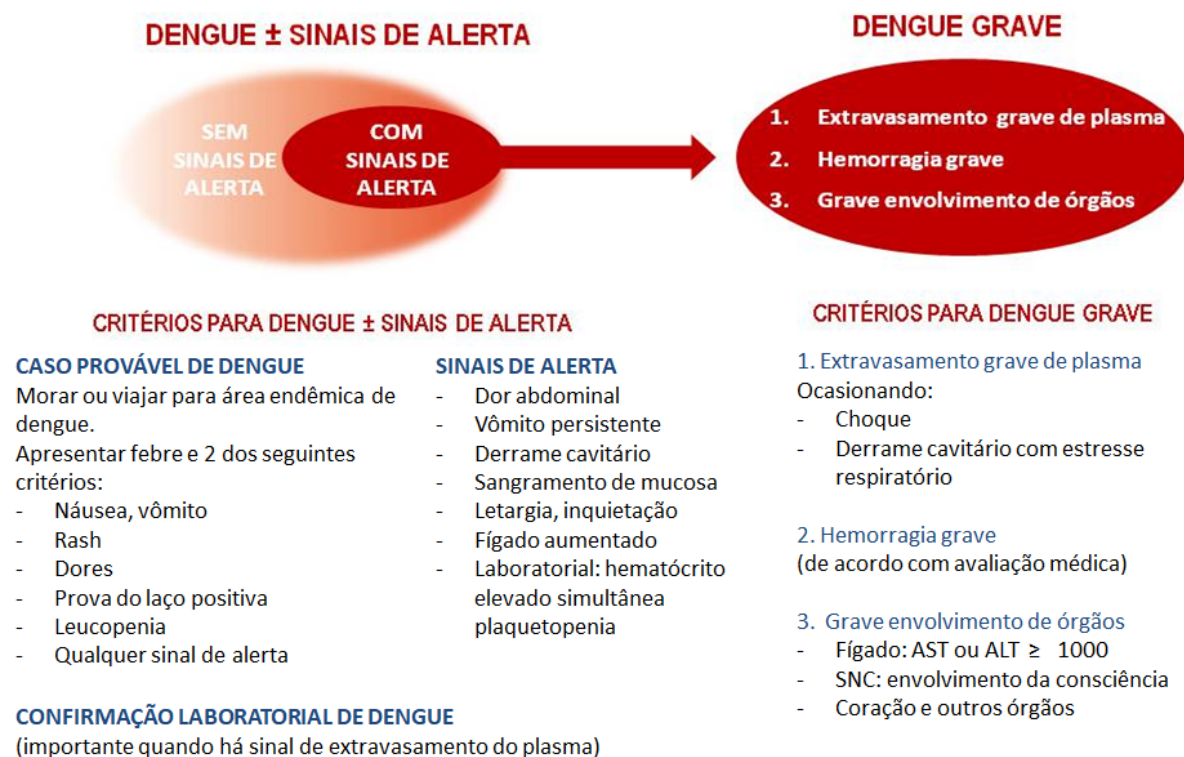
Após a fase crítica ocorre a reabsorção gradual do conteúdo extravasado, acompanhada da melhora clínica. A fluidoterapia excessiva nessa fase, ou ainda na fase crítica, pode causar edema pulmonar ou insuficiência cardíaca, sendo, portanto, necessária atenção durante a reidratação intravenosa. O hematócrito se estabiliza, mas a normalização da contagem de plaquetas é mais tardia. Alguns pacientes

podem apresentar um *rash* cutâneo acompanhado ou não de prurido generalizado nesse momento (Brasil/MS 2016).

### **1.2.5 Classificação dos casos de dengue**

A expansão do DENV pelo mundo e a maior ocorrência de casos graves e fatais levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a criar e publicar, em 1986, uma classificação da doença (World Health Organization 1986), baseada principalmente em estudos de surtos de dengue que ocorreram na década de 60 no Sudeste Asiático, atingindo principalmente crianças (Cohen & Halstead 1964; Nimmannitya et al. 1969; Pongpanich & Kumponpant 1973; Nimmannitya 1987). Nesta classificação, os casos de dengue eram considerados como febre indiferenciada, febre da dengue clássica (com ou sem manifestações hemorrágicas) e dengue hemorrágica ou febre hemorrágica da dengue. Além disso, a dengue hemorrágica era dividida em quatro diferentes graus, dos quais o III e IV eram classificados como síndrome do choque hemorrágico da dengue (SCH). Muitas críticas foram levantadas para esta classificação devido à dificuldade de aplicação e por não abranger todas os possíveis quadros da doença, como comprometimento hepático ou neurológico, por exemplo (Srikiatkachorn et al. 2011).

Em 2009, a OMS propôs uma nova classificação da doença, baseada em um estudo multicêntrico realizado no Sudeste Asiático e na América Latina. Nessa nova classificação os casos de dengue são definidos como: dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta e dengue grave (Figura 4). A nova classificação foi adotada pelo Brasil em 2014.



**Figura 4:** Classificação dos casos de dengue de acordo com os critérios propostos em 2009 pela OMS (2009).

Considera-se um caso provável de dengue aquele que ocorre em residentes ou visitantes de áreas endêmicas, que apresentam febre e 2 dos seguintes sintomas: náusea, vômito, rash, dores, prova do laço positiva, leucopenia ou um dos sinais de alerta (Figura 4). Os sinais de alerta são: dor abdominal, vômito persistente, derrame cavitário, sangramento de mucosas, letargia e/ou inquietação, hepatomegalia. É requerido exame laboratorial para quantificação do hematócrito e das plaquetas e os pacientes com sinais de alerta devem ficar sob observação podendo haver alguma intervenção médica. É considerada dengue grave os casos com extravasamento de plasma que ocasiona choque hemorrágico, derrame cavitário, hemorragias graves e acometimento de órgãos como fígado, coração e do sistema nervoso central (World Health Organization 2009).

A nova classificação se mostrou mais sensível para detectar os casos graves da doença (de Cavalcanti et al. 2014). Entretanto, ao incluir sintomas inespecíficos como vômitos e dor abdominal como sinais de alarme, é possível que haja sobrecarga do sistema de saúde de países mais pobres, onde a dengue é endêmica, já que casos com sinais de alerta demandam acompanhamento médico (Kalayanarooj et al. 1999; Srikiatkachorn et al. 2011). Estes sintomas inespecíficos

tornam necessários também testes laboratoriais para o correto diagnóstico da dengue.

### **1.2.6 Resposta imunológica e patogênese**

O DENV é inoculado na derme ou epiderme durante o repasto sanguíneo de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Aedes*. Posteriormente, o vírus infecta macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans presentes na região (Johnston et al. 2000). A capacidade de migração dessas células para os linfonodos e de disparar o recrutamento de monócitos e macrófagos favorece a infecção, uma vez que estes são altamente suscetíveis ao vírus. A infecção se dissemina através do sistema linfático, comprometendo células monocíticas como as de Kupffer e células dendríticas mieloides (Marovich et al. 2001; Guzman et al. 2016). Pode ocorrer também a inoculação direta nos vasos sanguíneos (Screaton et al. 2015).

A determinação da susceptibilidade de células ao DENV deve ser feita através da detecção não apenas da internalização mas também da replicação viral, como detecção do RNA antissenso ou das proteínas não estruturais, que são produzidos durante o ciclo replicativo do DENV (Guzman et al. 2016). Utilizando esses marcadores, foi demonstrado que macrófagos do fígado, baço, pele e timo (Aye et al. 2014; Balsitis et al. 2009), assim como monócitos do sangue periférico (Durbin et al. 2008) e células dendríticas imaturas (Wu et al. 2000) são alvos do DENV. Hepatócitos também são infectados, resultando em sua apoptose ou necrose (Couvelard et al. 1999). Quanto aos modelos *in vitro*, as linhagens epiteliais Vero (rim de *Cercopithecus aethiops*), LLC-MK2 (rim de *Macaca mulatta*) e HeLa (cervix humano), os fibroblastos BHK (rim de filhote de hamster), HuH-7 e Hep-G2 (hepatócitos humano), são as mais utilizadas para diagnóstico e estudos da interação vírus-célula hospedeira (Simpson & O'sullivan 1968; Matsumura et al. 1971; Karabatsos & Buckley 1967; Robert et al. 1983).

A primeira linha de defesa contra infecções por DENV, assim como em outros vírus, é a produção de interferon (IFN) tanto do tipo I quanto do tipo II. A ligação do interferon ao seu receptor (IFNR) ativa vias dependentes ou não da proteína JAK/STAT-1, que culminam na produção de mais de 100 proteínas antivirais efetoras (Samuel 1981). No contexto dos componentes da imunidade inata, a ativação de células NK também é importante no controle da infecção (Azeredo et al. 2006).



Muito foi mostrado a respeito da permeabilidade vascular observada durante a dengue, mas os mecanismos por trás deste processo ainda não foram completamente elucidados. Pacientes que sobrevivem ao extravasamento de plasma na dengue grave recuperam rapidamente a função endotelial, indicando que a permeabilidade vascular é facilmente reversível, e não causada devido a morte dessas células infectadas, por exemplo (Bethell et al. 2001; Aye et al. 2014). Além disso, o extravasamento ocorre no período de defervescência e não no pico da viremia, observada no início da infecção. Modhiran e cols. (2015) mostraram em células mieloides que a proteína NS1 é capaz de ativar receptores do tipo *Toll* 4 (TLR-4 – do inglês, *Toll Like Receptor* 4), induzindo a produção de citocinas inflamatórias e o extravasamento do plasma (Modhiran et al. 2015).

A resposta imune humoral inicia-se aproximadamente 6 dias após a picada do vetor e a maioria dos anticorpos gerados são anti-proteína E, anti-prM e anti-NS1, já que esta última é secretada e pode acumular-se em níveis elevados nos soros de alguns pacientes durante a fase aguda da doença (Diamond 2009; Alcon-LePoder et al. 2006).

A falta de modelos animais que reproduzam a infecção de forma semelhante àquela ocorrida em humanos, a grande gama de sintomas e o desenvolvimento de formas graves apenas em uma pequena parcela dos pacientes, tornam difícil o entendimento da patogênese da doença e o que determina a evolução para a dengue grave. Hipotetizou-se então que a resposta imunológica possui um papel crucial na patogênese da dengue. Os casos de dengue grave ocorrem geralmente na segunda infecção, por um sorotipo diferente do responsável pela primeira infecção, ou em bebês nascidos de mãe que já foram infectadas pelo DENV. Ademais, já foi observado também que os sintomas se intensificam quando a carga viral diminui drasticamente. Entre as teorias que tentam explicar a patogênese da dengue estão a da facilitação da infecção dependente de anticorpos, a do pecado antigênico original, a do mimetismo molecular e a multifatorial.

A teoria da facilitação da infecção dependente de anticorpos (*Antibody dependent enhancement* – ADE) foi descrita por Halstead em 1988, e preconiza que as formas graves da doença estão associadas a infecções secundárias por sorotipos diferentes (Halstead 1988). Anticorpos subneutralizantes, oriundos da infecção anterior por um sorotipo diferente, têm a capacidade de se ligar ao novo sorotipo, mas não de neutralizá-lo antes da ocorrência da opsonização, facilitando, então, a infecção das células fagocíticas.

O primeiro indício da facilitação da infecção por anticorpos na dengue foi obtido por Halstead e O'Rourke (1977), ao mostrarem *in vitro*, que células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de primatas não humanos tiveram um aumento da infecção após a adição de anticorpos anti-DENV (Halstead and O'Rourke 1977). Observação de dados epidemiológicos também serviram de base para o desenvolvimento desta teoria. Isso explicaria, por exemplo, porque a dengue grave é comum na primeira infecção de bebês menores de 1 ano: anticorpos maternos confeririam proteção nos primeiros meses de vida, mas após esse período, eles passariam a ser subneutralizantes, colaborando assim com a infecção (Halstead 2003; Kliks et al. 1988).

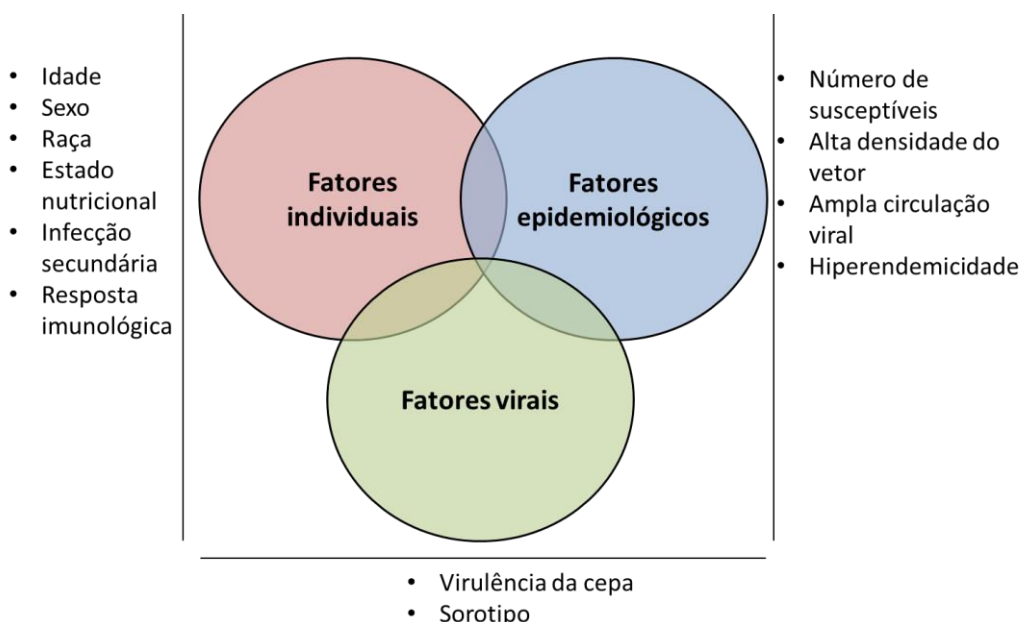
A teoria do pecado antigênico original, por sua vez, foi demonstrada inicialmente para a resposta imunológica humoral, e preconiza que em infecções sequenciais com agentes heterólogos capazes de gerar reação cruzada, os anticorpos mais produzidos na segunda infecção são os mesmos induzidos pela primeira infecção, podendo, por isso, ter menor afinidade com o segundo antígeno (Groth & Webster 1966).

O conceito de pecado antigênico original foi aplicado nas infecções pelo DENV em 2003, por Mongkolsapaya e cols. ao estudar a resposta de células T específicas contra o DENV, em crianças tailandesas na fase aguda da infecção. Foi observado que as poucas células T CD8<sup>+</sup> específicas encontravam-se ativadas e sob processo de apoptose. Por outro lado, foram encontradas muitas células T CD8<sup>+</sup> de baixa afinidade para o sorotipo infectante, mas altamente reativas para outros sorotipos, pelos quais as crianças provavelmente já haviam sido previamente infectadas (Mongkolsapaya et al. 2003). Dessa forma, a teoria afirma que em infecções consecutivas, células T CD8<sup>+</sup> altamente reativas para o sorotipo da primeira infecção e, com pouca afinidade ao sorotipo da infecção atual, são as que mais se multiplicam, sendo, no entanto, menos eficientes para combater a infecção, permitindo o aumento da carga viral e produção de citocinas, situações que são associadas à ocorrência da dengue grave (Vaughn et al. 2000).

Já a teoria do mimetismo molecular fala do papel de reações autoimunes na patogênese da dengue. O primeiro indício dessa possibilidade foi apontado por um estudo de análise computacional feito em 1991, que revelou uma semelhança entre uma região de 20 aminoácidos da glicoproteína de envelope do DENV-4, altamente conservada nos flavivirus, e proteínas da coagulação sanguínea (Markoff et al. 1991). Dessa forma, a reação cruzada de anticorpos anti-proteína E com fatores de

coagulação favoreceria a ocorrência de hemorragias durante a doença (Chungue et al. 1994). Anticorpos anti-NS1 também possivelmente colaboram com a patogênese da dengue ao estabelecerem reação cruzada com antígenos presentes nas células endoteliais não infectadas, disparando a produção de óxido nítrico e induzindo a apoptose dessas células (Lin et al. 2002).

Por outro lado, para a teoria da interação multifatorial, as teorias prévias, individualmente, não são suficientes para explicar os casos graves de dengue. Segundo ela, além da resposta imunológica do hospedeiro e do número de infecções por DENV, existem outros fatores individuais, virais e epidemiológicos que influenciam no desenvolvimento da doença. Entre esses fatores pode-se citar o estado nutricional do indivíduo, idade, sexo, o sorotipo infectante, hiperendemicidade da doença entre outros (Figura 5) (Guzmán & Kourí 2002).



**Figura 5:** Representação esquemática da teoria da interação multifatorial (adaptado de Guzmán & Kourí, 2002).

Portanto, a patogênese da dengue apresenta uma alta complexidade, e envolve a resposta imune contra o DENV. Essa complexidade impacta a eficácia da vacina em uso, a qual ainda é questionada, bem como o tratamento.

### 1.2.7 Tratamento

Ainda não há um tratamento específico para a dengue, sendo que as estratégias atuais, baseiam-se no alívio de sintomas, com o uso, por exemplo, de paracetamol,

em intervalos de pelo menos 6 horas entre as doses. O uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como aspirina e ibuprofeno, não é recomendado, pois estes medicamentos podem agravar quadros de gastrite e hemorragias. Pacientes que não apresentam os sinais de alerta podem seguir com repouso em casa, fazendo intensa hidratação via oral com água, sucos de frutas e outras bebidas contendo eletrólitos (Brasil/MS 2016; World Health Organization 2009).

Em casos de ocorrência dos sinais de alerta e dengue grave o paciente deve ser internado para administração intravenosa de fluidos e acompanhamento do desenvolvimento do caso pela equipe médica.

### **1.3 O vírus chikungunya**

#### **1.3.1 Histórico**

A primeira descrição dos casos de chikungunya foi feita em 1955 por Lumsden (1955) e Robinson (1955), na província de Tanganyika, que hoje corresponde à região da Tanzânia. Características particulares como a apresentação dos sintomas com tamanha intensidade e particularidade que não deixava dúvidas nos residentes, a não aquisição prévia da doença, a baixa incidência de malária na região, e o fato de a mesma pessoa não adoecer duas vezes foram indicativos de que uma nova doença estava sendo descoberta. Esta nova doença recebeu o nome kimakonde de chikungunya, derivado do verbo kungunyala (que significa causar contorção) e pode ser traduzida como “aquele que se curva” (Robinson 1955).

Em 1958 foram reportados casos de chikungunya em Uganda. O vírus foi isolado através da inoculação de um *pool* de mosquitos *Ae. africanus*, coletados na Floresta Zika, em camundongos e também em macaco *rhesus* (Weinbren et al. 1958). Essa descoberta indicou a existência de um ciclo selvagem do vírus. A presença de anticorpos para CHIKV em macacos vervet (*Chlorocebus pygerythrus*) infectados experimentalmente foi mais um indício da importância de primatas não humanos e do ciclo silvestre na transmissão para humanos (Paterson & McIntosh 1964). Posteriormente, análises de sequenciamento gênico indicaram que os casos de chikungunya ocorridos até esse período foram causados pelo genótipo Leste-Centro-Sul Africano (ECSA – do inglês *East-Central-South African*) (Volk et al. 2010; Powers et al. 2000).

O primeiro registro direto do CHIKV fora da África ocorreu na Tailândia, dessa vez associado ao *Ae. aegypti*, em 1958, e também na Índia e no Camboja (Hammon et al. 1960). Estudos genéticos associaram um genótipo diferente a esses casos, o Asiático. Entre as décadas de 70 e 90 ocorreram surtos enzoóticos no Senegal e proximidades, que foram relacionados a outro genótipo, o Oeste Africano (WA – do inglês, *West African*) (Powers et al. 2000; Volk et al. 2010). Em 2004 uma intensa epidemia causada pelo genótipo ECSA chegou às ilhas do Oceano Índico em 2005. Na ilha La Reunión mais de 300.000 casos foram reportados (Weaver & Forrester 2015; Schilte et al. 2013).

Um estudo filogenético utilizando a sequência parcial do gene E1 mostrou que o CHIKV teve origem na África e a partir do genótipo WA, foi inserido na Ásia. Este é o mais divergente dos genótipos do CHIKV que compartilha apenas 78-85% de semelhança nos nucleotídeos com os demais isolados do vírus. O ECSA derivou de um ancestral africano há 100-840 anos, e estima-se que o genótipo Asiático tenha divergido do ECSA entre 1879 e 1956, permanecendo circulante no Sudeste Asiático até os dias atuais (Powers et al. 2000).

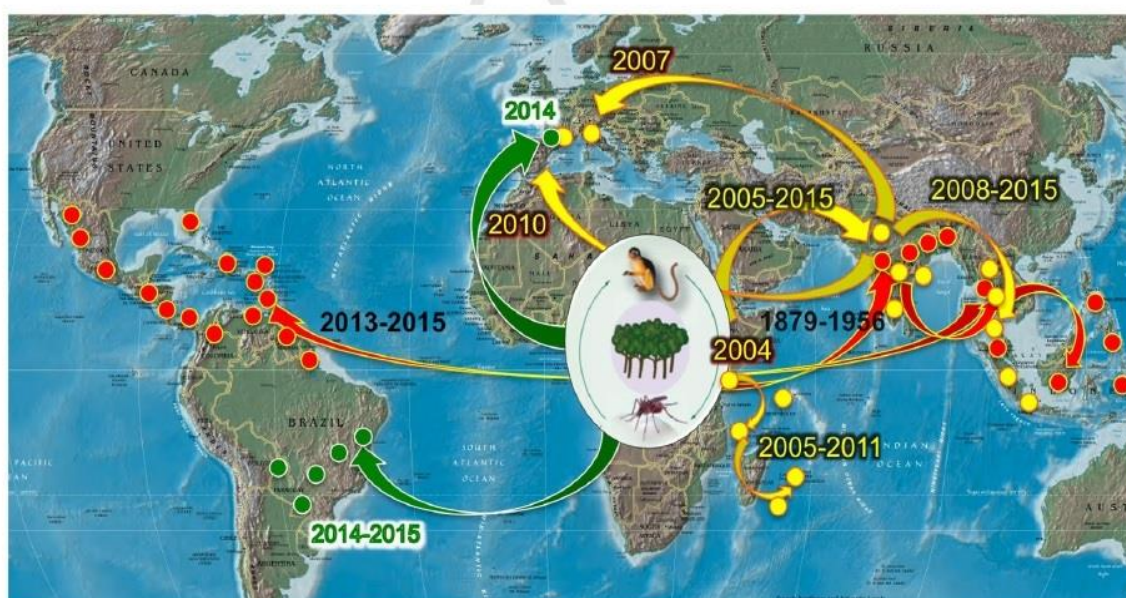
Na Ilha La Réunion foi observada uma mutação de substituição na posição 226 da glicoproteína de envelope E1 (Schuffenecker et al. 2006), relacionada à capacidade de infectar o *Ae. Albopictus*, favorecendo-o como principal vetor na região (Weaver and Forrester 2015). Tsetsarkim e cols. (2007) demonstraram que essa mutação torna o vírus até 100 vezes mais infeccioso para *Ae. albopictus*, cujos efeitos podem ser negativos para o vetor (Tsetsarkin et al. 2007). Chamada de Linhagem do Oceano Índico (IOL – do inglês *Indian Ocean Lineage*), essa nova população se espalhou pela Ásia, embora também haja membros circulantes na região que não possuem a mutação (Arankalle et al. 2007).

Durante a epidemia nas ilhas do Oceano Índico e Ásia, casos importados de chikungunya ocorreram na Europa e nas Américas (Rezza et al. 2007; Lanciotti et al. 2007). Em dezembro de 2013, foram confirmados casos autóctones de chikungunya na ilha de San Martin (Caribe) causado pelo genótipo Asiático. Em 2014, nove ilhas do Caribe registraram mais de 15.000 casos suspeitos. Em agosto do mesmo ano houve mais de 1.000 suspeitas da doença na Colômbia (Figueiredo & Figueiredo 2014).

Em abril de 2015 mais de um milhão de casos suspeitos e 191 óbitos já haviam sido reportados nas Américas (World Health Organization 2017) e a transmissão

autóctone já havia sido confirmada em mais de 50 territórios da região (Figueiredo & Figueiredo 2014).

No Brasil, o primeiro caso autóctone de chikungunya ocorreu no Oiapoque (Amapá) em 13 de setembro de 2014, causado pelo genótipo Asiático. Simultaneamente, na semana seguinte, foi reportada a infecção pelo genótipo ECSA em Feira de Santana (BA) (Nunes et al. 2015). Até o fim do mesmo ano já haviam sido confirmados 1.303 casos autóctones (PAHO 2016). A dispersão global do CHIKV ao longo dos anos pode ser vista na Figura 6.



**ECSA, Asiático, Linhagem do Oceano Índico**

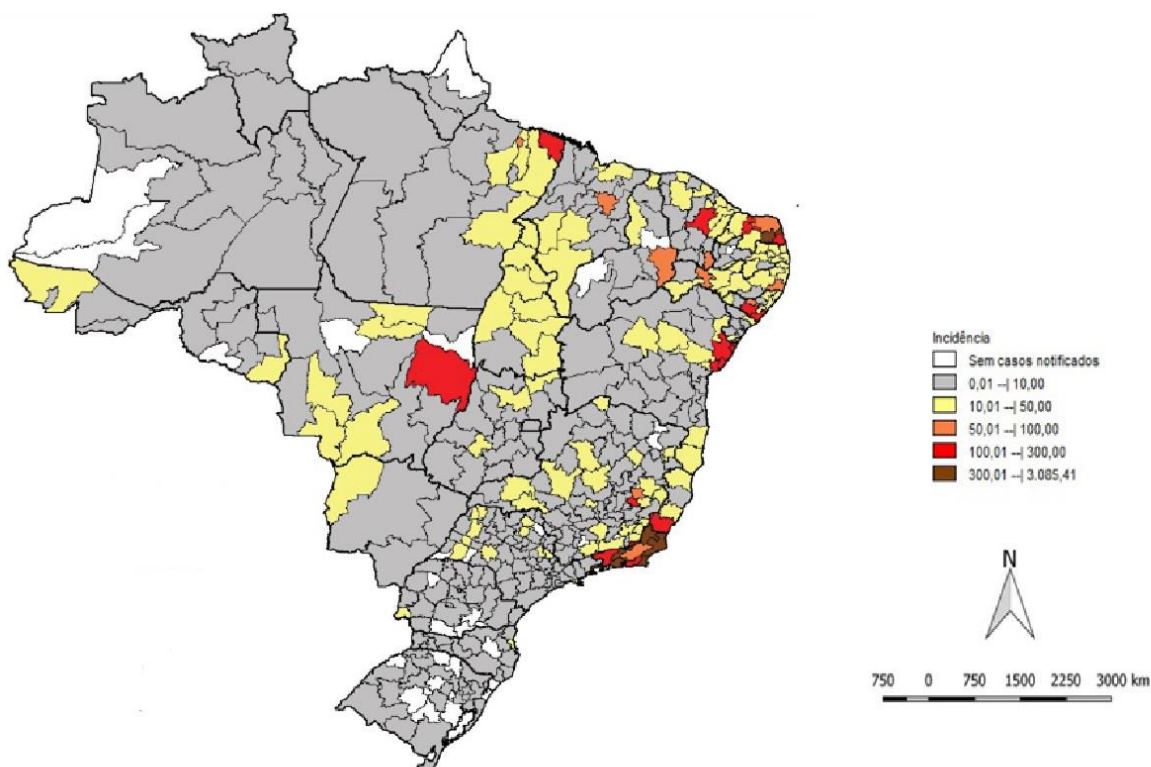
**Figura 6:** Mapa da dinâmica espaço-temporal da disseminação global do CHIKV, baseado em reconstruções filogenéticas. As setas em verde correspondem à dispersão filogenética do genótipo ECSA, as setas em laranja correspondem ao genótipo Asiático, e as em amarelo, à linhagem oriunda do Oceano Índico. (Fonte: Weaver & Forrester, 2015).

### 1.3.2 *Epidemiologia no Brasil*

Em 2015, 38.499 casos de chikungunya foram registrados no país, distribuídos por 704 municípios. A incidência neste ano foi de 18,8 casos/100 mil habitantes e 14 óbitos confirmados. No ano seguinte, 2016, o número de registros aumentou intensamente, chegando a 271.824 casos prováveis e incidência de 133 casos/100 mil hab. A doença continuou se espalhando pelo território nacional, dessa vez atingindo 2.829 municípios, sendo o Nordeste a região mais atingida (SVS/MS 2017a).

Durante 2017 e 2018 o número de casos diminuiu relativamente para 184.694 e 85.221, respectivamente. Nesse período, diferente dos anos anteriores, as regiões mais afetadas foram o Centro-Oeste, com taxa de incidência de 85,9 casos/ 100 mil hab., e o Sudeste, com 58,3 casos/100 mil hab, destacando-se Mato Grosso, Rio de Janeiro (SVS/MS 2018).

Segundo o Ministério da Saúde, até a 36ª semana epidemiológica de 2019, foram 115.510 casos prováveis, com incidência de 55 casos/100 mil hab. Quando analisada por regiões, destacam-se Sudeste e Nordeste, que apresentaram incidências de 96,4 e 42,7 casos/100 mil hab., respectivamente. Destaca-se nesse período, o estado do Rio de Janeiro, onde uma incidência visivelmente superior aos demais estados da federação foi registrada, com 459,9 casos/100 mil hab. (Figura 7). Com relação aos óbitos, 48 já foram confirmados, dos quais 38 no Rio de Janeiro, 5 na Bahia, 1 no Rio Grande do Norte, 1 na Paraíba, 1 em Minas Gerais, 1 no Espírito Santo e 1 no Distrito Federal. Outros 64 óbitos ainda estão sob investigação (SVS/MS 2019b).



**Figura 7:** Distribuição de incidência de casos prováveis de chikungunya por Região de Saúde, até a semana epidemiológica 36 (Fonte: SVS/MS, 2019b).

### **1.3.3 Características estruturais e replicação do CHIKV**

O CHIKV pertencente à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*. Possui nucleocapsídeo icosaédrico composto por 240 repetições da proteína de capsídeo, envelopado por uma bicamada lipídica na qual se encontram as glicoproteínas E1 e E2, apresentando no total um diâmetro de aproximadamente 70 nm (Silva & Dermody 2017).

O genoma do CHIKV é composto por RNA em fita simples de polaridade positiva, o qual contém aproximadamente 11,8 kb, com 7-metilguanossina-cap na extremidade 5' e cauda poli-A na 3' (Khan et al. 2002). Possui duas regiões de leitura aberta (ORF – *Open Reading Frame*) que são separadas por uma junção não codificante. A ORF 5' codifica quatro proteínas não estruturais: nsP1, 2, 3 e 4, as quais constituem a RNA replicase, enquanto a ORF 3' é traduzida de RNAm subgenômico positivo e codifica seis proteínas: E1, E2, E3, 6K, TF e capsídeo (Solignat et al. 2010)

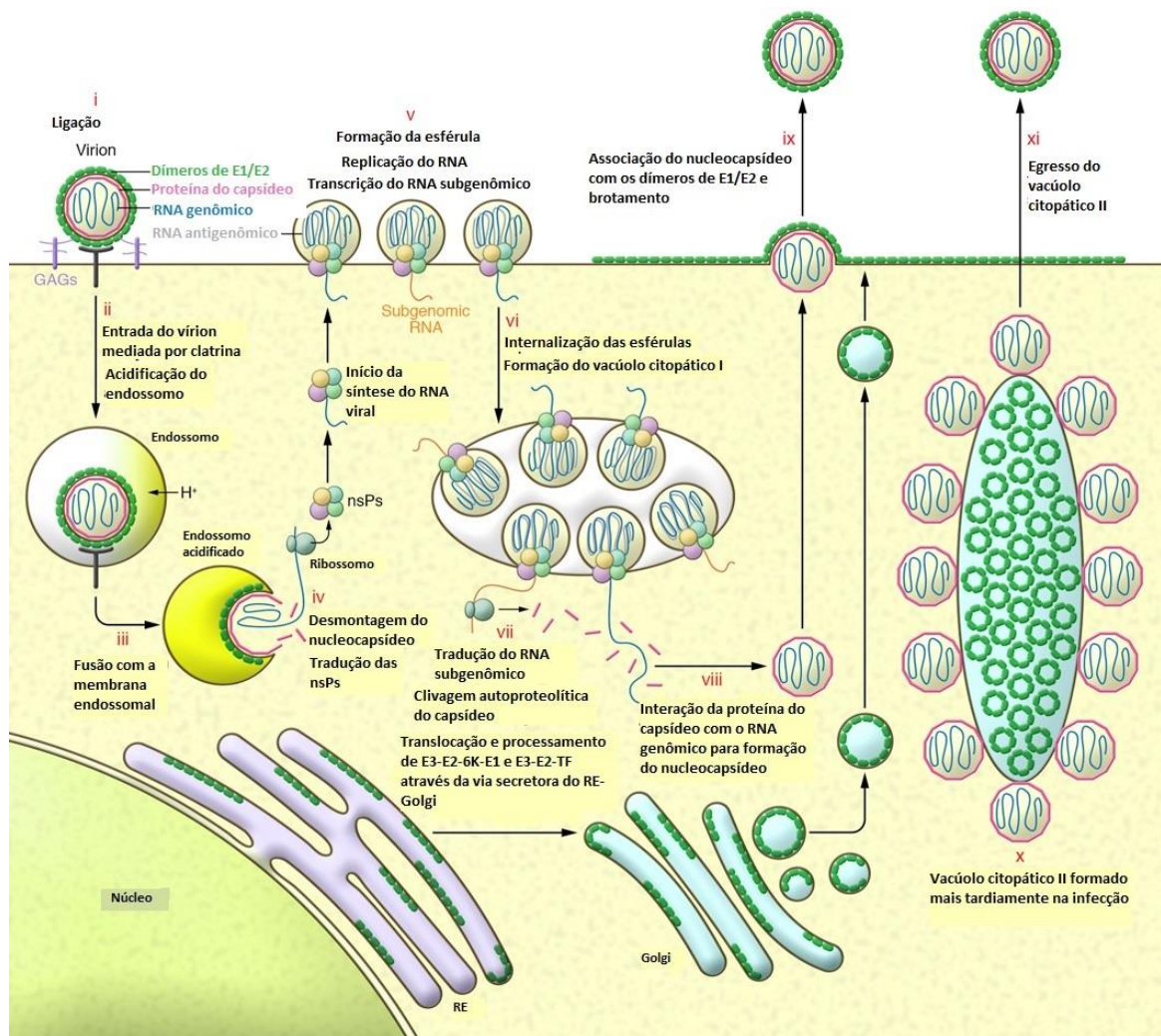
Ainda não se sabe exatamente qual receptor o vírus utiliza para infectar as células hospedeiras, porém acredita-se que glicosaminoglicanos possam servir como co-fatores para infecção. A entrada da partícula viral na célula é feita principalmente através de endocitose mediada por clatrina, após interação da proteína E2 com o receptor celular. O pH ácido do endossomo induz uma mudança conformacional das glicoproteínas do envelope, o que leva à fusão do envelope à membrana do endossomo, possibilitando a entrada do nucleocapsídeo no citoplasma (van Duijl-Richter et al. 2015).

Logo após ser liberado no citoplasma o nucleocapsídeo é desmontado e o RNA viral fica livre para tradução. Inicialmente é traduzida a poliproteína nsP1234, que é clivada nas proteínas nsP123 e nsP4, as quais formam a replicase viral, responsável pela síntese do RNA viral de polaridade negativa (Silva & Dermody 2017; Khan et al. 2002).

Segundo estudos feitos em células de mosquitos, a síntese do RNA de polaridade negativa está associada à formação de esférulas na membrana plasmática da célula hospedeira (Figura 8), as quais protegem o RNA viral dos mecanismos de defesa da célula hospedeira enquanto a replicação ocorre. Essas esférulas são internalizadas se concentrando no interior do vacúolo citopático. A partir dessas estruturas são produzidos o RNA positivo e o RNA genômico, a partir do qual são traduzidas as proteínas estruturais e o capsídeo, sendo este último responsável pela formação do nucleocapsídeo, ao interagir com o genoma (Kuhn



2013). Ao mesmo tempo, são produzidas as poliproteínas estruturais: E3-E2-6K-E1 e E3-E2-TF, cujas porções N-terminal da E3 encaminha as poliproteínas para a via secretora da célula para clivagem. TF e 6K são proteínas acessórias cujo papel na replicação ainda não foi totalmente elucidado, embora acredite-se que elas atuem no brotamento e também na patogênese (Snyder et al. 2013). Vírus mutantes, com deleção no gene 6k produzem menor carga viral *in vitro* e são mais facilmente eliminados *in vivo* (Taylor et al. 2016). Em estágios mais avançados da infecção é formado o vacúolo citopático II, o qual também gera novas partículas virais (Silva & Dermody 2017) (Figura 8).

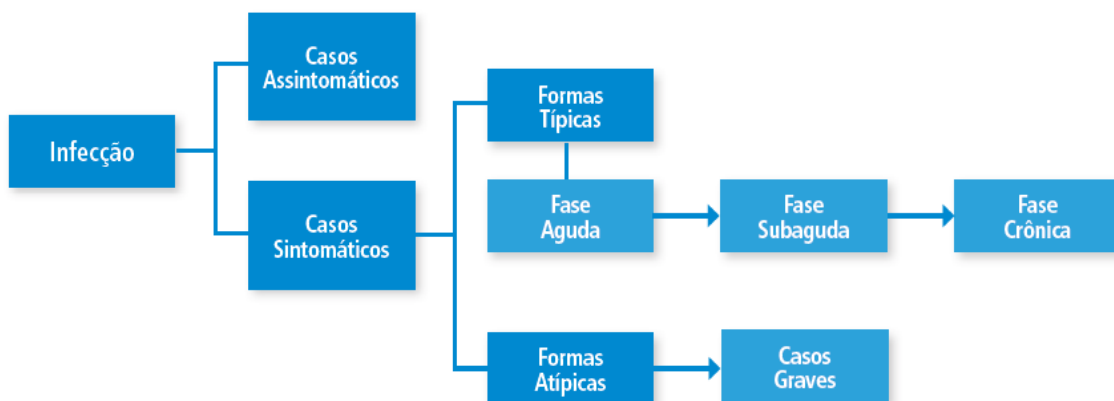


**Figura 8:** Ciclo de replicação do CHIKV em células de mamíferos. Proteína E2 interage com receptores celulares (i), o vírus entra na célula através de endocitose mediada por clatrina (ii), e se funde com a membrana endossomal (iii). O RNA é liberado no citoplasma e as proteínas não estruturais são traduzidas (iv), formando-se as esférulas de replicação na membrana celular (v). Estas são internalizadas formando vacúolos citopáticos (vi), onde são traduzidas as proteínas estruturais e o capsídeo (vii). O nucleocapsídeo é formado (viii) e ao sair por brotamento, associa-se aos dímeros de E1/E2 (ix). Mais tardiamente na infecção, é formado o vacúolo citopático II (x) (Adaptado de Silva & Dermody, 2017).

### 1.3.4 Espectro clínico da infecção por CHIKV

Cerca de 75 a 95% das infecções pelo CHIKV são sintomáticas (Franco et al. 2018). Nos casos sintomáticos típicos observa-se uma fase aguda, na qual os sintomas são febre alta (>39°) de início súbito, *rash* cutâneo, dores de cabeça, mialgia e a poliartralgia intensa da chikungunya, principalmente nas articulações distais, havendo também edema local. O trato gastrointestinal também pode ser afetado, havendo náuseas, vômito e diarreia (Matusali et al. 2019; Ministério da Saúde 2015b).

Após a fase aguda, que se estende por 10-14 dias, algumas pessoas evoluem para a cura, enquanto outras desenvolvem a forma subaguda da doença, na qual permanece a artralgia, que pode ser acompanhada por prurido generalizado, dermatite esfoliativa e sintomas depressivos. Quando os sintomas permanecem por mais de 3 meses, considera-se que a doença atingiu a forma crônica, na qual há além da artralgia, a dor neuropática, e casos de alopecia e bursite, podendo se estender por anos (Figura 9) (Brasil/MS 2015).



**Figura 9:** Espectro clínico da chikungunya (Fonte: Chikungunya - Manejo clínico. Brasil/MS, 2015).

O acompanhamento de 203 pacientes com infecção por CHIKV confirmada através de sorologia registrou que, após 1 mês da doença, 75% dos pacientes ainda apresentavam dor nas articulações, sendo nos joelhos a mais comum, e 30% ainda se sentiam fatigados. Ademais, após 10 meses, 46% ainda apresentavam dor articular (Manimunda et al. 2010). A infecção pelo CHIKV foi considerada benigna até recentemente, porém, apresentações atípicas e complicações clínicas foram reportadas e incluem complicações neurológicas, cardíacas, renais, oculares e de pele, que podem ter consequências graves ao paciente (Rajapaksea et al. 2010). A

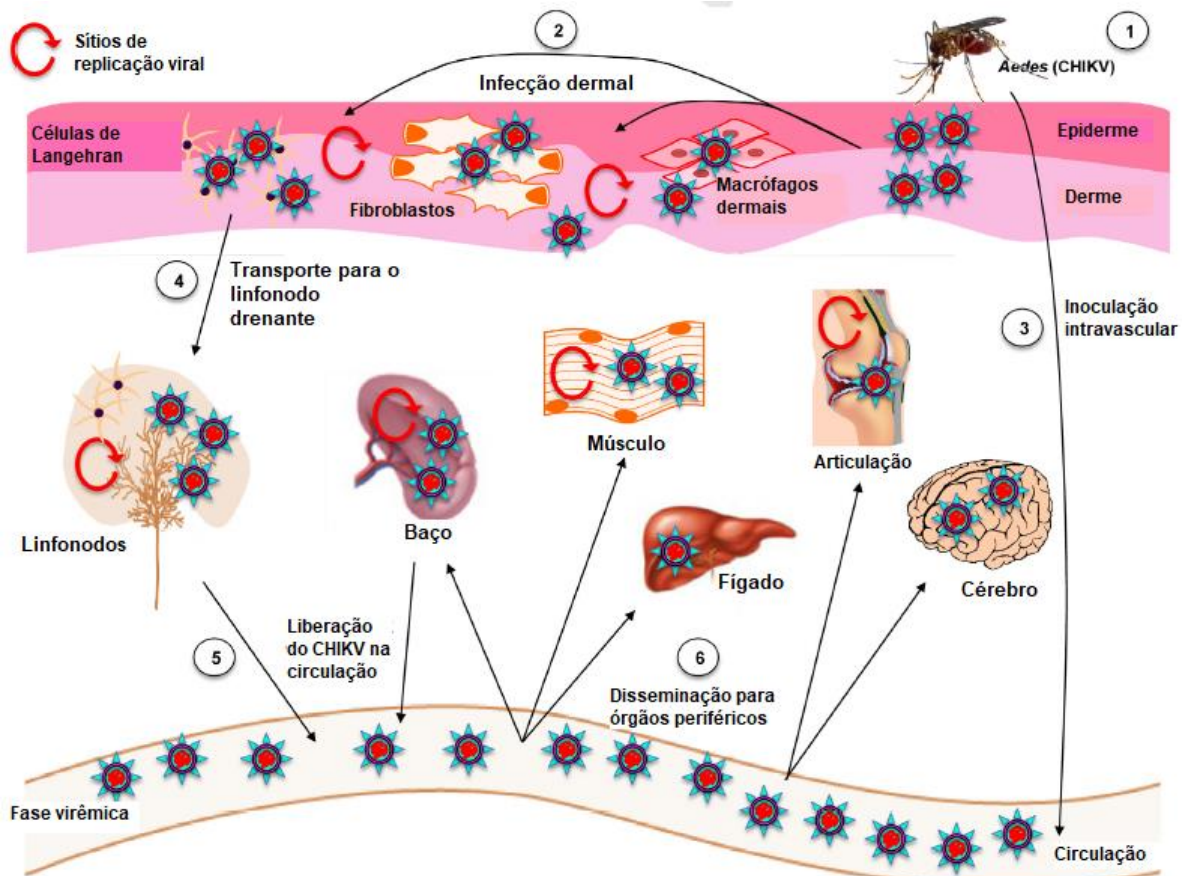
síndrome de Guillain-Barré, por exemplo, é uma manifestação atípica e grave de alta prevalência nos casos de chikungunya ocorridos nas Américas (Bonifay et al. 2018; Stegmann-Planchard et al. 2019).

Durante a epidemia da Ilha La Réunion, a taxa de mortalidade da infecção por CHIKV foi calculada como 1 a cada 1.000 pessoas (Economopoulou et al. 2009). Entretanto, durante os surtos seguintes (2004 - 2008) houve aumento nessa taxa e começou-se a considerar, então, que a chikungunya possivelmente seja subestimada quanto a sua gravidade (Ganesan et al. 2017). As mortes por chikungunya ocorrem geralmente durante a fase aguda, quando ainda é possível fazer a detecção direta do vírus no soro do paciente (Gasque et al. 2016).

### **1.3.5 Imunopatogênese e resposta imunológica**

Diversos fatores estão associados à patogênese da chikungunya, entre eles a idade do hospedeiro, sexo, condição imunológica e predisposição a desenvolver doenças inflamatórias, ou ainda, a existência de comorbidades (Paixão et al. 2018). Em relação ao vírus, a virulência da cepa, a linhagem e a carga viral também estão associadas. A IOL já foi relacionada com a cronicidade da doença (Bonifay et al. 2018; Paixão et al. 2018), enquanto o genótipo Asiático está associado à maior número de infecções subclínicas e artralgia menos intensa (Yoon et al. 2015).

O vírus é inoculado na pele junto com a saliva do vetor infectado, e começa então, a infectar as células que ali se encontram, como as epiteliais e endoteliais, os fibroblastos e macrófagos (Figura 10). Essa replicação inicial é uma das causas das manifestações cutâneas da doença, e gera uma resposta imunológica intensa que induz a expressão de 51 genes antivirais, entre eles os codificantes para receptores do tipo *Toll* 3, 7, 8 e 9 (Ekchariyawat et al. 2015).



**Figura 10:** Infecção e disseminação sistêmica do CHIKV. O vírus pode ser inoculado diretamente na circulação (1) e se disseminar (3) pelo organismo. Quando inoculado na derme, ele infecta células residentes como fibroblastos e células de Langerhan (2) e é transportado para os linfonodos drenantes (4), através do qual atinge a circulação (5), e então se dissemina para outros órgãos (6), o que caracteriza a fase virêmica da doença (Adaptado de Lum & Ng, 2015).

Quando a resposta inicial não é capaz de conter o vírus, ele interage com outras células, como as de Langerhans, migra para os linfonodos e então dissemina para órgãos como fígado e baço, considerados sítios primários de infecção (Assunção-miranda et al. 2013), músculo, cérebro e articulações (Kam et al. 2009) através da circulação sanguínea. O período em que o vírus se encontra na circulação é chamado de viremia, durante a qual os mosquitos susceptíveis se infectam ao fazer o repasto sanguíneo (Nunes et al. 2015).

Nas infecções pelo CHIKV a viremia pode ser mantida por 2 a 10 dias (Nunes et al. 2015). A carga viral durante os primeiros dias de infecção pode chegar a  $10^{10}$  partículas virais por mililitro de sangue. A grande quantidade de vírus circulante induz uma intensa resposta imune inata que culmina na produção de IFN do tipo I e expressão de genes estimulados pelo IFN, essenciais para o controle da infecção (Gasque et al. 2016). Já foram encontradas através da marcação com anticorpo

monoclonal, células T CD8<sup>+</sup> em biópsia de *rash* de paciente em fase aguda, mostrando também a participação da resposta imune adaptativa nesse controle (Ganesan et al. 2017; Pardigon 2009).

A queda no número de leucócitos é um quadro comum na fase aguda da doença, o que sugere a replicação do vírus nessas células. Her e cols. (2010) demonstraram que PBMCs, mais especificamente monócitos, são infectados pelo CHIKV, tanto utilizando sangue de pacientes quanto monócitos primários em modelo *in vitro* (Her et al. 2015). As células T CD8<sup>+</sup> são dominantes no estágio inicial da doença enquanto as T CD4<sup>+</sup> aparecem mais tardiamente, auxiliando na resposta humoral contra o vírus (Pardigon 2009). As células T CD4<sup>+</sup> também já foram detectadas no sinóvio de pacientes com chikungunya crônica (Lum & Ng 2015; Hoarau et al. 2019).

Em primatas não humanos, os sintomas são semelhantes àqueles observados em humanos, como febre, *rash*, dor articular, e o pico da viremia é detectado com 2 dias de infecção. Em modelo *in vivo*, o CHIKV foi detectado no cérebro, pele, fígado, músculo, linfonodos e tecidos conectivos das articulações durante a fase aguda (Labadie et al. 2010). Em casos de infecção persistente e crônica, o vírus já foi detectado nas articulações, músculos e acredita-se que os macrófagos sejam os principais reservatórios do CHIKV (Labadie et al. 2010).

O acometimento das articulações é a principal característica da infecção pelo CHIKV e pode persistir por anos. Através de modelos murinos foi possível identificar as alterações causadas pelos alfavírus artrítogênicos no sistema esquelético, como afinamento da cartilagem e dos ossos (Chen et al. 2014; Goupil et al. 2016; Lim et al. 2018). Condrócitos, tanto murinos quanto humanos, são suscetíveis à infecção pelo Ross River Virus (RRV), um outro membro do gênero *Alphavirus*, e durante a infecção aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Lim et al. 2018). Proteínas do CHIKV e RNA foram detectados nos fluidos e tecidos sinoviais tanto na fase aguda quanto na fase crônica da artralgia (Deeba et al. 2015; Matusali et al. 2019).

A busca por antígenos do CHIKV em biópsia de tecido muscular mostra que o vírus não infecta as fibras musculares, mas infecta especificamente as células satélites, as quais são a principal fonte de crescimento e reparo muscular após a vida adulta (Ozden et al. 2007). Por outro lado, Lohachanakul e cols. (2015) conseguiram infectar mioblastos com vírus isolado de pacientes com e sem mialgia, e observaram que o vírus isolado dos pacientes com mialgia induzia uma maior

produção de citocinas como MCP-1, IL-8, MIP-1 $\alpha$  e IP-10, mas não alterou a produção de IL-6 (Lohachanakul et al. 2015).

Ainda não se sabe o que causa a cronicidade da doença, mas as principais hipóteses são de que o vírus ou suas moléculas permanecem nas articulações e no tecido muscular, ou que uma resposta imunológica persistente é desencadeada pelo vírus (Burt et al. 2017; Paixão et al. 2018).

Alguns estudos têm sugerido que a artralgia persistente poderia ser o resultado da resposta inflamatória do hospedeiro. O aumento de IL-1 $\alpha$  e de IL-6 e a diminuição da quimiocina RANTES foram correlacionados com a gravidade da doença (Ng et al. 2009). Níveis maiores de CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, IL-6 e CXCL10/IP10 são encontrados em pacientes na fase aguda e as quimiocinas CXCL10 e CXCL9 foram associadas à gravidade da doença (Teng et al. 2015). Níveis circulantes mais elevados de IL-1, IL-6 e IL-10 foram encontrados na fase aguda da doença, enquanto níveis maiores de CCL2/MCP-1, IL-6, CXCL8/IL-8 e CCL4/MIP-1 $\beta$  foram observados na fase crônica (Chirathaworn et al. 2010). Ainda, maiores níveis de MMP2 são encontrados no tecido sinovial de pacientes com doença crônica sugerindo a participação das metaloproteinases na lesão tecidual (Hoarau et al. 2019).

Nos casos atípicos e fatais, as manifestações mais comuns são a deterioração dos sistemas respiratório e neurológico, que se estendem para outros órgãos. Análises histológicas de casos fatais demonstraram edema alveolar sem infiltrados inflamatórios (Gasque et al. 2016). Já foi relatada também hepatite aguda, com RNA viral detectado tanto no soro quanto no tecido hepático (Chua 2010). Nos rins, já foram descritos edema glomerular, nefrite tubular intersticial ou ainda necrose tubular (Gasque et al. 2016).

Quanto aos modelos *in vitro*, já foi visto que o CHIKV é capaz de infectar linhagens celulares como HeLa (carcinoma cervical epitelial), 293T (rim embrionário humano), ThBMEC (endotélio de medula óssea), VERO (rim de macaco verde africano) e HuH-7 (hepatocarcinoma humano)(Sourisseau et al. 2007).

### **1.3.6 Tratamento**

Até o momento, não foram aprovados medicamentos nem vacina contra o CHIKV. A OMS indica como medicamento de primeira linha o paracetamol, ou ainda a dipirona, e recomenda evitar aspirinas e outros anti-inflamatórios não esteroidais

durante a fase aguda devido aos efeitos colaterais e risco aumentado de hemorragia no caso de coinfeção pelo DENV (World Health Organization, 2009).

O tratamento é exclusivamente sintomático e a escolha terapêutica dos médicos, deve ser guiada pelo alívio da dor dos pacientes, mas considerando também os efeitos adversos. Para aliviar as dores intensas nas fases subaguda ou crônica são receitados AINE (ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, nimesulida, ácido acetilsalicílico, associações, entre outros), entretanto, o uso desses medicamentos deve ser controlado e há contraindicações. Idade acima de 60 anos, histórico de úlcera gástrica, hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, entre outras condições, constituem fatores de risco para esse tratamento. Para os pacientes com a forma mais grave da doença associada a quadros inflamatórios, que fazem parte do grupo de risco, ou que não apresentaram melhora com os AINE, são receitados corticoesteroides ou imunossupressores. Entre os efeitos colaterais dos corticoesteroides estão alteração na distribuição de gordura, osteoporose, hipertensão arterial e alteração na coagulação sanguínea (Longui 2007). Por sua vez, os imunossupressores podem ser citotóxicos, causar úlceras gástricas, alterações hepáticas, diarreia e náusea (Bressan et al. 2010).

Antivirais demonstraram ação contra o CHIKV *in vitro* e em modelos animais. O sofosbuvir, um medicamento aprovado para tratamento contra o vírus da hepatite C (HCV), foi capaz de inibir a infecção em astrócitos, bem como reduzir a infecção e inflamação em modelo murino de artralgia e infecção aguda grave (Ferreira et al. 2019). O silvestrol, molécula isolada da planta *Aglaia foveolata*, foi capaz de inibir a replicação do CHIKV *in vitro* nas células BHK-21 (fibroblasto de rim de hamster, do inglês - *Baby Hamster Kidney*), HEK-293T (células renais embrionárias, do inglês - *Human Embryonic Kidney*) e NIH3T3 (fibroblasto embrionário) devido a sua capacidade de bloqueio da tradução do RNA viral (Henss et al. 2018). O polipeptídeo micafungina, um antifúngico que age sobre a  $\beta$ -1,3-glucana sintetase, e que já foi aprovado para tratamento de infecção por *Candida* spp., teve ação inibitória na infecção pelo CHIKV em células U2OS (do inglês - *Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells*) (Henss et al. 2018). Apesar dos avanços, essas moléculas não chegaram aos testes clínicos.

## 1.4 Antivirais

Não foi aprovado até o momento um antiviral cujo alvo sejam DENV e CHIKV, entretanto há muitos estudos que investigam a ação de drogas, já aprovadas ou não, contra esses vírus (Paemaneet et al. 2016; Kok 2016). As estratégias mais comuns de tratamento da infecção pelos arbovírus são a inibição da entrada do vírus na célula hospedeira, inibidores do ciclo replicativo, podendo visar a tradução proteica, a replicação do genoma, ou ainda proteínas não estruturais envolvidas no preparo da célula para a replicação. Outra abordagem envolve a intervenção sobre o hospedeiro, como inibição de enzimas que atuam no ciclo ou a imunomodulação (Kok 2016).

Atualmente, mais de 60 fármacos antivirais já foram aprovadas, entretanto, a maioria delas apresenta limitações como baixa biodisponibilidade, efeitos colaterais e surgimento de cepas resistentes (Field & Wainberg 2011). Estima-se que desde o desenvolvimento de uma droga sintética até a aprovação dela para uso em humanos sejam gastos em torno de 12 anos de trabalho e mais de 200 milhões de dólares de custo. Ademais, de 10.000 compostos sintetizados é provável que apenas um seja aprovado para comercialização (Vagelos 1991). Nesse contexto, as plantas medicinais representam uma alternativa possivelmente menos custosa e de avaliação mais rápida, uma vez que esse tipo de terapia é baseado em centenas de anos de descobertas empíricas. Segundo a Anvisa, são consideradas plantas medicinais aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade. Para utilizá-las, deve-se conhecer a planta e a forma de sua coleta e preparo, que geralmente é através de chás e infusões. Quando a planta medicinal passa por processamentos para se obter um medicamento, este passa a ser considerado um fitoterápico (ANVISA 2015).

Os primeiros registros fitoterápicos datam de 2600 a.C. na Mesopotâmia (Gurib-fakim 2006) e até os dias atuais, segundo a OMS, cerca de 80% da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, utiliza plantas medicinais como medicina popular para atendimento primário à saúde (Farnsworth 1993). Os compostos químicos obtidos das plantas, geralmente responsáveis pela ação medicinal, são chamados de metabólitos secundários. Entre os metabólitos secundários estão os terpenos, flavonoides, glicosídeos e alcaloides, sendo os dois últimos os mais comuns (Anbazhagan et al. 2016).



Muitas plantas medicinais já foram investigadas quanto a sua atividade antiviral. A *Boerhavia diffusa*, conhecida como erva-tostão, é utilizada para tratar icterícia, dispepsia, dores e tumores abdominais (Kirtikar & Basu 1956). A planta teve descrita sua capacidade de inibir a formação de *plaques* por bacteriófagos de RNA em bactérias *E. coli* (Awasthi & Menzel 1986). Os extratos de *B. diffusa* agem também sobre outros vírus fitopatogênicos como o vírus X da batata, vírus do mosaico da melancia, do feijão e do tomate, demonstrando assim sua importância também econômica (Awasthi & Verma 2006).

A quercitina, um flavonoide presente no extrato aquoso da espécie *Embelia ribes*, a pimenta preta falsa, usada na medicina ayurveda, apresentou atividade inibitória sobre a proteína NS3 de HCV, de forma dose-dependente em ensaios *in vitro* com células HuH-7 (Bachmetov et al. 2012). O extrato da folha do ruibarbo (*Rheun* spp.), planta usada na medicina chinesa tradicional, demonstrou efeito inibitório efetivo sobre a replicação do HIV-1, ao inibir a atividade das enzimas virais transcriptase reversa e integrase (Esposito et al. 2016).

Mais especificamente para arbovírus, um grande número plantas medicinais também já foi investigado em busca de ação antiviral. Ao testar 123 produtos naturais, Pohala e cols. (2011) encontraram ação antiviral contra CHIKV nos flavonoides apigenina, crisina, naringenina e silibina (Pohjala et al. 2011). Entre as plantas com potencial efeito contra DENV estão *Carica papaya* (Ahmad et al. 2011), *Mimosa escabrella* (Tang et al. 2012), *Leucaena leucocephala* (Ono et al. 2003), *Zostera marina* (Rees et al. 2008) e a própria *Uncaria tomentosa* (Reis et al. 2008), porém esses estudos são preliminares, ainda na fase *in vitro* (Chung 2014).

### **1.5 *Uncaria tomentosa***

A planta *Uncaria tomentosa* (Ut) é conhecida popularmente como unha-de-gato, *uña-de-gato* ou *cat's claw* devido a seus espinhos semicurvados, pontiagudos e lenhosos, cuja forma assemelha-se à garra de um gato (Figura 11). Os indivíduos adultos dessa espécie podem chegar a 30 m de comprimento e seus espinhos são os responsáveis pela aderência na copa das árvores. É uma angiosperma liana, pertencente à família Rubiaceae, nativa das florestas tropicais e pode ser encontrada na Amazônia e na América Central (Figura 12). Em algumas regiões do Brasil, a espécie pode ser encontrada em áreas de restinga, porém são mais

comuns em áreas mais altas e colinas, de solos ricos em matéria orgânica (Miranda et al. 2003)



**Figura 11:** *U. tomentosa* ou unha-de-gato. Folhas com os espinhos característicos em forma de garra. (Adaptado de: Snow et al., 2019).



**Figura 12:** Distribuição da Ut na América Latina (Fonte: Pollito, 2004).

A Ut tem sido usada como planta medicinal por mais de 2 mil anos pelas tribos Asháninka, Cashibo, Conibo e Shipibo do Peru, e Asháninka, Boras and Kaíapor do Brasil, sendo a tribo indígena Asháninka, da região central do Peru e do Acre, que usa a planta há mais tempo. São diversos os usos da espécie, entre eles contra febre, artrite, asma, hemorragias, inflamações, reumatismo e úlceras gástricas (Valente 2006).

O gênero *Uncaria* possui diversos compostos medicinais como alcaloides, terpenos, ácido quinóico, cumarinas e flavonoides (Zeng et al. 2009). Aproximadamente 50 compostos já foram isolados da Ut, 35 dos quais são encontrados apenas em poucas espécies do gênero. Entre esses compostos estão os alcaloides rincofilina, isorrincofilina, mitrafilina, isomitrafilina, uncarina e ácido quinóico (Heitzman et al. 2005). A Ut possui 35 vezes mais alcaloides do que *U. guianensis*, outra espécie também conhecida como unha-de-gato e utilizada como planta medicinal (Sandoval et al. 2002). O teor de alcaloides oxindólicos pentacíclicos e tetracíclicos pode variar na espécie, o que levou a se propor a existência de dois quimiotipos, um contendo apenas alcaloides oxindólicos tetracíclicos e outro contendo tanto os tetracíclicos quanto os pentacíclicos (Valente 2006).

Em células THP1 (monócitos humanos derivados de leucemia monocítica aguda) o tratamento com extrato etanólico da Ut aumentou a expressão da IL-1 $\beta$  em 20 vezes e não alterou a expressão de TNF- $\alpha$  (Allen-hall et al. 2007). Já nas células estimuladas com LPS de *Escherichia coli*, a expressão de IL-1 $\beta$  aumentou em 2,4 vezes e de TNF- $\alpha$  foi inibida em 5,5 vezes. A inibição de TNF- $\alpha$  é utilizada como tratamento para doenças inflamatórias crônicas, através do uso de anticorpos, uma metodologia muito mais cara (Allen-hall et al. 2007).

Utilizando o modelo animal de gastrite induzida por AINE, Sandoval e cols. (2002) mostraram o efeito protetivo de Ut quando administrada antes da indução da gastrite, havendo atenuação da injúria da mucosa gástrica, o que reforça a concepção de seu efeito anti-inflamatório (Sandoval et al. 2002).

O primeiro relato da atividade antiviral da Ut foi feito por Aquino e seus cols. em 1989, ao isolar nove compostos da planta e testá-los contra o vírus da estomatite vesicular (Aquino et al. 1989). Mais recentemente, Reis e cols. (2008) evidenciaram a atividade antiviral e imunomoduladora do extrato de Ut ao tratar monócitos humanos infectados com DENV-2 com extrato hidro alcoólico e fração alcaloide. A frequência de células infectadas detectada através da citometria foi reduzida, assim como a produção de TNF- $\alpha$  (Reis et al. 2008).

## 1.6 Justificativa

Em 2019, até a 40<sup>o</sup> semana epidemiológica, haviam sido notificados 1.484.106 casos de dengue e 122.019 de chikungunya, e um total de 750 óbitos causados por essas doenças (SVS/MS 2019a). Números tão altos causam grande impacto na economia de um modo geral, no turismo e na qualidade de vida da população, tornando imprescindível a busca por formas de controle e de tratamento desses agravos.

Até o momento não há um tratamento antiviral contra o DENV ou o CHIKV, apenas tratamento sintomático. A OMS recomenda o uso de paracetamol ou dipirona para alívio dos sintomas, repouso e hidratação. No caso da chikungunya, devido à relação das dores com processos inflamatórios, nos pacientes em fase pós-aguda ou crônica são utilizados anti-inflamatórios não esteroidais. Aos pacientes não responsivos a esta primeira terapia são receitados corticoides e/ou imunossupressores. Entretanto, devido ao grande número de efeitos colaterais dessas medicações, nem todos pacientes podem utilizá-las e, naqueles que podem, deve ser evitado o uso por longos períodos (de Brito et al. 2016)

A busca por tratamentos naturais é uma tendência mundial e lógica. Um quarto dos medicamentos receitados atualmente são de substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos, e 80% da população mundial utilizam plantas medicinais no atendimento primário à saúde devido a facilidade de acesso, baixo custo e compatibilidade cultural (Gurib-fakim 2006). A biodiversidade de nossos biomas disponibiliza uma variedade de plantas com atividade terapêutica para serem investigadas, entre elas a *Uncaria tomentosa*. Nosso grupo já evidenciou a atividade antiviral de extratos desta espécie na infecção pela cepa protótipo de DENV-2, utilizando como modelos monócitos humanos (Reis et al. 2008) e linhagens de células endoteliais (HMEC-1) (Lima-Junior et al. 2013). Assim, torna-se relevante continuarmos os estudos, desta vez utilizando cepas de DENV e CHIKV circulantes no Brasil, bem como explorar novas possibilidades aplicando este modelo ao CHIKV, a fim de buscar alternativas mais efetivas e com menos efeitos colaterais para o tratamento dessas arboviroses.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito antiviral do extrato hidroalcoólico da casca de *Uncaria tomentosa* em modelos de infecção *in vitro* por cepas brasileiras de DENV e CHIKV.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar a infecção da linhagem celular HuH-7 e de monócitos pelas cepas brasileiras de DENV;
- Padronizar a infecção das linhagens celulares HuH-7 e Vero e de monócitos pela cepa brasileira de CHIKV;
- Infectar diferentes células alvo com as cepas brasileiras dos quatro sorotipos de DENV e CHIKV;
- Avaliar os efeitos citotóxicos de extratos de *Uncaria tomentosa* em células-alvo dos arbovirus DENV ou CHIKV;
- Avaliar a atividade antiviral dos extratos de *Uncaria tomentosa* frente aos quatro sorotipos de DENV e CHIKV.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais e reagentes**

##### **3.1.1 Meios de cultura**

Meio 199 Earle's – Sigma #M5017

Meio Dubelcco's – Gibco-Thermo Fisher Scientific #41300-070

Meio RPMI 1640 – Gibco #12633

##### **3.1.2 Reagentes**

Albumina Bovina (BSA) – Sigma #A-8022

Aminoácidos não essenciais – Gibco #11140-050

Azul de Trypan – Sigma #T8154

Bicarbonato de Sódio P.A. – ISO FAR #302

Dengue NS1 Ag kit Platelia – BIORAD #72830

DMSO – Sigma #D2650

Ficoll-Paque™ Plus– Amercham Biosciences AB #17-1440-03

Fixation/Permeabilization Solution Kit – BD #544714

Fungizona – Gibco #15290-018

HEPES– Gibco #15630-080

L-Glutamina - GibcoBRL #21051-024

MTT Cell Proliferation Assay Kit – Invitrogen #M6494

Penicilina-Estreptomicina– Gibco #15140-122

Saponina– Sigma #S-7900

Soro Fetal Bovino– Gibco #10270-106

Tripsina-EDTA 0,25% - Gibco #25200-056

Triptose Fosfato– Sigma #T8782

Tween 20™ (*Polyoxythylene Sorbitan Monolaurate*) #P-1379 – Sigma

### **3.1.3 Soluções**

#### **PBS (Tampão fosfato) pH 7.4:**

Cloreto de sódio.....	80 g
Cloreto de potássio.....	2 g
Fosfato dibásico de sódio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) anidro.....	24,20 g
Fosfato monobásico de potássio (KHPO <sub>4</sub> ).....	1,4 g
Água destilada q.s.p. ....	1000 mL

#### **Bicarbonato de sódio**

Bicarbonato de Sódio .....	7,5 g
Água destilada q.s.p. ....	100 mL

#### **Solução de azul de trypan 2%**

Azul de trypan .....	2 g
PBS q.s.p. ....	100 mL

### **3.1.4 Soluções para citometria de fluxo**

#### **Solução de Lavagem I – BSA 1% Azida 0,1% PBS 1x**

Azida Sódica.....	0,1 g
BSA.....	1 g
PBS q.s.p. ....	100 mL

#### **Solução de bloqueio – BSA 1% Azida 0,1% Plasma autólogo 5% PBS 1x**

Azida sódica.....	0,1 g
BSA .....	1 g
Plasma autólogo .....	5 mL
PBS q.s.p. ....	100 mL

O plasma autólogo deve ser inativado a 56°C por 30 minutos.

#### **Solução de permeabilização – BSA 1% Azida 0,1% Saponina 0,15% PBS 1x**

Azida sódica .....	0,1 g
BSA .....	1 g
Saponina .....	0,15 g

PBS q.s.p. .... 100 mL

### **Solução de fixação – Paraformaldeído 2% PBS 1x**

Paraformaldeído ..... 2 g

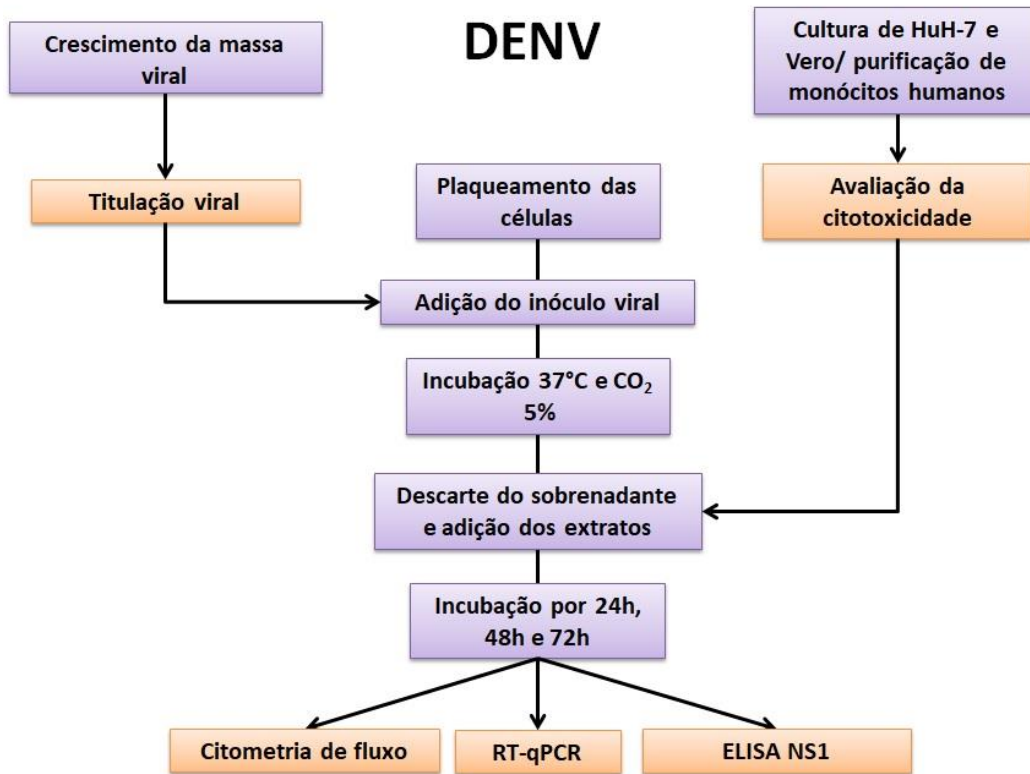
PBS q.s.p. .... 100 mL

## **3.2 Desenho experimental**

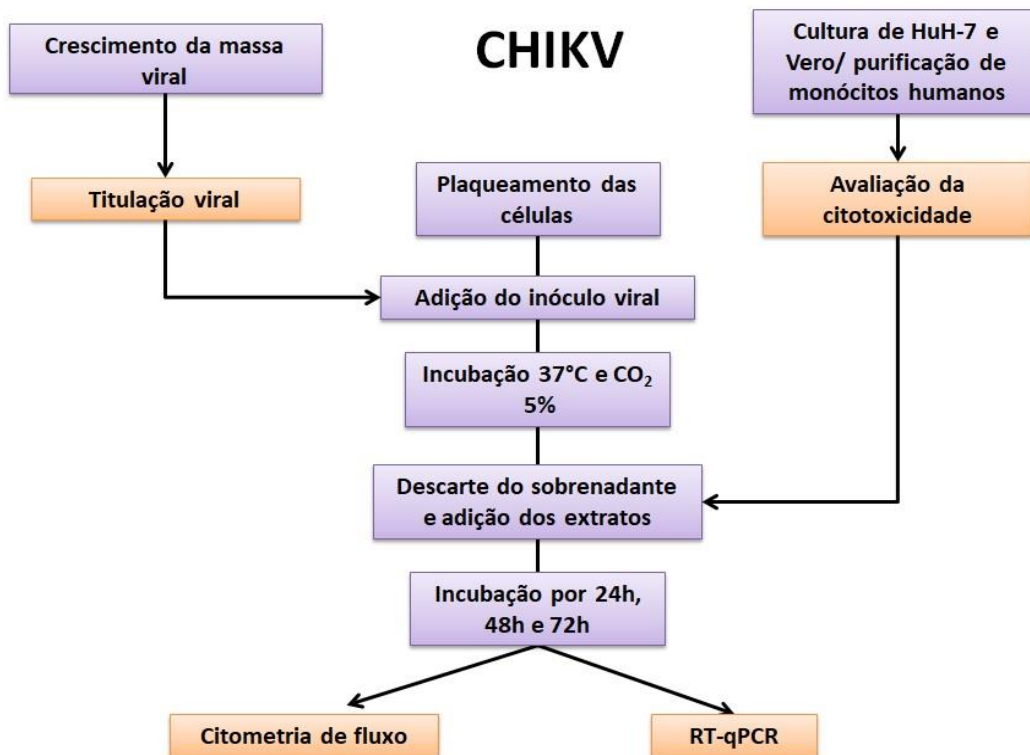
O desenho experimental do presente estudo consistiu primeiramente no crescimento das massas virais das cepas brasileiras de DENV e CHIKV, seguida da titulação viral. Paralelamente, nas células HuH-7, Vero e monócitos foi avaliada a citotoxicidade do extrato através do MTT e/ou da citometria de fluxo, seja avaliando a marcação LIVE/DEAD ou ainda o tamanho e a granulosidade das células após o tratamento.

Conhecidas as concentrações não citotóxicas, as células foram plaqueadas, infectadas, tratadas com essas concentrações por 24/48/72h. A avaliação da atividade antiviral do extrato de Ut contra DENV foi avaliada através da semi-quantificação da proteína NS1 e RNA viral presentes no sobrenadante e marcação do antígeno viral intracelular e leitura no citômetro de fluxo (Figura 13). Para CHIKV, foi quantificado o RNA viral no sobrenadante e marcação intracelular do antígeno de CHIKV para leitura no citômetro de fluxo (Figura 14).





**Figura 13:** Desenho experimental para o DENV.



**Figura 14:** Desenho experimental para o CHIKV.

### 3.3 Cepas virais

As cepas brasileiras utilizadas nos ensaios realizados neste estudo foram aleatoriamente obtidas a partir dos soros de pacientes caracterizados como positivos para os vírus, através da reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Os soros contendo DENV foram coletados durante as epidemias de 2008, 2013 e 2015, enquanto aquele contendo CHIKV, foi obtido em 2016. As amostras de sangue foram coletadas em tubos secos em ausência de anticoagulantes (BD Vacutainer®, BD Life Sciences, NJ, EUA), e centrifugadas por 10 min, 350 x g, para a separação dos soros. Em seguida, os soros foram submetidos à extração do RNA viral e à RT-qPCR. As cepas e seus correspondentes vírus/subtipos encontram-se no Quadro 1.

**Quadro 1:** Cepas dos quatro sorotipos de DENV e do CHIKV, identificadas por RT-PCR em tempo real quantitativa. # = número de passagens.

Vírus	Cepa
DENV-1	30/2015 #2
DENV-2	337/2008 #2
DENV-3	74886 #6
DENV-4	7189/2013
CHIKV	EJS20 #4

Os soros foram inoculados em cultura de células renais de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops* (Vero), no Laboratório de Imunologia Viral (LIV).

### 3.4 Produção da massa viral

#### 3.4.1 Produção da massa viral de DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e CHIKV

A massa viral de cada cepa foi gerada a partir da adição dos inóculos virais à monocamada de células de linhagem Vero. Foram adicionados 1,5 mL do inóculo viral (CHIKV: EJS20, DENV-1: 30/2015 #2, DENV-2: #377/2008, DENV-3: 74886 #6, DENV-4: 7189/2013 e CHIKV EJS20 #4) seguido de incubação por 1h para CHIKV, e por 2h para os DENVs (1-4), para adsorção. Em seguida, a cultura foi mantida com meio suplementado contendo 2% de SFB em estufa a 37°C em 5%

CO<sub>2</sub>. Ao fim de 8 dias para os DENVs e 3 dias para o CHIKV, os sobrenadantes das culturas infectadas foram recolhidos e os *debris* celulares removidos por centrifugação de 10 min a 4°C em 1000 x g. As alíquotas da massa viral foram armazenadas a -70°C para titulação. Células não infectadas foram mantidas nas mesmas condições das células infectadas para a utilização como controles (Mock).

A presença de partículas virais infecciosas foi acompanhada através da observação de efeito citopático (ECP) e confirmadas pela RT-qPCR em tempo real.

### **3.4.2 Titulação viral**

A quantificação da massa viral do CHIKV e do sorotipo 2 do DENV foi realizada através do método de *plaque* em células Vero. As placas com as células foram utilizadas 48h após o preparo, quando a monocamada semi-confluyente foi formada. Foram inoculados então, 100 µL do sobrenadante obtido durante o crescimento da massa viral, diluídos 1:10. Após a inoculação, as células foram submetidas à incubação por 1h em estufa a 5% CO<sub>2</sub> e 37°C, com leve movimentação a cada 15 min para melhor adsorção viral. Ao fim deste período, as monocamadas celulares receberam uma cobertura de meio semi-sólido de carboximetilcelulose (CMC) a 3% com meio Earle's 199 completo e foram novamente incubadas em mesmas condições de temperatura por cinco dias. Por fim, as células foram fixadas com formaldeído 10% e, no dia seguinte, coradas com cristal violeta para a visualização das placas. Os *plaques*, áreas descoloridas de destruição celular causada por vírus, foram quantificados manualmente utilizando um transluminador (*White light transilluminator* - UVP) e o título viral foi calculado em unidade formadora de placas/mL (PFU/mL, do inglês *plaque forming unit/mL*), na menor diluição que ainda ocorreu a destruição celular.

A massa viral dos sorotipos 1, 3 e 4 de DENV foram quantificados através da técnica de RT-qPCR em tempo real (Johnson et al. 2005), utilizando uma curva padrão com título viral conhecido.

Nos ensaios antivirais a quantificação de DENV e CHIKV foi feita através da RT-qPCR descritas por (Johnson et al. 2005) e (Lanciotti et al. 2007), respectivamente.

## 3.5 Células

### 3.5.1 Cultura de células Vero e HuH-7

Para alcançar os objetivos propostos neste estudo, foram utilizadas células das linhagens Vero e HuH-7, assim como monócitos isolados de sangue periférico. Para isso, as células de linhagem foram mantidas em cultura e expandidas para a obtenção das monocamadas confluentes de células necessárias à infecção.

As células Vero, derivadas de células epiteliais renais de macacos, foram mantidas em meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, MA, EUA), a 37°C e em 5% CO<sub>2</sub>, e cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> com 25mL de meio 199 suplementado com 5% de bicarbonato de sódio e 5% de SFB. As garrafas foram mantidas em 37° e 5% de CO<sub>2</sub> até a formação de monocamada confluyente. Em seguida, foram utilizadas para produção e titulação das massas virais utilizadas no estudo.

Por sua vez, a linhagem celular HuH-7, derivada de hepatocarcinoma humano, foi mantida com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Gibco) complementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. O crescimento celular foi conduzido em garrafas médias de 75 cm<sup>2</sup> e acompanhado através da observação em microscópio invertido de contraste de fase, sendo feita a passagem para novas garrafas quando a monocamada celular atingia mais de 80% de confluência.

A passagem para novas garrafas foi feita com a adição de tripsina-EDTA 0,25% e incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 3 min, para remoção das células aderentes. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com meio DMEM suplementado com 10% de SFB, e as células em suspensão foram lavadas através da centrifugação a 250 x g, 7 min, com descarte do sobrenadante. O *pellet* ou depósito de células, então, foi ressuspenso em 25 mL de meio DMEM com 10% de SFB, e transferido para uma nova garrafa, a qual foi mantida novamente nas condições previamente descritas.

As células foram contadas através do TC20™ Automated Cell Counter (BioRad, CA, EUA) utilizando azul de trypan 0,4% para avaliação da viabilidade celular, e então 2x10<sup>5</sup> células/poço foram adicionadas em placas de cultura de 96 poços em fundo chato.

### **3.5.2 Monócitos do sangue periférico**

Para se aproximar mais das condições normais de infecção em indivíduos saudáveis, os ensaios de atividade antiviral também foram conduzidos em monócitos humanos purificados a partir do *buffy coat* de bolsas de sangue. As bolsas contendo as células leucocitárias foram obtidas de doadores de sangue, os quais compareceram no setor de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF - UFRJ). No Laboratório de Imunologia Viral foram isoladas as células mononucleares periféricas através da centrifugação e separação por gradiente de densidade em Ficoll (GE Healthcare Life Sciences, PA, EUA), na proporção 1:2, seguido de centrifugação por 30 min, em temperatura ambiente, a 350 x g, sem frenagem.

O anel de PBMCs foi coletado e lavado 2 vezes com meio RPMI, por 7 min, a 250 x g, em temperatura ambiente. As células foram contadas no TC20™ Automated Cell Counter (BioRad) utilizando azul de trypan 0,4% para viabilidade celular, e 5x10<sup>8</sup> células foram destinadas à purificação dos monócitos, utilizando-se *beads* magnéticas de seleção negativa, através do kit Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes (Invitrogen, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, com pequenas alterações. Resumidamente, as PBMCs foram inicialmente incubadas com reagente de bloqueio de sítios inespecíficos e com os anticorpos por 20 min a 4°C. Em seguida, foram lavadas por centrifugação a 350 x g por 8 min a 4°C, tendo o sobrenadante descartado. Após preparo prévio, as *beads* foram então adicionadas e incubadas com as células por 15 min a 4°C, sob agitação a cada 5 min. Por fim, às células com *beads* foi adicionado 4 mL de solução de lavagem, o tubo foi deixado por 2 min no eletroímã e o sobrenadante contendo os monócitos purificados foi coletado para plaqueamento.

Os monócitos foram transferidos para placas de 96 poços de fundo em U, na proporção de 10<sup>5</sup> células/poço, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para sedimentação e posterior infecção e tratamento com o extrato.

### **3.6 Preparo das amostras vegetais**

Foi utilizado neste estudo o extrato hidroalcoólico (1:1, EtOH:H<sub>2</sub>O) da casca do caule de Ut. A amostra foi coletada na cidade de Cruzeiro do Sul, no Acre. O

material foi identificado pelo botânico Mario Gomes do Jardim Botânico do município do Rio de Janeiro e preparado no Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela Dra. Lígia Valente e equipe.

A amostra vegetal foi extraída à exaustão em temperatura ambiente. O material foi transferido para um recipiente de vidro e coberto com solução solvente por 12h. Ao fim desse período, o solvente foi filtrado e ao conteúdo residual foi adicionado mais solução solvente. Esta etapa foi repetida até a solução solvente não apresentar mais cor, o que ocorreu após 5 repetições. Todos os filtrados foram reunidos e o solvente evaporado a pressão reduzida de 37°C° (rotação-vapor), o que reduz a probabilidade de ocorrer danos às substâncias presentes no extrato. Todos os ensaios foram executados com o mesmo lote.

### **3.7 Ensaio de viabilidade celular pelo teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)**

As células Vero e HuH-7 foram contadas no contador automatizado TC20™ Automated Cell Counter (BioRad, CA, EUA), utilizando azul de trypan 0,4%, e então,  $2 \times 10^5$  células/poço foram adicionadas em placas de cultura de 96 poços em fundo chato, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, chegando ao volume final de 200 µL/poço. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24h para formação da monocamada de células. Ao fim desse período, para os ensaios de citotoxicidade, o sobrenadante foi descartado e o extrato de Ut foi adicionado nas concentrações de 1 mg/mL e 500, 100, 50, 10, 5 e 1 µg/mL, diluído em DMEM suplementado com 2% de SFB. Foram utilizados poços contendo apenas DMEM suplementado como controle positivo de viabilidade, poços contendo dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma Aldrich, MO, EUA) na maior concentração encontrada nas diluições (4%) e Tween 20 (Sigma) a 3%, para controle negativo de viabilidade. Cada amostra foi avaliada em triplicata para as diferentes concentrações de Ut e controles.

Após diferentes períodos de incubação de 24h, 48h e 72h, o ensaio de MTT foi realizado para avaliar a viabilidade das células submetidas às diferentes concentrações de Ut. O sobrenadante foi descartado e 10 µL do kit Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e 100 µL de RPMI sem vermelho de fenol (Gibco-Thermo Fisher Scientific) foram adicionados a cada poço. Poços controle contendo apenas MTT e RPMI foram incluídos. A placa foi incubada então a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas, e ao final desse período foram

adicionados 50  $\mu$ L de DMSO aos poços. Após uma incubação final de 10 min, a densidade óptica foi lida no SpectraMax Paradigm Software SoftMax® Pro 6, em 540 nm. O cálculo dos resultados foi feito considerando o controle positivo como 100% de viabilidade e subtraindo de todos os poços a densidade óptica do controle contendo apenas MTT e meio RPMI.

### **3.8 Infecção e tratamento das células**

Após a formação da monocamada das células HuH-7 e Vero ou sedimentação dos monócitos purificados, as células foram infectadas com os arbovírus DENVs ou CHIKV. Os inóculos virais foram preparados em meio DMEM (HuH-7), 199 (Vero) ou RPMI (monócito) sem SFB e adicionados aos poços, seguindo-se de incubação por 2h (DENV) ou 1h (CHIKV), a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para adsorção. Ao final da adsorção, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 200  $\mu$ L das diluições do extrato hidroalcoólico de Ut com o meio correspondente de cada tipo celular contendo 2% de SFB.

Nos ensaios de cinética, o sobrenadante da cultura foi coletado em diferentes momentos da infecção (24/48/72h) e armazenados a -70°C para posteriores análises, enquanto para citometria de fluxo, as células foram avaliadas após 48h de infecção e tratamento a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Foram definidos como controle positivo para a infecção poços contendo células infectadas e mantidas apenas em meio suplementado com 2% de SFB. O mock foi constituído de células que foram submetidas às mesmas condições que as células infectadas, mas mantidas em meio de cultura em ausência do inóculo viral. A dexametasona foi utilizada como um possível controle de inibição da infecção *in vitro*, dado que em estudos anteriores o tratamento com esse fármaco levou à diminuição da taxa de células infectadas pelo DENV-2 (Reis et al. 2007; Reis et al. 2008).

### **3.9 Citometria de fluxo**

#### **3.9.1 Marcação extracelular**

Como uma alternativa para avaliar a citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de Ut, foi utilizado o método de citometria de fluxo para a identificação de células

mortas, o kit LIVE/DEAD Fixable far red dead cell stain (Thermo Scientific), cujo corante fluorescente interage com as amins celulares. Nas células mortas, cuja integridade da membrana está comprometida, a interação ocorre tanto com as amins da superfície celular quanto das intracelulares, gerando marcação fluorescente mais intensa do que nas células íntegras, nas quais a ligação ocorre apenas na superfície. A diferença na intensidade de fluorescência é detectada através do citômetro de fluxo.

As células HuH-7 e os monócitos foram plaqueados, infectados e, após 48h, o sobrenadante foi coletado e armazenado para análises posteriores. Nas células HuH-7 foram adicionados 50 µL de tripsina-EDTA 0,25% e, após 3 min de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, a tripsina foi inativada com 50 µL de SFB e 100 µL de PBS 1x, sendo as células transferidas para placas com fundo em U. Os monócitos, que já se encontravam em placas de fundo em U, foram incubados por 30 min a 4°C e então soltos através de movimentos mecânicos com a pipeta. Para ambas as células as placas foram centrifugadas a 350 x g, 5 min, a 4°C, o sobrenadante descartado, e uma segunda lavagem foi realizada.

Foi adicionado o corante LIVE/DEAD, diluído 1:10 em PBS 1x, às células HuH-7 e aos monócitos, sob proteção da luz, assim como o anticorpo anti-CD14 (PerCP-Cy™5.5 Mouse Anti-Human CD14, Biolegend, CA, EUA), diluído 1:50, foi adicionado aos monócitos, seguindo-se de incubação por 30 min em temperatura ambiente. Ao fim da incubação cada placa foi centrifugada e lavada duas vezes, com o descarte do sobrenadante. Para fixação, foram adicionados 100 µL de Cytifix, do kit cytofix/permwash (BD Biosciences, CA, EUA), seguindo-se de 20 min de incubação em temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas com solução de lavagem contendo BSA 1% e azida 0,1% em PBS 1x.

### **3.9.2 Marcação intracelular**

A marcação intracelular dos antígenos virais de DENV ou CHIKV para investigação do efeito antiviral de Ut foi feita logo após a marcação com o corante LIVE/DEAD ou anticorpo anti-CD14. Às células foram adicionados 100 µL de Perm/Wash buffer (BD Bioscience) para lavagem e permeabilização. Em seguida, foram adicionados então, 100 µL de solução de bloqueio, com 30 min de incubação e posterior lavagem. A marcação da proteína de envelope do DENV foi realizada por meio do anticorpo anti-Dengue Complex (1:100) (Sigma Aldrich) diluído em perm/wash.



A marcação do antígeno viral de CHIKV (1:50) (Abcam, MA, USA) envolveu a etapa de conjugação dos anticorpos, no qual o anticorpo anti-CHIKV foi incubado com 5  $\mu$ L de Zenon Alexafluor 647 durante 5 min, seguindo-se a adição do reagente de bloqueio e nova incubação de 5 min.

Por fim, foi preparada a solução com anticorpo diluído em perm/wash, com sua adição às células, e incubação por 50 (anti-Dengue complex) ou 30 min (anti-CHIKV). Decorrido o tempo de incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células lavadas. Na marcação de DENV, foi adicionado ainda o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher), diluído 1:200 em Perm/Wash, com incubação de 30 min.

As células foram lavadas, fixadas e ressuspendidas em 200  $\mu$ L de PBS 1x para análise por citometria de fluxo. As aquisições citofluorimétricas foram conduzidas no equipamento multiparamétrico BD Accuri C6 (Accuri Cytometers Inc., MI, EUA), e os resultados foram analisados no Programa FlowJo.

### **3.10 Detecção semi-quantitativa da proteína NS1 de DENV**

A detecção da proteína NS1 no sobrenadante da cultura foi realizada utilizando-se o kit Platelia Dengue NS1 (BioRad). Aos poços da placa fornecida pelo fabricante já revestida com anticorpo de captura (“*precoated*”) foram adicionados 50  $\mu$ L da solução diluente, 50  $\mu$ L da amostra de sobrenadante ou controles e 100  $\mu$ L do conjugado (diluído em 1:50). A placa foi então incubada a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em câmara úmida por 90 min. Após este período os poços foram lavados 6 vezes com solução de lavagem diluída 1:20 em PBS 1x, 160  $\mu$ L do cromógeno TMB foi adicionado a cada poço e então o material foi incubado novamente por 30 min em temperatura ambiente. Por fim, 100  $\mu$ L de Stop Solution foi adicionado e a leitura foi feita no leitor SpectraMax Paradigm Software SoftMax Pro 6 a 450/620nm.

### **3.11 Extração de RNA**

O RNA total do sobrenadante da cultura tratada com os compostos derivados da Ut foi extraído através do kit comercial QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 140  $\mu$ L do sobrenadante coletado da cultura foram adicionados a 560 $\mu$ L de *Viral Lysis Buffer*

(AVL) e 5,6  $\mu\text{L}$  de *Carrier RNA*. Essa solução foi então homogeneizada no vortex por 15 segundos e incubada por 10 min em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto e a mistura foi transferida para a coluna, fornecida pelo fabricante, e centrifugada a 12000 x *g* por 1 min. O filtrado foi descartado e o RNA, retido na coluna, foi lavado por duas vezes, sendo a última centrifugação por 4 min para secar a coluna. Por fim, foram adicionados 60  $\mu\text{L}$  de solução de eluição em cada amostra, seguindo-se de incubação por 5 min em temperatura ambiente e centrifugação a 12000 x *g* por 1 minuto. O filtrado contendo o RNA foi armazenado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o uso.

### 3.12 RT-qPCR

A técnica de RT-PCR em tempo real para quantificação foi aplicada de acordo com os protocolos preconizados pelo Ministério da Saúde. Para detecção do vírus CHIKV e DENV foram utilizados os protocolos descritos por Lanciotti e cols. (2007) e Johnson e cols. (2005), respectivamente, e o equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, EUA), sendo a quantificação realizada utilizando-se uma curva padrão com o título viral já conhecido.

### 3.13 Análises estatísticas

Todos os resultados gerados neste estudo foram submetidos a testes estatísticos. Por meio de testes de avaliação da normalidade das amostras (Kolmogorov-Smirnov - KS) foram aplicados os testes estatísticos específicos para determinar a significância das diferenças observadas na cultura submetida a diferentes condições experimentais, utilizando-se o *software GraphPad Prism version 6.05* para Windows. Para as comparações entre as condições de tratamento e controle foi aplicado o teste-*t não-pareado*. Porém, para análises de grupos foi utilizado teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn*. Todas as projeções gráficas dos resultados obtidos foram realizadas com o *software GraphPad Prism 6.05*.

### **3.14 Considerações éticas**

Este estudo foi desenvolvido no contexto de um projeto principal aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz sob o CAAE-57221416.0.1001.5248, Plataforma Brasil, intitulado “Dengue, Zika e Chikungunya: uma abordagem multidisciplinar em apoio a investigação destas arboviroses no Brasil, 2017”, com o número de parecer 2.760.114. O laboratório de Imunologia Viral já realizou seu Cadastro no Sistema de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com número A82B6B9.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Produção da massa viral de DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 e CHIKV em células Vero e titulação viral

O crescimento da massa viral dos sorotipos de DENV e do CHIKV foi realizado utilizando-se a linhagem Vero, obtida de células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Amostras séricas com diagnóstico positivo de infecção por DENV ou CHIKV foram previamente diluídas e inoculadas nas monocamadas confluentes. A presença de partículas virais infecciosas foi acompanhada através da observação de efeito citopático e foram confirmadas pela RT-qPCR em tempo real. Quantificados através do método de *plaque*, DENV-2 apresentou título viral de  $1,3 \times 10^7$  PFU/mL e CHIKV,  $3 \times 10^7$  PFU/mL. Os sorotipos 1, 3 e 4 de DENV foram quantificados através da RT-qPCR do RNA presente no sobrenadante da cultura. O sorotipo 1 apresentou título de  $2,90 \times 10^9$  cópias/mL, o sorotipo 3 de  $6,59 \times 10^8$  cópias/mL, e, o sorotipo 4, de  $2,88 \times 10^6$  cópias/mL (Quadro 2).

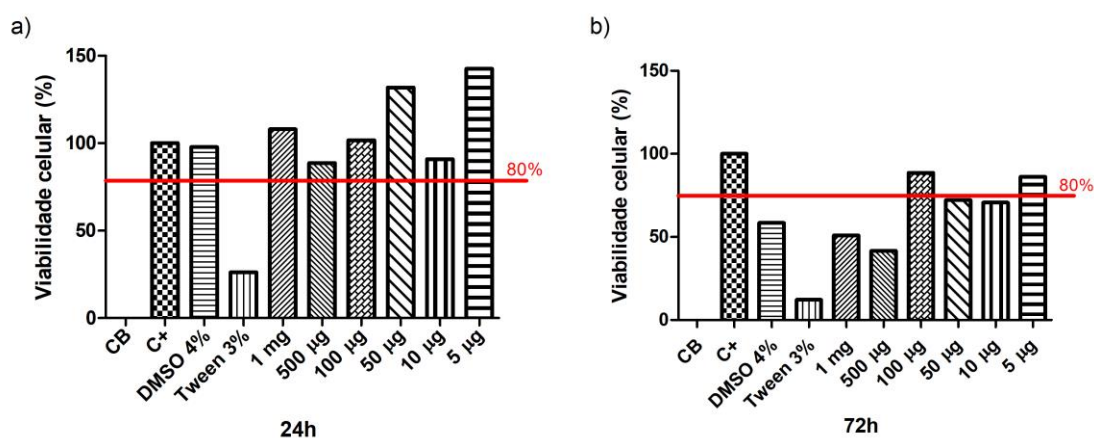
**Quadro 2:** Titulação dos quatro sorotipos de DENV e do CHIKV, realizada através da técnica de RT-qPCR e do método de *plaque*.

Vírus	Título viral
DENV-1	$2,90 \times 10^9$ cópias/mL
DENV-2	$1,3 \times 10^7$ PFU/mL
DENV-3	$6,59 \times 10^8$ cópias/mL
DENV-4	$2,88 \times 10^6$ cópias/mL
CHIKV	$3 \times 10^7$ PFU/mL

### 4.2 Avaliação da citotoxicidade do extrato de Ut em células HuH-7

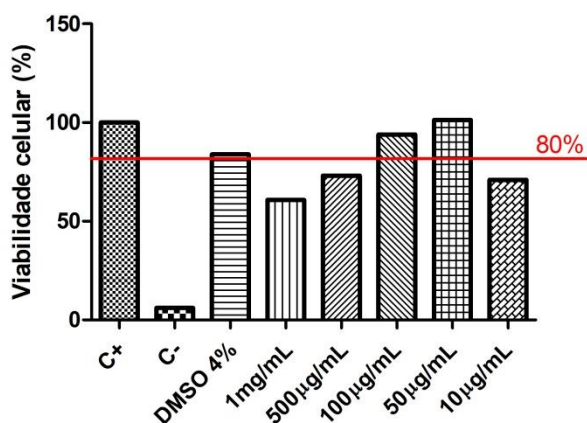
Previamente à avaliação do potencial antiviral do extrato de Ut, sua citotoxicidade foi investigada em ambas células de linhagem utilizadas, e avaliada pelo ensaio de MTT. Para isso, a linhagem de hepatócitos HuH-7 foi tratada com

diferentes concentrações do extrato de Ut, ao longo de 24h e 72h, para determinação das concentrações não tóxicas para as células. Nas primeiras 24h, as células apresentaram viabilidade acima de 80% frente a todas as concentrações utilizadas, como pode ser observado na Figura 15.a. As células tratadas com Ut apresentaram viabilidade acima dos 100% considerados para as células do controle positivo para a viabilidade, não tratadas com Ut (C+). Ao fim do ensaio, após as 72h, as concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 5 µg/mL mantiveram viabilidade igual ou acima de 80% (Figura 15.b). O solubilizador Tween 20 utilizado como controle negativo (C-) para a viabilidade neste ensaio, reduziu para 26% a viabilidade dos hepatócitos após 24h de incubação, e para 16% após 72h. Por sua vez, o DMSO, substância utilizada para solubilizar o extrato de Ut, apenas reduziu a viabilidade após 72h, para 58%. (Figura 15.b).



**Figura 15:** Viabilidade celular (%) da linhagem de células HuH-7 tratada com Ut, após 24h (a) e 72h (b). A média das triplicatas das densidades ópticas do C+ foi considerada como 100% de viabilidade. As linhas horizontais vermelhas indicam 80% de viabilidade. N=1 teste independente com as médias das triplicatas por ponto analisado. CB: controle branco de poço sem células, C+: controle positivo de células não tratadas.

Como pode ser observado na Figura 16 para a linhagem de células Vero, ao fim de 72h de incubação, a viabilidade foi mantida acima de 80% frente ao tratamento com as concentrações de 100 e 50 µg/mL do extrato de Ut.



**Figura 16:** Viabilidade celular (%) da linhagem de células Vero tratada com Ut (72h). A média das triplicatas das densidades ópticas do C+ foi considerada como 100% de viabilidade. A linha horizontal vermelha indica 80% de viabilidade. N=1 teste independente com as médias das triplicatas por ponto analisado. C-: controle negativo contendo Tween 20, C+: controle positivo de células não tratadas.

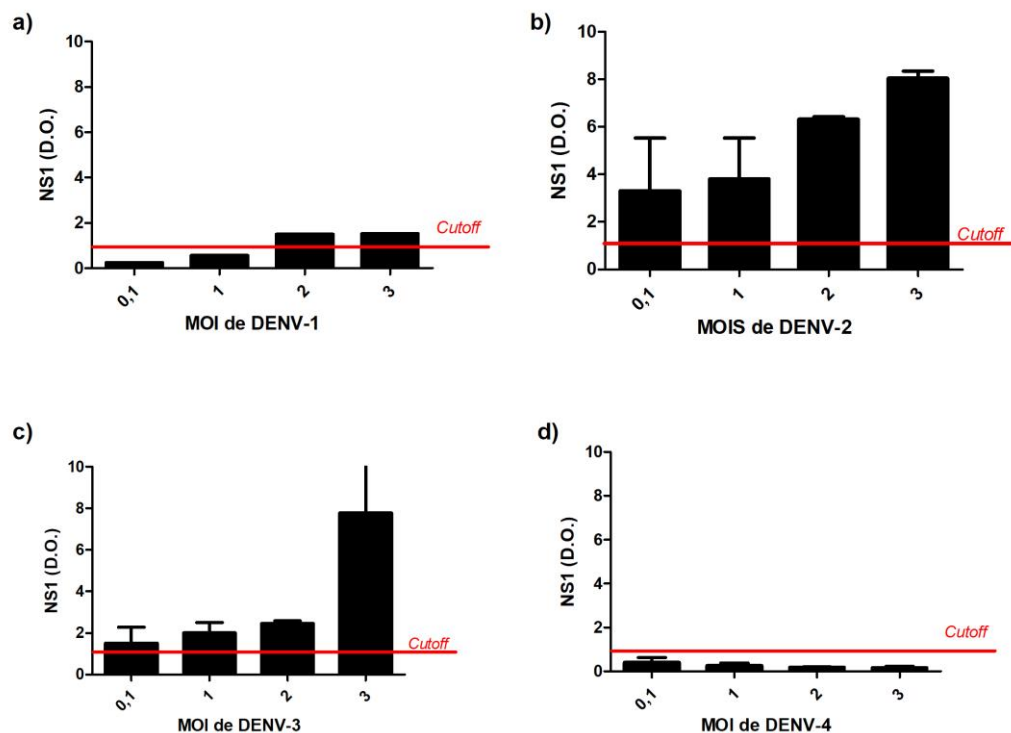
Frente a esses achados, as concentrações não tóxicas de 100 e 50 µg/mL do extrato de Ut foram selecionadas para os ensaios de atividade antiviral.

### 4.3 Dengue

#### 4.3.1 Linhagem de células HuH-7

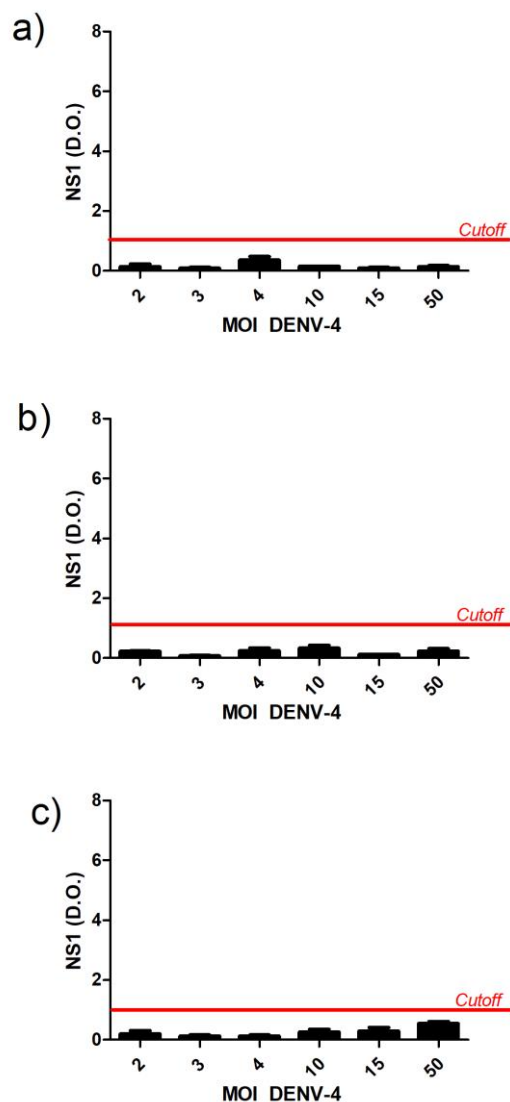
##### 4.3.1.1 Padronização do modelo de infecção *in vitro* pelos DENV 1,2,3 e 4 utilizando a linhagem células HuH-7

A padronização da infecção *in vitro* consistiu na investigação da susceptibilidade das células HuH-7 às cepas brasileiras do DENV, através da realização da dosagem da proteína não-estrutural-NS1, marcador de infecção por esse vírus. Multiplicidades de infecção (MOI) de 0,1, 1, 2 e 3, estimadas através da relação do título viral e a quantidade de células infectadas, foram calculadas a partir da titulação realizada para cada cepa viral e utilizadas para infectar as células. Como pode ser observado na Figura 17, após 48h de incubação, o DENV-1 foi detectável através da proteína NS1, a partir da MOI 2 (a), enquanto o DENV-2 e DENV-3 já foram detectáveis com MOI de 0,1 (b e c, respectivamente), enquanto o DENV-4 não foi detectado em nenhuma das quatro MOI testadas (d).



**Figura 17:** Padronização da infecção *in vitro* de células HuH-7 com cepas brasileiras de DENV-1 (a), DENV-2 (b), DENV-3 (c) e DENV-4 (d). Os dados referem-se à detecção da proteína viral NS1, presente no sobrenadante de cultura, coletado após 48h de incubação. As linhas vermelhas horizontais indicam o *cutoff* (densidade óptica= 1,0). N= 1 teste independente com as médias das triplicatas por ponto analisado.

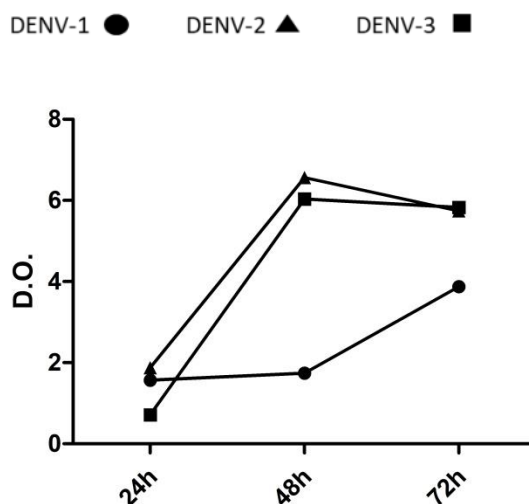
Com intuito de investigar se a ausência de replicação viral nas células infectadas pelo DENV-4 seria devido à MOI utilizada ou cinética de infecção, realizamos a infecção destas células com as MOIs 3, 4, 10, 15 e 50 após 24h, 48h e 72h. No entanto, conforme pode ser observado na Figura 18, níveis baixos de NS1 foram detectados nos sobrenadantes das culturas de células infectadas com MOI mais elevadas, e durante toda a cinética de 24h (a), 48h (b) e 72h (c), apresentaram leituras de densidades ópticas inferiores ao *cutoff*. Estas observações apontam para uma dificuldade de detecção da infecção de HuH-7 por DENV-4 através da secreção da proteína NS1, portanto, o sorotipo 4 não foi incluído nos ensaios seguintes.



**Figura 18:** Padronização da infecção das células HuH-7 com a cepa brasileira de DENV-4. Detecção da proteína viral NS1 presente no sobrenadante da cultura com 24 (a), 48 (b) e 72 (c) horas de infecção. As linhas vermelhas horizontais indicam o *cutoff* (densidade óptica= 1,0). N=1 teste independente com as médias das triplicatas por ponto analisado. DO: densidade óptica.

O próximo passo foi avaliar a cinética de infecção das cepas brasileiras DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Para este propósito, a dosagem da proteína NS1 presente no sobrenadante das culturas, foi realizada durante três dias consecutivos de infecção das células HuH-7, ou seja, com 24, 48 e 72 horas de incubação. Foram utilizadas MOI 2 para DENV-1, e MOI 3 para DENV-2 e DENV-3. O pico da infecção foi observado com 48h tanto para o DENV-2 quanto para o DENV-3, seguido de ligeira queda com 72h. Por outro lado, o DENV-1 apresentou uma cinética diferente, com um crescimento mais lento ocorrendo até as 72h de infecção (Figura 19).





**Figura 19:** Cinética da infecção de DENV-1, DENV-2 e DENV-3 em células HuH-7 durante 24, 48 e 72h. Dosagem da proteína NS1 pela técnica de ELISA. Para DENV-1 foi utilizado MOI 2, e para DENV-2 e 3, MOI 3. N= 1 teste independente com a média das triplicatas por ponto analisado. DO: densidade óptica.

Portanto, tempos diferenciados de replicação viral em células HuH-7 são observados entre DENV-1 e DENV-2/3 e devem ser considerados.

#### **4.3.1.2 Estabelecimento do modelo de infecção *in vitro* de células HuH-7 pelos vírus DENV para estudo do efeito antiviral do extrato hidroalcoólico de Ut.**

Após a identificação das concentrações não citotóxicas do extrato de Ut, teve início a avaliação da sua atividade antiviral frente aos sorotipos 1-3 de DENV no modelo *in vitro* de infecção de células HuH-7, derivada de hepatocarcinoma humano. Foram aplicadas 2 metodologias para avaliação da atividade viral: citometria de fluxo e ELISA.

##### **4.3.1.2.1 Avaliação da atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de Ut, em células HuH-7 infectadas com DENV-1 e DENV-2, determinada pela citometria de fluxo**

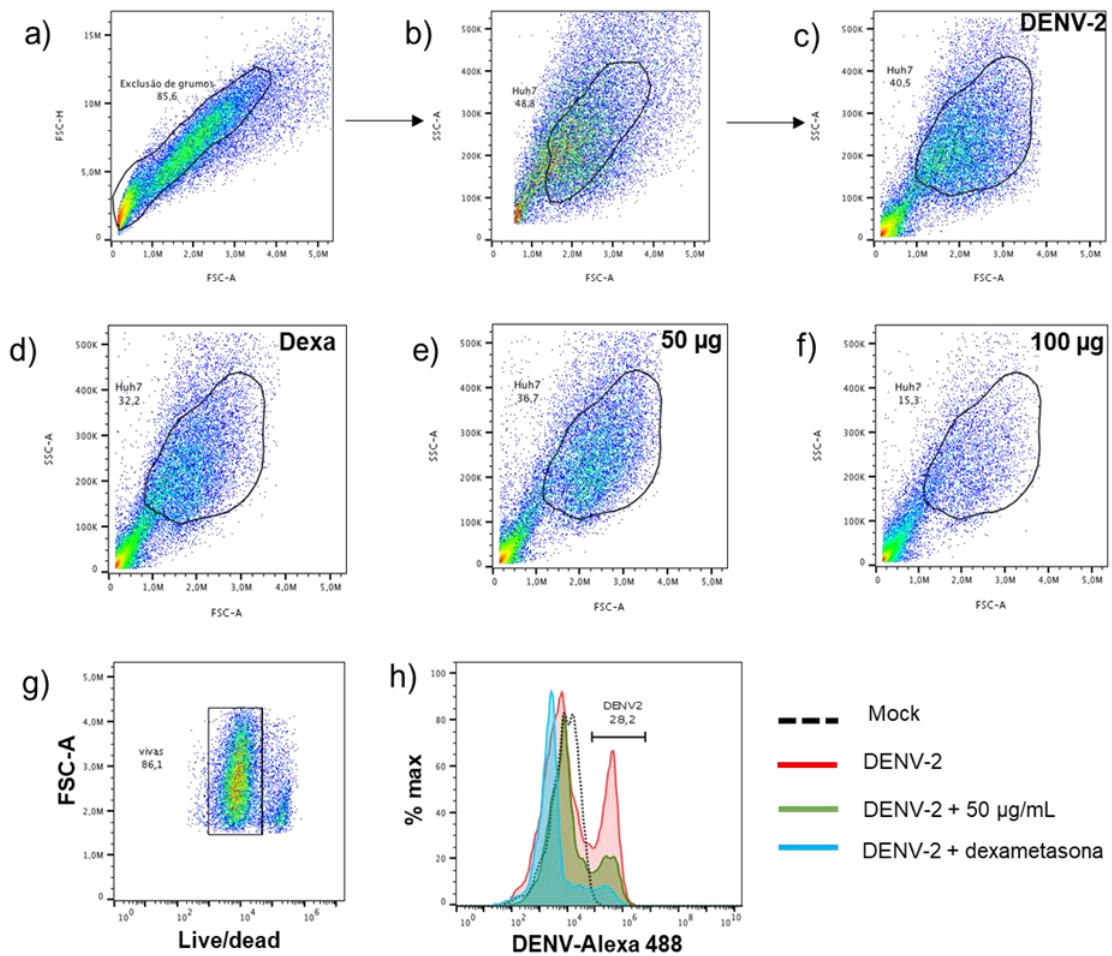
Os hepatócitos (células HuH-7) foram infectados pelo DENV-2 utilizando-se uma MOI 3, e pelo DENV-1, com MOI 2, e avaliados 48h após a infecção por citometria de fluxo, através da qual foram determinadas as frequências das células infectadas na presença e/ou ausência de extratos de Ut. A Figura 20 representa a estratégia de análise por citometria de fluxo utilizada. Inicialmente foi realizada a

exclusão de grumos (ou *doublets*) celulares (Fig. 20.a), e a região contendo apenas células isoladas foi considerada para a definição das células HuH-7, de acordo com parâmetros de tamanho (FSC – do inglês *Forward Scatter*) e de granulosidade (SSC – do inglês *Side Scatter*), correspondendo a cerca de 50% do total (Fig. 20.b). As células não infectadas não apresentaram marcação intracelular para o antígeno viral (DENV), enquanto a infecção pelo DENV-2 resultou em cerca de 28% de células positivas para antígeno viral (Média:  $25 \pm 5,2$ ) (Figura 20.h e Figura 21.a).

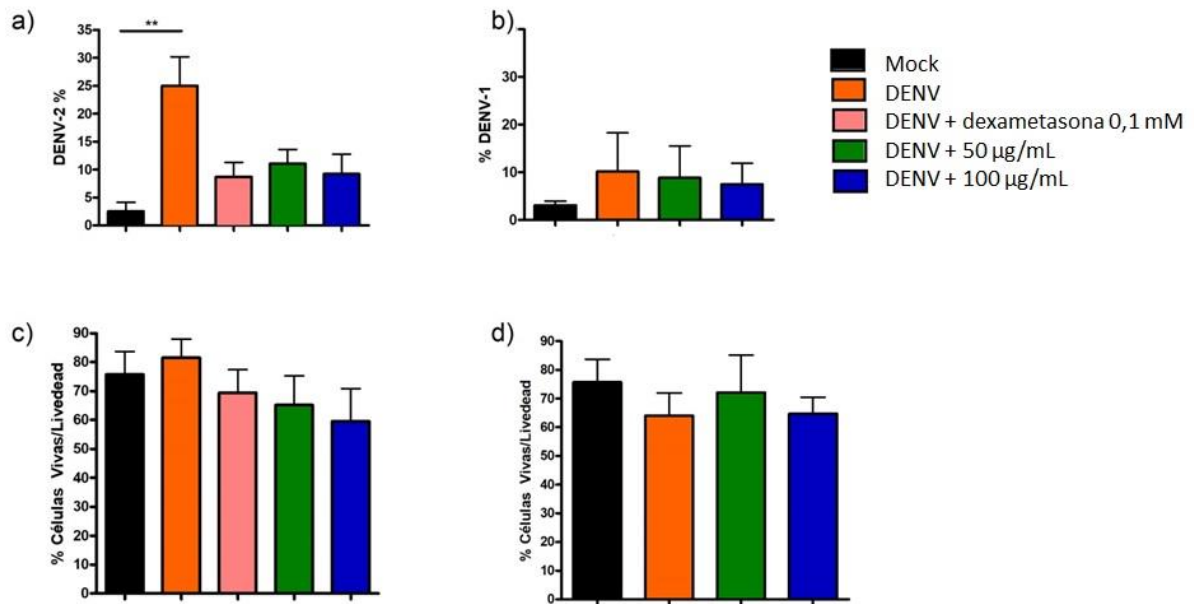
Os parâmetros FSC e SSC também foram analisados para as células HuH-7 infectadas e submetidas a diferentes tratamentos: dexametasona (Reis et al. 2007), Ut nas concentrações de 50  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Apesar do ensaio de MTT ter identificado a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  de Ut como não citotóxica para HuH-7 (Figura 15), foi possível observar através do ensaio de citometria de fluxo que, frente a essa concentração de Ut, os hepatócitos apresentaram alteração no perfil de FCS e SSC, com a redução da frequência de células detectadas, além de redução no percentual de viabilidade (Média:  $59 \pm 11$ ), sugerindo um possível efeito citotóxico (Figura 20.f e Figura 21.c). Para o tratamento das culturas com dexametasona a 0,1 mM também foi possível observar redução no percentual de célula viáveis (Média:  $69 \pm 7,9$ ) (Figura 21.c).

De modo interessante, a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , do extrato foi capaz de reduzir em 63% a infecção pelo DENV-2 em HuH-7, enquanto que para o controle de dexametasona a 0,1 mM, a redução foi de 65% (Figura 20.h e Figura 21.a), embora estas reduções não tenham apresentado significância estatística

Em relação ao DENV-1, não foram observadas diferenças entre as células infectadas, tratadas ou não com os extratos de Ut (Figura 21.b).



**Figura 20:** Estratégia de análise por citometria de fluxo, das células HuH-7 quanto à atividade antiviral do extrato de Ut. (a) Exclusão de grumos. (b) Perfil de tamanho (FCS) e granulosidade (SSC) das células HuH-7 em cultura não infectada. (c) Perfil FSC versus SSC das células HuH-7 em cultura infectada pelo DENV-2. (d) Perfil FSC versus SSC das células HuH-7 em cultura infectada pelo DENV-2 e tratadas com dexametasona 0,1 mM, (e) tratadas com 50 µg/mL de Ut, e (f) tratadas com 100 µg/mL de Ut. (g) Definição de células viáveis pelo tamanho (FSC) e fluorescência negativa. (h) Histograma das intensidades de fluorescências intracelular para o antígeno DENV sem tratamento (vermelho) e sob tratamento com Dexametasona (azul) e 50 µg/mL de Ut (verde). A linha tracejada no histograma representa o controle negativo (mock).

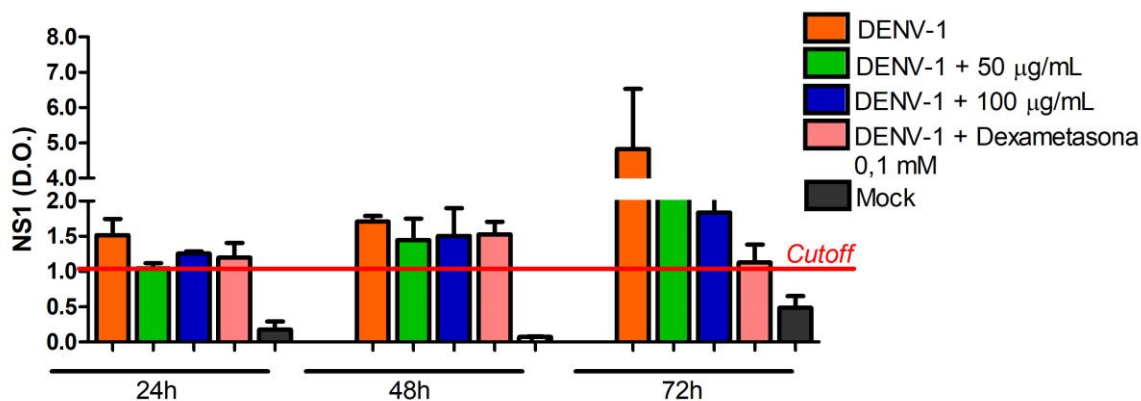


**Figura 21:** Frequência de infecção (a, b) e viabilidade (c, d) das células HuH-7. As células foram infectadas por DENV-2 (a, c) e DENV-1 (b, d) por 48h e tratadas ou não com dexametasona ou com duas concentrações de Ut: 50 µg/mL e 100 µg/mL. N= 2 testes independentes apresentados como média e desvio padrão das duplicatas. Os valores foram submetidos ao teste ONE WAY-ANOVA e \*\* p < 0,005. Mock: controle negativo.

#### 4.3.1.2.2 Avaliação da atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de Ut, determinado pela dosagem de NS1 secretada, em linhagem de células HuH-7 infectadas pelos sorotipos 1, 2 e 3 de DENV

Uma vez que a atividade antiviral foi observada através da citometria de fluxo, o próximo passo foi avaliar a atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de Ut através da dosagem da proteína não-estrutural NS1 nos sobrenadantes das culturas de HuH-7 infectadas, pela técnica de ELISA. Como previamente mostrado (Figura 19) para as células infectadas pelo DENV-1, com MOI 2, após 24 e 48h foram detectadas dosagens baixas da proteína NS1 nos sobrenadantes das culturas, aumentando após 72h. Portanto, a redução nas dosagens de NS1 pode ser observada, de fato, após 72 horas de tratamento (Figura 22), com um aparente controle da atividade viral.

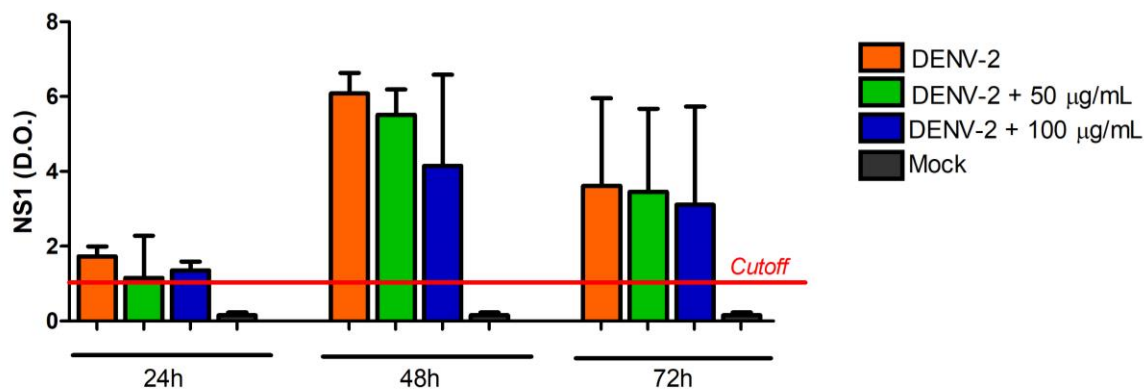
Durante a cinética de infecção de 24, 48 e 72h, as porcentagens de inibição da infecção por DENV-1 alcançadas com 100 µg/mL de extrato de Ut foram de 31,2%, 15,3% e 57%, respectivamente. O tratamento com 50 µg/mL causou ligeira redução na infecção: 17,5%, 11,8% e 11,3%, respectivamente.



**Figura 22:** Detecção da proteína não estrutural NS1 nos sobrenadantes de cultura de HuH-7, 24h, 48h e 72h após infecção com DENV-1 e tratamento com concentrações não citotóxicas de Ut. N=1 teste independente, com triplicatas em cada ponto, representadas como médias e desvios padrão. A linha vermelha horizontal indica o *cutoff* (densidade óptica= 1,0). Mock: controle negativo; DO= densidade óptica.

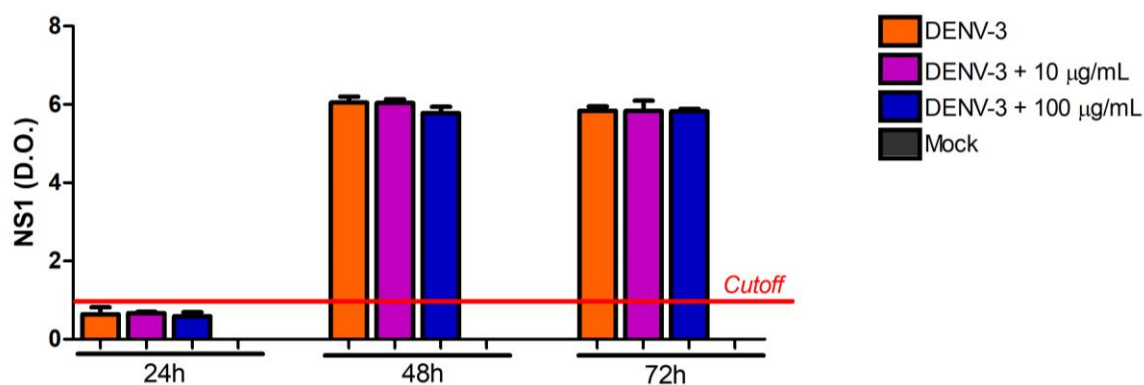
Para DENV-2, como previamente mostrado na Figura 21, a dosagem de NS1 atingiu o pico com 48h (Figura 19). No entanto, durante os três pontos da cinética avaliados (24h/48h/72h), as células HuH-7 infectadas com MOI 3, e tratadas com as concentrações 100 µg/mL e 50 µg/mL, apresentaram redução nas dosagens da proteína NS1 em comparação ao controle infectado (Figura 23). Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas através dos testes estatísticos, observou-se que a concentração de 100 µg/mL foi capaz de inibir a infecção em 21,7%, 34,2%, e 27,9%, com 24h, 48h e 72h, respectivamente.

Durante o tratamento com 50 µg/mL não houve inibição da infecção segundo o cálculo de porcentagem de infecção/inibição em relação ao controle.



**Figura 23:** Detecção da proteína não estrutural NS1 nos sobrenadantes de cultura de HuH-7, 24h, 48h e 72h após infecção com DENV-2 e tratamento com concentrações não citotóxicas de Ut. N=2 testes independentes, com triplicatas em cada ponto, representadas como médias e desvios padrão. A linha vermelha horizontal indica o *cutoff* (densidade óptica= 1,0). Mock: controle negativo; DO= densidade óptica.

Na infecção de hepatócitos humanos HuH-7 por DENV-3, foram observadas dosagens elevadas de proteína NS1 nos sobrenadantes das culturas a partir do segundo dia de infecção, como inicialmente observado (Figura 19 e Figura 24), mantidas até o terceiro dia. Em relação ao tratamento destas células infectadas, não foram observadas diferenças nas dosagens da proteína NS1 em células tratadas com 100 e 10 µg/mL de Ut, nos momentos da cinética de infecção avaliados (Figura 24).

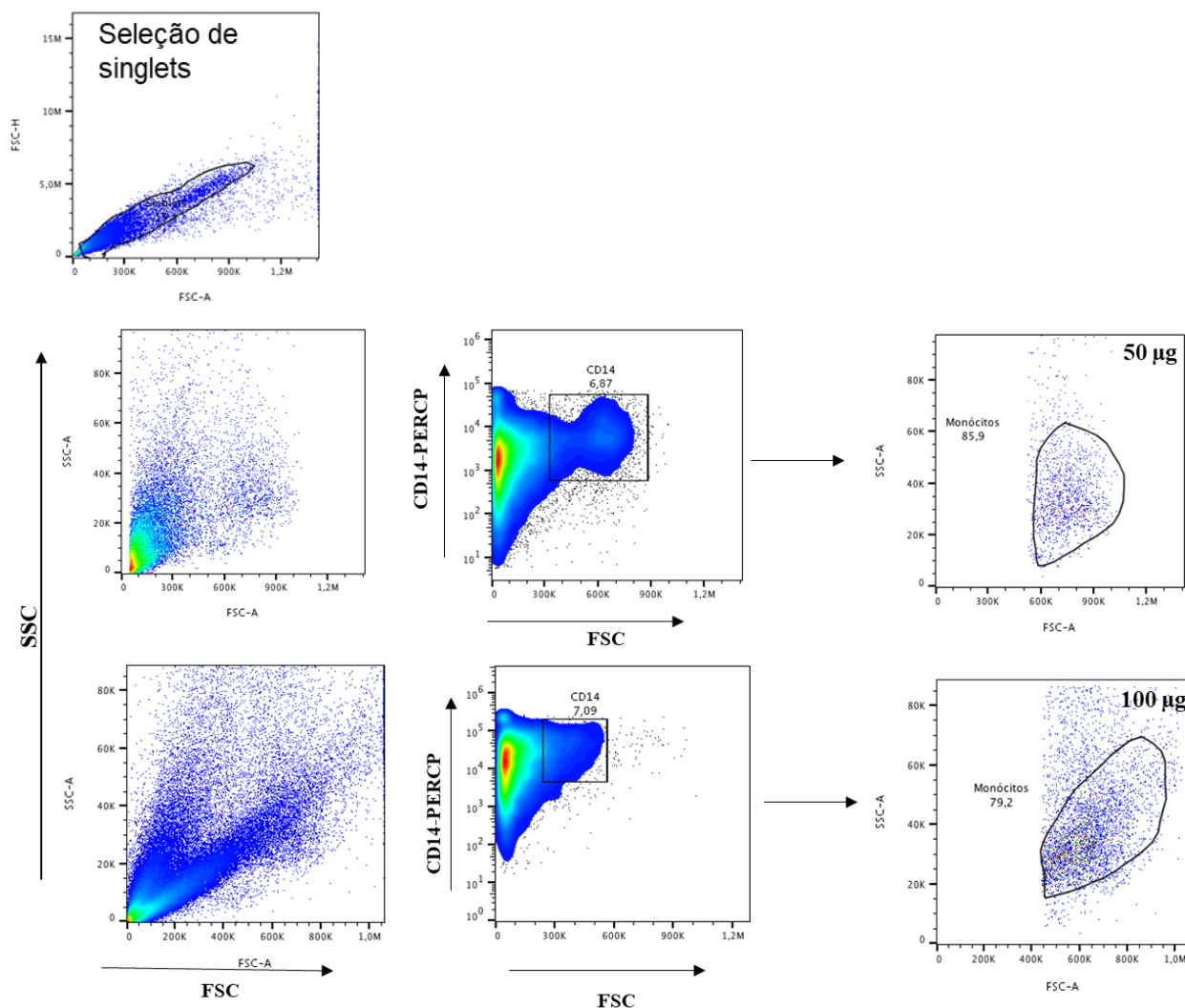


**Figura 24:** Detecção da proteína não estrutural NS1 nos sobrenadantes de cultura de HuH-7, 24h, 48h e 72h após infecção com DENV-3 e tratamento com concentrações não citotóxicas de Ut. N=1 teste independente, com triplicatas em cada ponto, representadas como médias e desvios padrão. A linha vermelha horizontal indica o *cutoff* (densidade óptica= 1,0). Para análise estatística foram utilizados ONEWAY-ANOVA e teste-t. Mock: controle negativo; D.O.= densidade óptica.

### **4.3.2 Monócitos**

#### **4.3.2.1 Avaliação da atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de Ut, determinada por citometria de fluxo, em monócitos infectados por DENV-2**

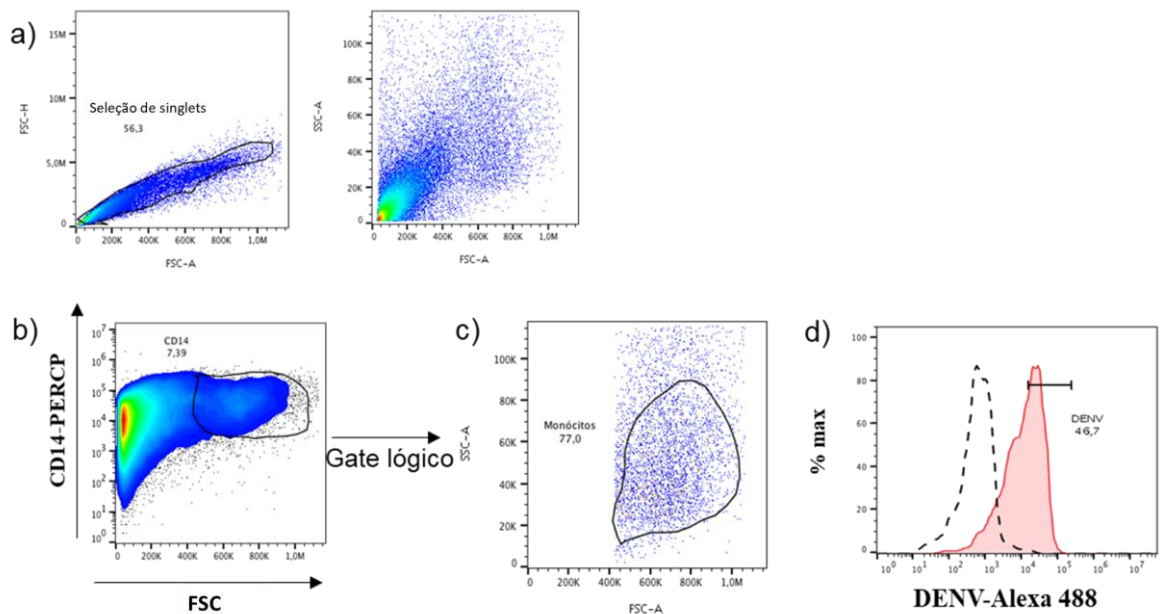
De modo a investigar a atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de Ut contra DENV-2 em células primárias humanas, foi utilizado como modelo *in vitro* monócitos humanos purificados e infectados pelo DENV-2, com MOI 3. Inicialmente, foram analisados parâmetros de FSC e SSC nos monócitos tratados com extratos de Ut nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, como pode ser observado na Figura 25. Foi possível observar que na concentração 100 µg/mL de Ut, as culturas celulares apresentaram alteração no perfil de FCS e SSC, novamente sugerindo possível efeito citotóxico (Figura 25).



**Figura 25:** Estratégia de análise por citometria de fluxo de monócitos, quanto à citotoxicidade do extrato de Ut. Os grupos foram excluídos para a definição dos perfis FSC versus SSC de monócitos purificados e tratados com extrato de Ut nas concentrações de 50 µg/mL e 100 µg/mL, e identificados através do anticorpo monoclonal anti-CD14.

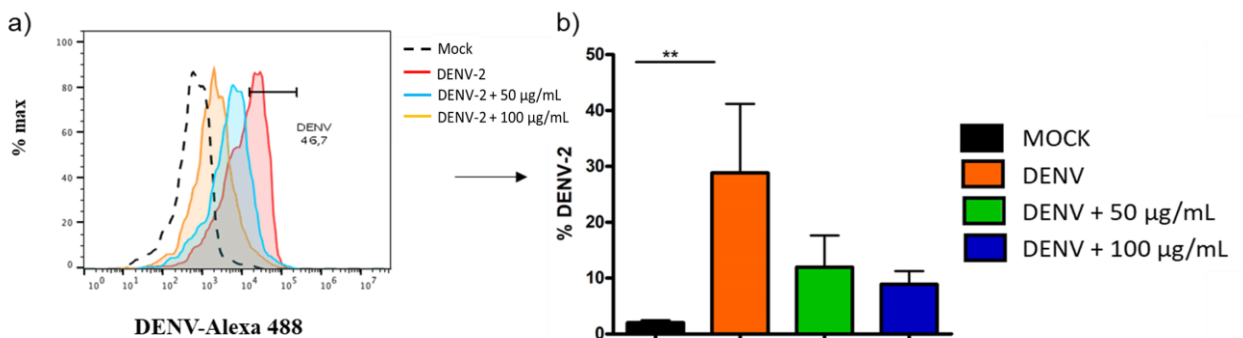
Após a incubação dos monócitos previamente infectados pelo DENV-2 por 48h, e sua definição por FSC versus SSC (Figura 26.a) e através da expressão da molécula de CD14 (Figura 26.b) foi observada uma robusta detecção dos antígenos virais intracelulares por citometria de fluxo (Figura 26.d). Através desse método, foi possível observar uma frequência elevada no percentual de células positivas para antígeno viral, o que ficou mais evidente em comparação ao mock (Figura 26.d e Figura 27.a), cujas diferenças foram significativas (Médias:  $28,0 \pm 11,0$  vs.  $2,0 \pm 0,4$ , respectivamente; Figura 27.b).





**Figura 26:** Estratégia de análise por citometria de fluxo de monócitos, quanto a infecção por DENV-2. Os grumos foram excluídos para a definição dos perfis FSC *versus* SSC de monócitos purificados e infectados por DENV-2 (a), identificados pela expressão de CD14 (b), pelos parâmetros morfológicos (c), e pela expressão intracelular do antígeno DENV (d). A linha tracejada representa o controle negativo (mock).

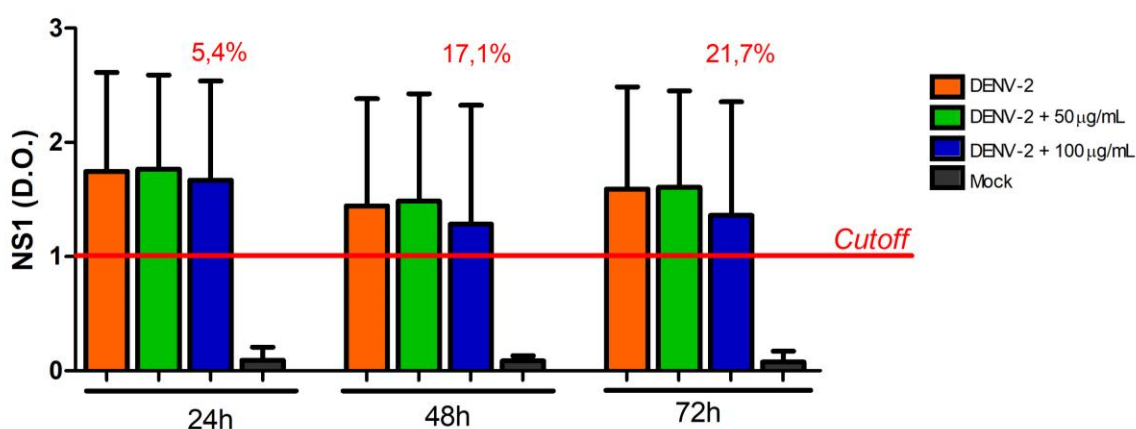
O tratamento dos monócitos infectados com DENV-2 com a concentração de 50 µg/mL de Ut reduziu em 58% a infecção, enquanto a 100 µg/mL inibiu 69%. (Figura 27.b).



**Figura 27:** Análise de monócitos infectados por DENV-2 quanto à atividade antiviral de Ut. (a) Histograma das intensidades de fluorescências intracelular para o antígeno DENV, sem tratamento (vermelho) e sob tratamento com 50 µg/mL (azul) e 100 µg/mL (amarelo) de Ut. A linha tracejada representa o controle negativo (mock). (b) Porcentagens de monócitos positivos para antígeno DENV de 2 doadores, sem tratamento, e com 50 µg/mL e 100 µg/mL de Ut, expressas como médias e desvios padrão. Os valores foram submetidos ao teste ONE WAY-ANOVA e \*\* p < 0,005.

#### 4.3.2.2 Avaliação da atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de *Ut*, determinado pela dosagem de NS1 secretada, em monócitos infectados pelo DENV-2

Ao avaliar a dosagem da proteína NS1 no sobrenadante de monócitos infectados pelo DENV-2, com MOI 3, e tratados com as concentrações 100 e 50 µg/mL de *Ut*, foi possível observar uma redução percentual com 100 µg/mL do extrato de *Ut*, já nas primeiras 24h de infecção (Figura 28). A porcentagem de inibição da infecção foi crescente ao longo da cinética, embora as análises estatísticas tenham demonstrado não haver diferenças significativas entre as médias. Após 24h de tratamento, a infecção foi reduzida em 5,4%, após 48h, houve inibição de 17,1%, e ao fim das 72h foi registrada inibição de 21,7% na infecção pelo DENV-2, em relação ao controle de células infectadas não tratadas (Figura 28). No tratamento com 50 µg/mL não foi observada redução na detecção da proteína NS1 assim como na porcentagem de infecção (Figura 28).

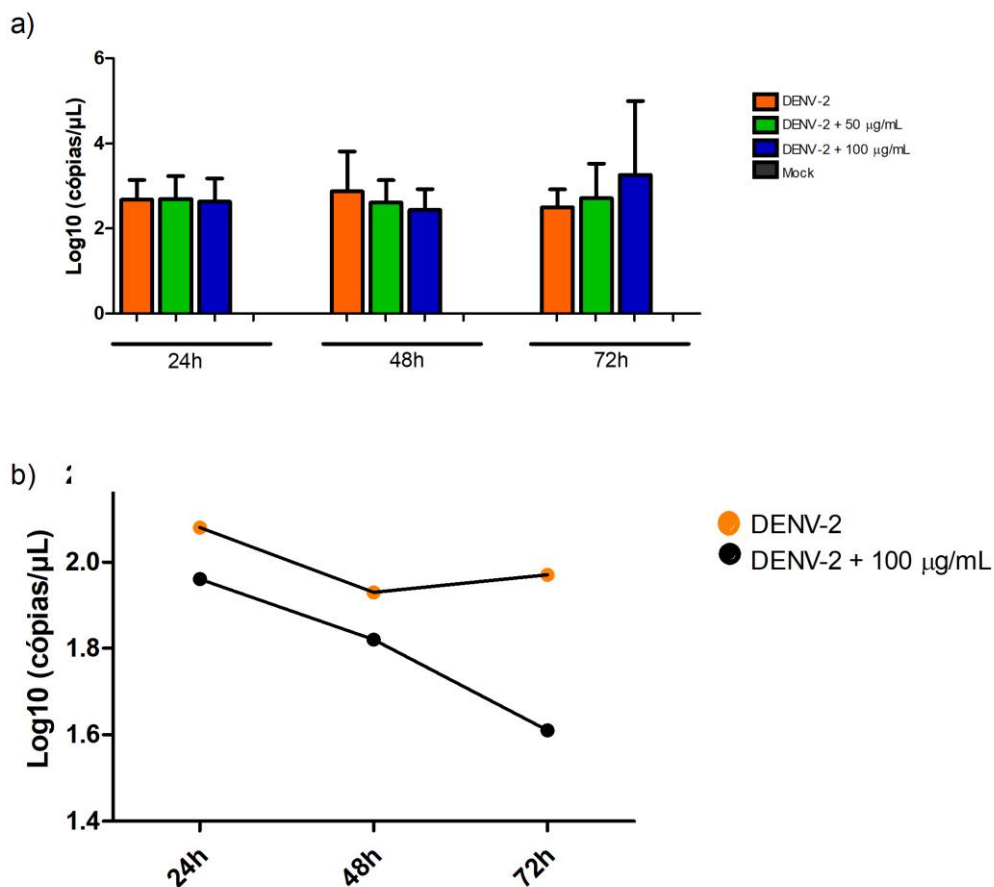


**Figura 28:** Dosagem da proteína não estrutural NS1 nos sobrenadantes de monócitos humanos, 24h, 48h e 72h após infecção com DENV-2, e em tratamento com concentrações não citotóxicas do extrato de *Ut*. N=3 testes independentes, com triplicatas em cada ponto, representadas como médias e desvios padrão. A linha vermelha horizontal indica o *cutoff* (densidade óptica= 1,0). Valores percentuais referentes à inibição da atividade viral representadas em vermelho. Mock: controle negativo; D.O.= densidade óptica.

#### 4.3.2.3 Avaliação da atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de *Ut*, determinado pela RT-qPCR, em monócitos infectados pelo DENV-2

Os sobrenadantes de cultura de monócitos infectados por DENV-2 e tratados com extrato de *Ut*, foram avaliados em relação às cópias de RNA viral presentes. No entanto, não houve alteração entre os níveis de carga viral do sobrenadante de

monócitos infectados tratados com Ut e não tratados, após 24h de infecção (Figura 29.a). Entretanto, foi observada uma redução da média da carga viral após 48h de infecção frente ao tratamento com Ut (Figura 29.a). Por outro lado, após 72h de infecção houve aumento no número de cópias de RNA viral. A análise dos doadores individualmente demonstrou um número menor de cópias de RNA presentes no sobrenadante de cultura de células tratadas com 100 µg/mL do extrato de Ut, após 72h de infecção (Figura 29.b).

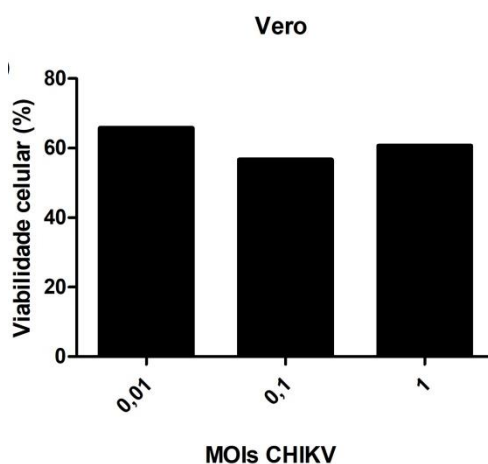


**Figura 29:** Detecção e quantificação do RNA viral nos sobrenadantes de cultura de monócitos humanos, 24h, 48h e 72h de infecção pelo DENV-2, e em tratamento com 50 e 100 µg/mL do extrato de Ut. (a) Média da quantificação do RNA viral de 3 doadores diferentes em duplicatas para cada ponto, (b) média da quantificação do RNA viral de um doador em duplicata para cada ponto. Os valores foram representados como médias e desvios padrão. Mock: controle negativo.

## 4.4 Chikungunya

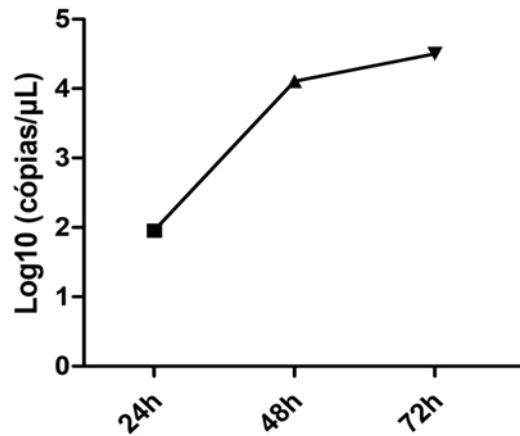
### 4.4.1 Padronização do modelo de infecção pelo CHIKV em células Vero

Para investigar a mortalidade das células de linhagem Vero após a infecção pelo CHIKV, foi realizado o ensaio de redução de MTT nas linhagens celulares infectadas com diferentes MOIs do vírus. Em 72h de infecção, foi observado que as células Vero apresentaram viabilidade entre 56% e 65%, tendo este valor mais alto ocorrido na infecção com MOI 0,01 (Figura 30).



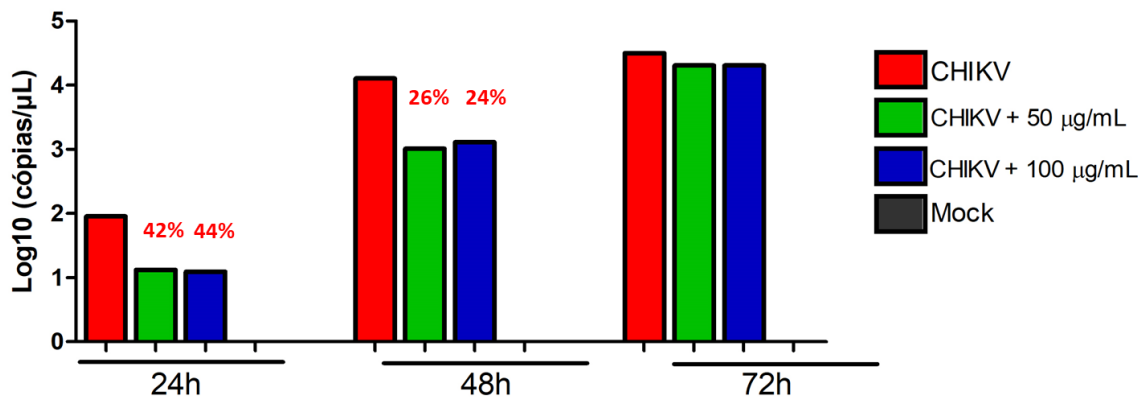
**Figura 30:** Viabilidade (%) das células Vero após 72h de infecção pelo CHIKV, utilizando-se diferentes MOI. N=1 teste independente com as médias das triplicatas em cada ponto analisado.

Inicialmente, o efeito inibitório do extrato de Ut sobre o CHIKV foi avaliado em linhagem de células Vero, a qual é utilizada em caráter de rotina por laboratórios para o isolamento dos arbovírus, principalmente DENV, ZIKV e CHIKV. A cinética foi realizada após 24h, 48h e 72h de infecção, com MOI 0,01, sendo coletados em cada ponto os sobrenadantes para quantificação do RNA viral por RT-qPCR. Como pode ser observado na Figura 31, o número de cópias de RNA foi crescente ao longo dos 3 dias de infecção, em ausência de intervenção com o extrato de Ut, com o pico atingido em 72h.



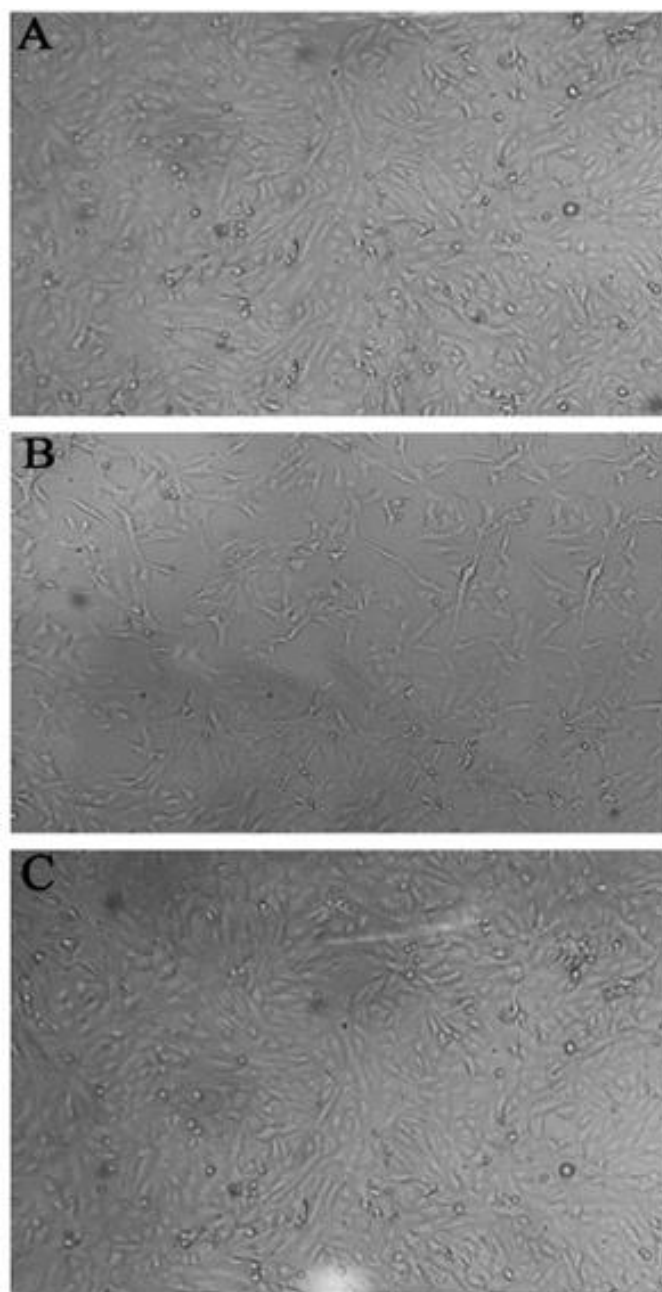
**Figura 31:** Cinética de 24h, 48h e 72h da infecção em células Vero com CHIKV, aferida através da quantificação do RNA viral em sobrenadante de cultura.

Uma vez submetidas essas células ao extrato de Ut, foi observada redução no número de cópias de RNA viral das células tratadas com 100 μg/mL e 50 μg/mL, em 24h e 48h de infecção pelo CHIKV, com MOI 0,01. A redução foi de 44% e 42% do número de cópias de RNA, utilizando-se 100 μg/mL e 50 μg/mL da Ut, respectivamente, após 24h. Com 48h, a redução foi de 24% e 26%, respectivamente (Figura 32).



**Figura 32:** Detecção e quantificação do RNA viral nos sobrenadantes de cultura de células Vero, infectadas pelo CHIKV e tratadas com 50 e 100 μg/mL do extrato de Ut. N=1 teste independente, com as médias das duplicatas em cada ponto. Mock: controle negativo.

Simultaneamente, foi observado em microscopia óptica o efeito citopático (ECP) do CHIKV nas células não tratadas e tratadas com 100 μg/mL do extrato de Ut, após 48h de infecção. Na dose de 100 μg/mL de Ut, o ECP foi menor que o observado para o controle infectado não tratado (Figura 33).

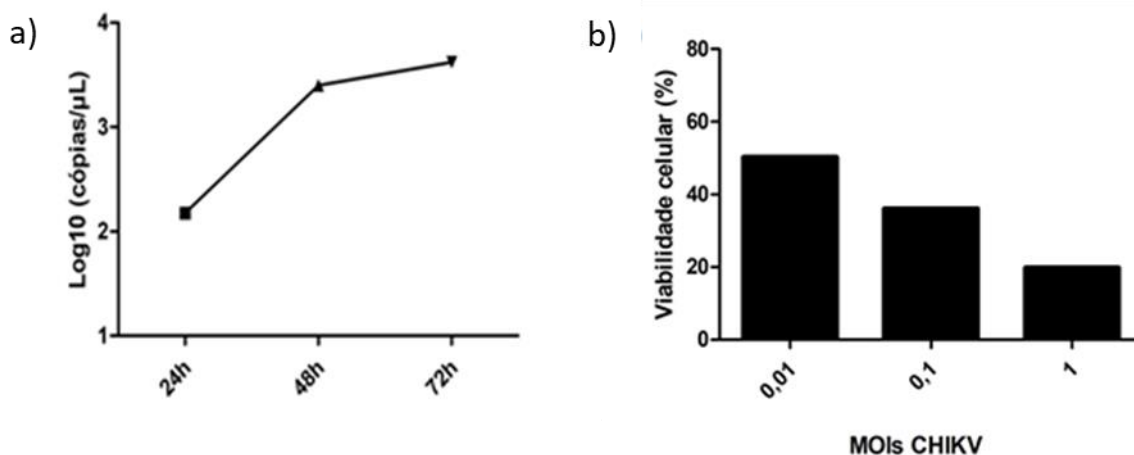


**Figura 33:** Micrografia óptica do ECP em células Vero após 48h de infecção pelo CHIKV. A: controle negativo (sem infecção - Mock), B: controle positivo (com infecção e sem tratamento), e C: células infectadas e tratadas com 100 µg/mL de UT. Aumento de 10x.

#### **4.4.2 Padronização do modelo de infecção pelo CHIKV em células HuH-7**

Após os testes preliminares com células Vero, foi iniciada a padronização da infecção em células de humanos. Utilizando-se a RT-qPCR, foi possível observar a susceptibilidade das células HuH-7 à infecção por CHIKV. Durante a cinética de infecção, foi observado um número crescente de cópias de RNA ao longo dos 3 dias de experimento, com pico da infecção ocorrendo em 72h (Figura 34.a). Quanto ao

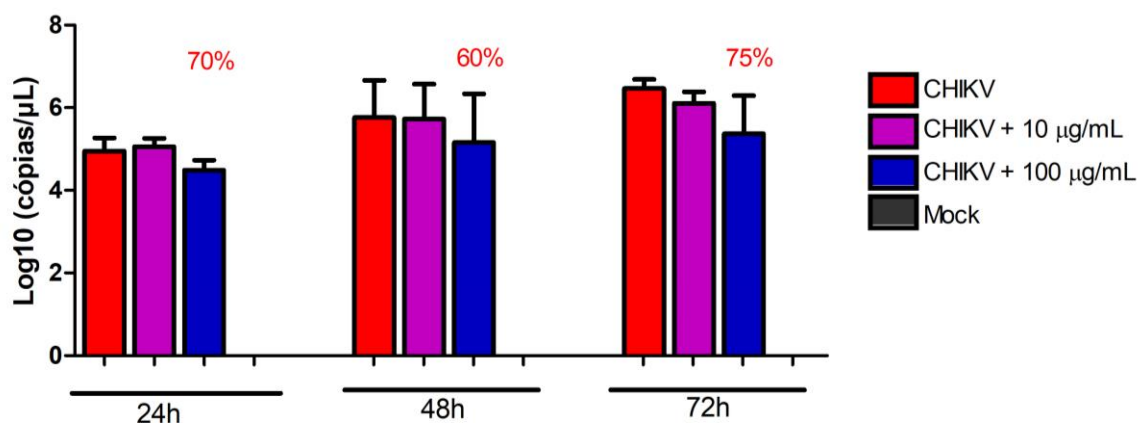
teste de MTT para obter a viabilidade destas células infectadas, em 72h foram encontrados os valores de 20%, 36% e 50% de células viáveis, respectivamente infectadas com MOI 1, 0,1 e 0,01 (Figura 34.b).



**Figura 34:** Padronização da infecção das células HuH-7 pelo CHIKV. (a) Cinética de 24h, 48h e 72h da infecção, avaliada através da quantificação de RNA através da RT-qPCR. (b) Viabilidade das células infectadas com diferentes MOI, avaliada através do ensaio de MTT. N=1 teste independente com as médias das triplicatas em cada ponto analisado.

#### **4.4.2.1 Avaliação da atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de *Ut* determinado pela RT-qPCR**

A atividade antiviral da *Ut* foi, então, avaliada em células HuH-7 infectadas pelo CHIKV, com MOI 0,01. Os resultados demonstram que o tratamento com a concentração de 100  $\mu$ g/mL do extrato de *Ut* foi capaz de inibir em 9,3% (24h), 10,5% (48h) e 17% (72h) a infecção, dada a redução da carga viral no sobrenadante, como pode ser observado na Figura 35.



**Figura 35:** Detecção e quantificação do RNA viral nos sobrenadantes de cultura de células HuH-7, infectadas pelo CHIKV e tratadas com 10 e 100 µg/mL do extrato de Ut. N=1 teste independente, com as médias e desvios padrão das duplicatas em cada ponto. Valores percentuais referentes à inibição da atividade viral representadas em vermelho. Mock: controle negativo.

#### 4.4.3 Monócitos

##### 4.4.3.1 Avaliação da atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de Ut, determinado por citometria de fluxo, em monócitos infectados pelo CHIKV

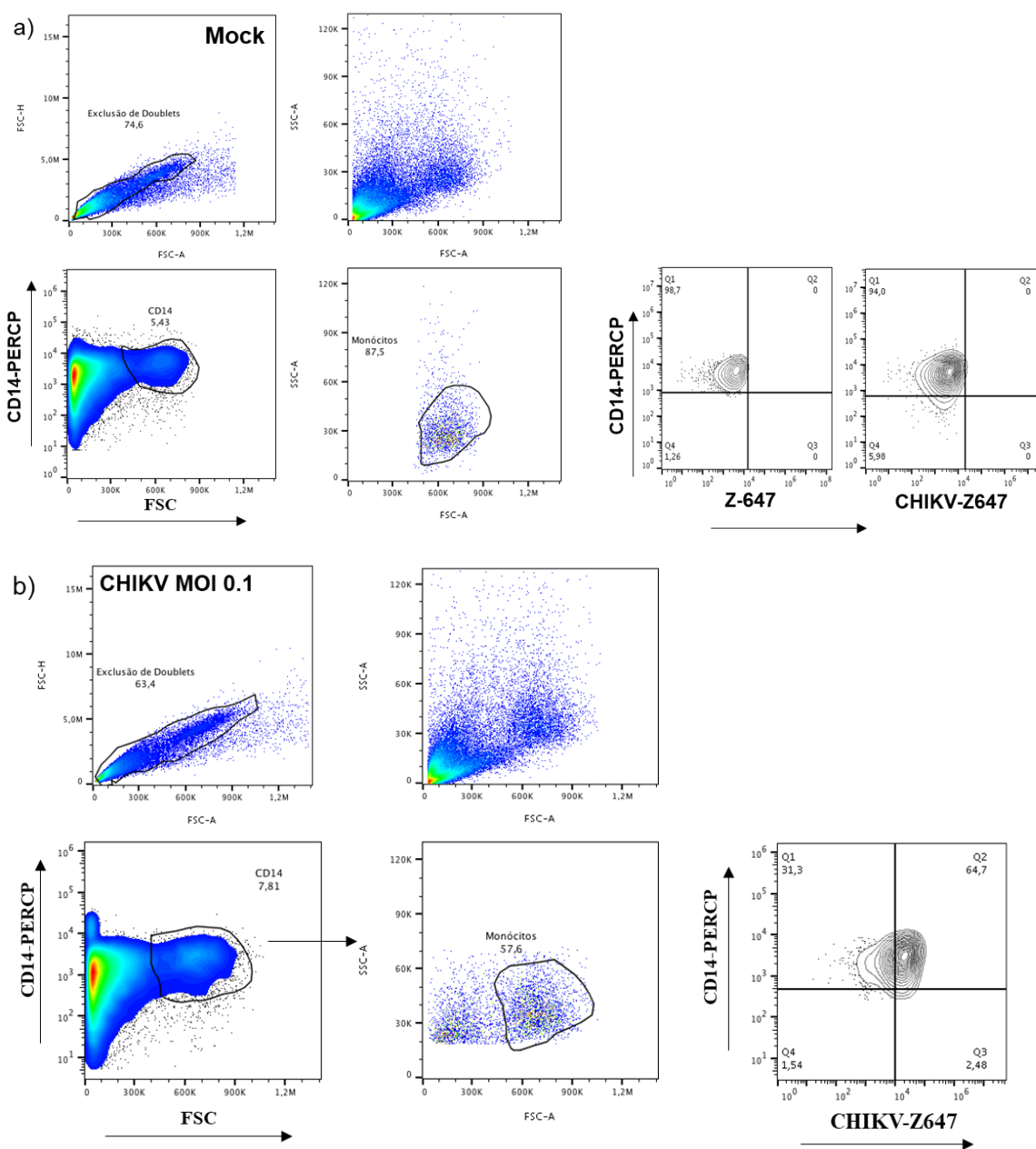
De modo a investigar a atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de Ut sobre o CHIKV, em células primárias humanas, foi utilizado como modelo *in vitro* monócitos humanos purificados. Essas células foram então, infectadas pelo CHIKV com MOI 0,1 e 0,01 (Figuras 36 e 37).

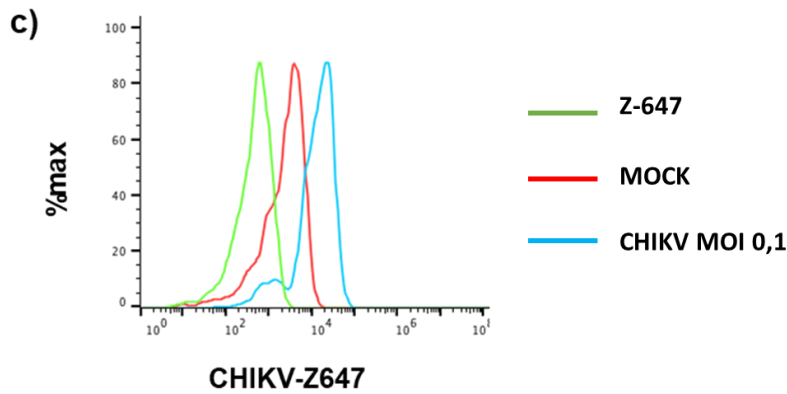
Inicialmente, foi realizada a padronização da marcação intracelular do CHIKV pela citometria de fluxo. Como pode ser observado na Figura 36, os monócitos definidos em função de sua morfologia e expressão de CD14, foram avaliados quanto à expressão intracelular do antígeno CHIKV-Z647. Cerca de 64% dos monócitos infectados pelo CHIKV, com MOI 0,1, após 48h, exibiram uma expressão robusta dos antígenos virais em comparação ao mock (Figura 36). No entanto, a análise do perfil de FCS e SSC demonstrou que a infecção com MOI 0,1 alterou o perfil morfológico dos monócitos, com redução no percentual destas células, de 87,5 para 57,6%. De modo similar, os monócitos infectados com MOI 0,01 exibiram uma marcação robusta para os antígenos virais em comparação ao mock (Figura 37). No entanto, utilizando MOI 0,01 foi verificado um percentual de cerca de 81% de



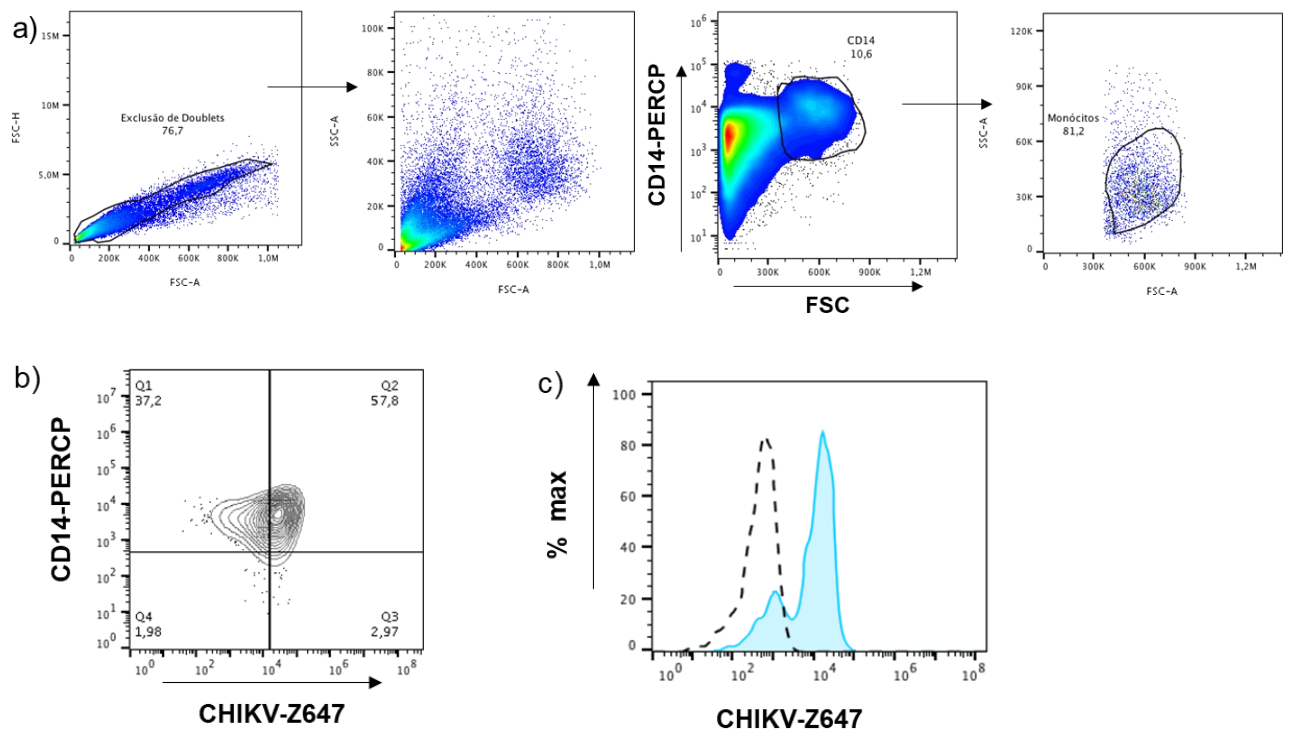
monócitos. Desta forma, foi utilizada a MOI 0,01 para os experimentos subsequentes.

Para observar a expressão de CHIKV em monócitos purificados, foi utilizada uma estratégia de análise que envolveu a detecção da molécula CD14 específica para essas células (Figuras 36 e 37). Inicialmente foram excluídos da análise os *doublets*, através dos sinais obtidos dos canais FSC-A versus FSC-H, seguida pela definição dos monócitos. Quando investigada a expressão do antígeno viral CHIKV-Z647 nessas células, uma expressão robusta e significativa foi observada nas culturas infectadas, evidenciada em comparação ao mock (Média  $34 \pm 18$  vs. mock  $0,9 \pm 0,7$ ;  $p < 0,05$ ).



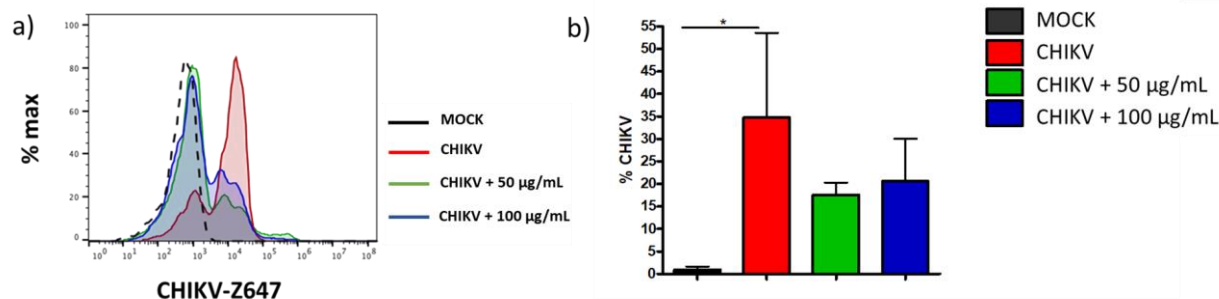


**Figura 36:** Estratégia de análise por citometria de fluxo para a detecção da infecção pelo CHIKV, com MOI 0,1, em monócitos. (a) Exclusão dos *doublets*, seguida pela definição dos monócitos por FSC *versus* SSC frente ao mock (ausência de infecção), e sua identificação pela expressão de CD14 e definição de região. Utilizado gráfico de contorno (*contour plot*) em função das células CD14<sup>+</sup> para identificação da região negativa para a expressão intracelular do antígeno CHIKV-Z647, antes e após conjugação com anticorpo monoclonal secundário. (b) Estratégia de análise, conforme aplicada ao controle, para a definição da expressão intracelular do antígeno CHIKV-Z647 em monócitos infectados. (c) Histograma representativo do antígeno CHIKV em monócitos infectados: Linha vermelha - controle negativo (mock); linha verde - Z-647; linha azul - CHIKV-Z647 (MOI 0,1).



**Figura 37:** Estratégia de análise por citometria de fluxo para a detecção da infecção pelo CHIKV, com MOI 0,01, em monócitos. (a) Exclusão dos grumos. (b) Perfil de tamanho (FCS) vs. granulidade (SSC) de monócitos humanos infectados pelo CHIKV. Marcação representativa de monócitos CD14<sup>+</sup> e região de monócitos. Gráfico de contorno de monócitos CD14<sup>+</sup> CHIKV-Z647<sup>+</sup>. (c) Histograma representativo do antígeno CHIKV em monócito infectados: Linha tracejada - mock; linha azul - CHIKV-Z647 (MOI 0,01).

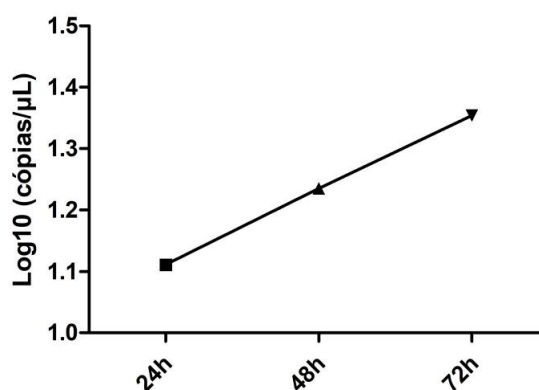
O tratamento das culturas com extratos de 50 e 100µg/mL reduziram a detecção dos antígenos intracelulares de CHIKV em 49% e 41%, respectivamente (Figura 38).



**Figura 38:** Análise de monócitos infectados por CHIKV quanto à atividade antiviral de Ut. (a) Histograma representativo da marcação do antígeno CHIKV em monócitos infectados e tratados com as concentrações de 50 e 100 µg/ml do extrato de Ut. Linha tracejada -negativo (mock); linha vermelha - CHIKV-Z647 (MOI 0,01); linha verde - 50 µg/ml Ut; linha azul - 100 µg/ml. (b) Frequência de monócitos positivos para o antígeno CHIKV através da marcação intracelular por citometria de fluxo. N=2 testes independentes, com as médias e desvios padrão das triplicatas em cada ponto. Mock: controle negativo. Os valores foram submetidos ao teste ONE WAY-ANOVA e \*  $p < 0,05$ .

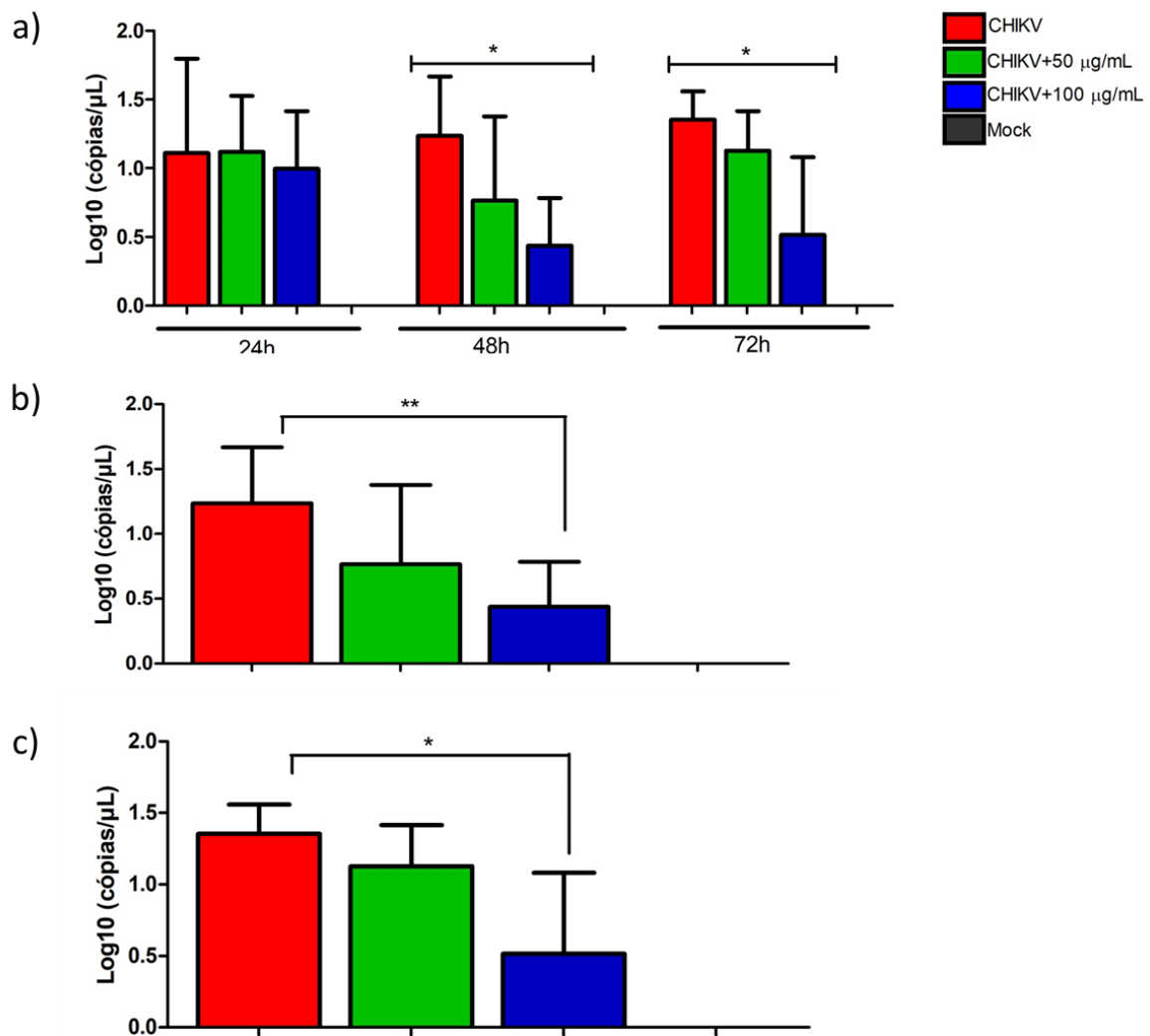
#### 4.4.3.2 Avaliação da atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de Ut, determinado pela RT-qPCR, em monócitos infectados pelo CHIKV

A quantificação da carga viral nos sobrenadantes de cultura, através da RT-qPCR, indicou a susceptibilidade dos monócitos purificados do sangue de doadores saudáveis à infecção por CHIKV. A carga viral se mostrou crescente nos três pontos da cinética, atingindo seu pico em 72h (Figura 39).



**Figura 39:** Cinética da infecção de células HuH-7 por CHIKV, avaliada através da RT-qPCR quantitativa. N=1 teste independente.

Quanto à atividade antiviral, foi observada a redução da carga viral no sobrenadante das células infectadas e tratadas com 100 µg/mL, em 24h de infecção (Figura 40.a). Seguindo-se a cinética, após 48h e 72h de infecção, essa redução tornou-se significativa frente ao tratamento com 100 µg/mL de Ut, com diferenças entre as cargas virais dos monócitos infectados pelo CHIKV tratados e não tratados (ANOVA  $p=0,0310$  e  $p=0,0391$ , respectivamente). Mais especificamente, a incubação de 48h dos monócitos infectados em presença de 100 µg/mL do extrato de Ut foi capaz de reduzir a carga viral em relação ao controle positivo não tratado (Figura 40.b). Ao fim da cinética, em 72h de tratamento, essa redução foi mantida (Figura 40.c).



**Figura 40:** Detecção e quantificação do RNA viral nos sobrenadantes de cultura de monócitos, infectados pelo CHIKV, e tratados com 50 e 100 μg/mL do extrato de Ut. (a) Médias e desvios padrão da quantificação do RNA após 24h, 48h e 72h de infecção e tratamento com 50 e 100 μg/mL do extrato de Ut. (b) Médias e desvios da quantificação do RNA após 48h de infecção e tratamento. (c) Médias e desvios da quantificação do RNA após 72h de infecção e tratamento. Os valores foram representados conforme média e desvio padrão. Para análise estatística foram utilizados ONE WAY-ANOVA e teste-t. Valor de \*P < 0,05, \*\*P<0,005. N=3 experimentos independentes com 2 duplicatas em cada ponto analisado.

## 5 DISCUSSÃO

A tríplice epidemia pelos DENV, CHIKV e ZIKV no Brasil representa um desafio do ponto de vista de controle vetorial, diagnóstico clínico-laboratorial, manejo clínico e terapêutico. Encontrar drogas oriundas de produtos naturais que amenizem os sintomas e/ou que sirvam como tratamento, e propor estratégias terapêuticas inovadoras voltados para estes agravos deve ser prioridade.

Estima-se que ocorram 395 milhões de infecções por ano pelo DENV, das quais 96 milhões têm sintomas aparentes, sejam eles graves ou não. A América do Sul é responsável por 14% desses casos sintomáticos, o que corresponde a aproximadamente 13 milhões de registros, sendo mais da metade dele originários do México e Brasil (Bhatt et al 2013). É importante ressaltar que estes dados possam ainda ser subestimados, já que infecções assintomáticas são recorrentes.

Nos últimos trinta anos foram notificados 11.084.755 casos de dengue e 5.399 óbitos causados pela doença confirmados no Brasil. Desde a reinserção do DENV no país as epidemias são recorrentes, caracterizadas por emergências e reemergências dos quatro sorotipos e seguindo a tendência de aumento tanto nos números gerais quanto nos casos graves e fatais (Nunes et al. 2019).

O CHIKV apresenta uma história muito mais recente que o DENV, entretanto, os surtos ocorridos até os dias atuais geram números já alarmantes. Os primeiros casos registrados no mundo datam de 1950. No território brasileiro, a transmissão autóctone do vírus foi reportada pela primeira vez em 2014 (Nunes et al. 2015), e desde então, já foram reportados 699.205 casos com 509 óbitos SVS/MS 2019, SVS/MS 2017a, SVS/MS 2015a).

Os custos com o tratamento e controle do vetor dessas arboviroses chega às cifras de \$4 bilhões de dólares por ano (Fredericks & Fernandez-Sesma 2015). Na epidemia da ilha La Reunión, foi feita uma estimativa de 26 milhões de euros gastos diretamente com o acompanhamento dos casos, e mais €17,4 milhões indiretamente relacionados, como as faltas ao trabalho (Soumahoro et al. 2011). Nas Ilhas Virgens, apenas no atendimento dos casos agudos e no primeiro ano dos casos crônicos, foi calculado um gasto de \$29,7 milhões de dólares internacionais (Feldstein et al. 2019).

Apesar dos investimentos e de serem problemas sérios de saúde pública, até o momento ainda não foi encontrado um tratamento antiviral eficaz nem contra DENV,

nem contra CHIKV. Para as dores crônicas de chikungunya já foram avaliados AINEs, AIE, drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARD – do inglês *disease modifying antirheumatic drugs*) e até fisioterapia envolvendo tecnologias de ultrassom (Sales et al. 2018). Entretanto, os tratamentos apresentam efeitos colaterais e os resultados ainda são controversos.

A cloroquina, droga antimalárica clássica, já foi utilizada no tratamento da dor crônica causada pela chikungunya, tanto por sua atividade imunomoduladora quanto pelo possível efeito antiviral (Brighton 1984; Chopra et al. 2014). Por outro lado, os dados são conflitantes, não havendo efeito terapêutico em alguns casos (Delogu & De Lamballerie 2011), ou sendo igual ou menos eficiente que AINEs (Chopra et al. 2014). Pacientes tratados com ribavirina, um análogo sintético de nucleosídeo usado no tratamento da hepatite C crônica, apresentaram melhora das dores e redução do inchaço articular, havendo, no entanto, recidiva da dor em 30% deles, e 20% relataram fraqueza e enjoo durante o tratamento (Ravichandran & Manian 2008).

Para o tratamento da chikungunya crônica, o Ministério da Saúde recomenda o uso de DMARD. O primeiro medicamento utilizado nesses casos é a hidroxicloroquina, porém sua eficácia é questionada (Javelle et al. 2015; Chopra et al. 2014; Padmakumar et al. 2009). Por isso, quando o paciente não responde ao tratamento, é recomendado o uso combinado com a sulfassalazina, um antimicrobiano com ação imunossupressora. Por fim, quando não ocorre diminuição ou desaparecimento da dor, essas substâncias são substituídas pelo metotrexato, um antifolato, inibidor ácido fólico. Ainda assim, nem sempre o tratamento é eficaz (de Brito et al. 2016).

Devido aos intensos efeitos colaterais desses medicamentos e seus usos combinados, nem todos os doentes podem ser medicados e deve haver acompanhamento por profissionais capacitados. A hidroxicloroquina pode causar distúrbios visuais e alopecia, sendo contraindicada para pacientes com retinopatias. Recomenda-se então o acompanhamento oftalmológico daqueles que fazem seu uso prolongado (de Brito et al. 2016). Entre os efeitos colaterais da sulfassalazina estão a intolerância gastrointestinal, formação de úlceras orais, mielossupressão e alteração das enzimas hepáticas. O metotrexato tem alto potencial de toxicidade, podendo afetar o fígado, medula óssea e o trato gastrointestinal, e as doses devem ser reduzidas em pacientes com problemas renais. Além disso, por ser um antifolato, o ácido fólico deve sempre ser administrado no dia seguinte ao do uso do metotrexato (Javelle et al. 2015; de Brito et al. 2016; Simon et al. 2015).

Tratamentos não farmacológicos como homeopatias e fisioterapia já foram sugeridos na literatura, entretanto, são pesquisas em fase inicial. Ribeiro e cols. (2016) relataram que sessões de ultrassom e laser de baixa intensidade reduziram a percepção da dor de paciente em fase crônica da chikungunya. Entretanto, além de se tratar de uma abordagem experimental, as sessões foram longas (5 dias consecutivos) e não é um método acessível para a maioria da população (Barros et al. 2016). O tratamento homeopático se mostrou promissor em um grupo de pacientes com artrite crônica pós chikungunya, com total recuperação de 90% dos casos, entretanto, foram utilizadas formulações diferentes e doses diferentes para cada paciente avaliado (Wadhvani 2013).

Em relação ao DENV, a maioria dos pacientes experimenta doença branda, no entanto alguns casos evoluem para formas graves caracterizadas por sangramentos e/ou choque. Não existem antivirais recomendados, e o tratamento é baseado na reposição de fluidos e os analgésicos dipirona e paracetamol para alívio das dores, considerando que doses altas desses medicamentos podem ser hepatotóxicas. Nos casos de dengue grave com ocorrência de hemorragia é feita transfusão de concentrado de hemácias, e se houver coagulopatias, recomenda-se administração de vitamina k endovenosa (Brasil/MS 2015).

À vista das limitações no tratamento desses agravos, medicamentos antivirais são essenciais no combate à mortalidade e na busca pela melhor qualidade de vida dos doentes. A OMS reconhece e incentiva o conhecimento da medicina tradicional para uso da biodiversidade no desenvolvimento de novas drogas (World Health Organization 2003; Honório et al. 2017).

Propriedades antiviral e imunomoduladora dos extratos de *Uncaria tomentosa* e *U. guianensis* foram descritas em culturas infectadas *in vitro* pelo DENV-2 (Reis et al. 2008; Lima-Junior et al. 2013; Mello et al. 2017). A avaliação dessas mesmas propriedades em modelos *in vitro* de infecção por cepas brasileiras de DENV e CHIKV, constituíra uma linha de pesquisa importante sobre os efeitos das *Uncaria* spp. nas arboviroses. O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito antiviral de extrato hidroalcoólico da espécie *Uncaria tomentosa* visando futuramente seu uso como possível fitoterápico para essas arboviroses, visto que a espécie já é utilizada para tratar inflamações e sangramentos, casos observados na infecção por DENV ou CHIKV, assim como outras aplicações, como a antitumoral, por exemplo (Valente 2006).



A busca por produtos naturais com propriedades terapêuticas na dengue é uma das abordagens do Laboratório de Imunologia Viral. No entanto, o modelo de infecção *in vitro* utilizado, empregava a cepa asiática 16681 DENV-2, doada gentilmente pelo Dr. Hastead (Reis et al. 2007; Reis et al. 2008; Gandini et al. 2011; Lima-Junior et al. 2013; Mello et al. 2017). Nosso trabalho se propôs a utilizar cepas brasileiras, isoladas de pacientes, não adaptadas ao laboratório. Portanto, primeiramente foi necessário o crescimento da massa viral das cepas circulantes no Brasil, tanto de DENV quanto de CHIKV.

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens celulares Vero, HuH-7 (linhagem contínua de hepatócitos), e monócitos humanos isolados de doadores saudáveis. Estas células são susceptíveis à infecção e produzem mediadores inflamatórios, constituindo modelos de estudo para estes vírus (Reis et al. 2008; Lima-Junior et al. 2013; Gandini et al. 2011). Os modelos de infecção *in vitro* selecionados para este trabalho são amplamente utilizados para o estudo das arboviroses. As células Vero, juntamente com as células C6/36, originadas de mosquito *Ae. albopictus*, são usadas em caráter de rotina tanto para crescimento das massas virais dos arbovírus quanto para realização de ensaios de atividade antiviral. As células Vero são altamente susceptíveis à infecção viral, devido à ausência ou alteração no gene do interferon, gerando altas cargas virais (Emeny & Morgan 1979).

Uma vez estabelecido o modelo de infecção *in vitro*, teve início a seleção e padronização das concentrações de uso não citotóxicas do extrato de Ut, por ensaio de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, ou MTT. Existem diversos métodos utilizados para se estimar a citotoxicidade de um composto, os quais investigam funções celulares como atividade metabólica, produção de ATP, síntese de DNA, permeabilidade celular, marcação de proteínas expressas pelas células em processo apoptótico e atividade mitocondrial (Adan et al. 2016). O MTT é um teste colorimétrico que permite avaliar a citotoxicidade dos extratos através de uma reação química, realizada pelas enzimas mitocondriais. Quando incubado na presença de células vivas, o MTT tem seu substrato quebrado por essas enzimas, transformando-se de um composto amarelo, em cristais de cor azul escura (formazan). A produção de formazan, e a sua densidade óptica, refletem o estado funcional da cadeia respiratória. Ao fim das 72h de ensaio, as concentrações acima de 100 µg/mL reduziram a viabilidade celular tanto de HuH-7 quanto de Vero para menos de 80%, e por isso não foram utilizadas.

Os ensaios demonstraram ainda que as células HuH-7 são susceptíveis à infecção pelas cepas brasileiras do DENV-1, DENV-2 e DENV-3, corroborando estudos recentes do nosso grupo utilizando a cepa DENV-2 asiática (Mello et al. 2017; Fialho 2012). O DENV-2 e DEV-3 atingiram o maior nível de secreção de NS1 após 48h de infecção. Por outro lado, o DENV-1 apresentou pico de replicação viral em 72h. Recentemente, Gutiérrez-Barbosa e cols. (2019) demonstram que as células HuH-7 são susceptíveis à infecção pelos 4 sorotipos de DENV, sugerindo que estas células representam sistema de cultura *in vitro* ideal para estudos da replicação do DENV e seus sorotipos. Além disso, o estudo destacou a importância dos hepatócitos como alvos da infecção (Gutiérrez-barbosa et al. 2019).

As células HuH-7 são utilizadas em vários estudos para a triagem de compostos com atividade antiviral (Puerta-Guardo et al. 2012). As células hepáticas são consideradas sítios de replicação do DENV, e antígenos virais já foram detectados em hepatócitos e em células de Kupffer (Couvelard et al. 1999). Ao avaliar pacientes infectados pelo DENV, Lin e cols. (2000) encontraram níveis elevados de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT), enzimas produzidas por hepatócitos. Observaram ainda que os níveis de ALT se mantiveram elevados após 14 dias da doença, e demonstraram a infecção de diferentes linhagens de hepatócitos, entre elas a HuH-7, pela cepa protótipo de DENV-2. Dentre as 5 linhagens testadas, HuH-7 apresentou o segundo maior log PFU/mL, atingindo o pico da infecção em 48h (Lin et al. 2000). O mesmo cenário foi observado na cinética de infecção da cepa brasileira do presente estudo, medida através da proteína NS1 no sobrenadante.

Aparentemente, no nosso modelo, as células HuH-7 não foram infectadas pela cepa brasileira de DENV-4 e desta forma não foram realizados testes de atividade antiviral frente a este sorotipo. Embora o estudo de Gutiérrez-Barbosa e cols. (2019) tenha demonstrado suscetibilidade à infecção para todos os subtipos de DENV (Gutiérrez-barbosa et al. 2019), dados da literatura já apontaram que a capacidade do DENV infectar determinadas linhagens é sorotipo dependente (Barr et al. 2012).

Uma limitação a ser considerada no presente trabalho foi a ausência de um controle de inibição da replicação viral nos ensaios *in vitro* aplicados. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que durante a cultura de monócitos infectados *in vitro* pelo DENV-2, o fármaco dexametasona levou à diminuição da taxa de células infectadas, sugerindo o seu uso como controle de inibição da infecção *in vitro* (Reis et al. 2007; Reis et al. 2008). Desta forma, inicialmente a

dexametasona foi utilizada nos ensaios como controle de inibição da infecção pelo DENV. No entanto, no nosso modelo, a substância apresentou citotoxicidade e, por isso, não foi mais utilizada nos ensaios posteriores. Portanto, novos ensaios deverão ser realizados para aprimoramento desta análise, com o uso de outros fármacos como potenciais inibidores da replicação viral, tanto do DENV como do CHIKV.

Neste trabalho, a linhagem HuH-7 foi utilizada para a triagem do extrato de Ut, visto que neste modelo observa-se maior reprodutibilidade, sem as possíveis variações genéticas observadas quando a linhagem primária de monócitos humanos é utilizada. Além disso, são células de fácil obtenção, apresentando pouca limitação quanto ao número de ensaios. A escolha de células primárias e linhagens imortalizadas nos permite comparar as características dos vírus segundo sua célula hospedeira, assim como comparar o efeito do extrato de Ut em diferentes modelos.

Assim, a linhagem primária de monócitos humanos do sangue periférico foi também utilizada como modelo de infecção *in vitro*, além do tratamento com o extrato. Fagócitos mononucleares, como as células dendríticas e os monócitos, são os principais alvos do DENV (Screaton et al. 2015). Estudos do nosso grupo já demonstraram a infecção pelo DENV-2 *in vitro* em monócitos (Reis et al. 2008) e células dendríticas (Gandini et al. 2011). Da mesma forma, aqui foi demonstrada a suscetibilidade dos monócitos à infecção pela cepa brasileira de DENV-2.

Os monócitos são células alvo para replicação do DENV, mas a infecção é mais intensa quando a interação com o vírus ocorre através dos receptores FcγR, ou seja, quando ocorre a infecção secundária e o fenômeno da ADE (Sun et al. 2011). Valero e cols. (2014) demonstraram que a susceptibilidade desse tipo celular depende também da idade do hospedeiro. Os monócitos de adultos respondem melhor à infecção pelo DENV, em relação à produção de citocinas, em comparação com os monócitos de recém-nascidos e idosos, e a resposta é sorotipo-dependente. O DENV-2 foi o sorotipo que induziu maior produção de citocinas, principalmente TNF-α e IL-1β (Valero et al. 2014).

A exposição prévia dos monócitos ao vírus e o desfecho clínico também podem influenciar na susceptibilidade da célula e no título viral produzido. Segundo Kamaladasa (2019), monócitos de indivíduos que já tiveram dengue grave produzem maior carga viral e maior quantidade de citocinas em comparação aos monócitos de indivíduos que tiveram dengue, quando infectados pelos sorotipos de DENV, com MOI 1 (Kamaladasa et al. 2019). Uma vez infectados *in vitro* pelos DENV (Reis et al. 2008; Torrentes-Carvalho et al. 2009) ou pelo CHIKV (Her et al. 2015), os monócitos

humanos do sangue periférico são células responsáveis pela produção de citocinas antivirais e inflamatórias. Desta forma, o estudo de antivirais que tenha monócitos humanos como alvos são fundamentais.

É importante ressaltar que o presente estudo utilizou 3 métodos diferentes para quantificação da infecção pelo DENV: ELISA para detecção de proteína NS1 nos sobrenadantes das culturas, RT-qPCR para quantificação do RNA viral, e a citometria de fluxo para a detecção intracelular do antígeno viral. A proteína NS1 é produzida apenas durante o ciclo replicativo do vírus, e possui a particularidade de ser expressa na membrana e secretada pelas células infectadas durante a fase aguda (Lima et al. 2010). A técnica pode ser utilizada para o diagnóstico da infecção, especialmente nos primeiros quatro dias de sintomas, e o kit selecionado (Platelia Dengue NS1), possui maior sensibilidade, inclusive em infecções primárias (Lima et al. 2010). Todavia, a proteína NS1, por ser secretada, pode se acumular no sobrenadante e dificultar a observação do efeito do extrato de Ut, quanto maior for o tempo de infecção (Mello 2015).

Os métodos moleculares são conhecidos por sua alta sensibilidade e especificidade, e os protocolos aqui utilizados são os preconizados pelo Ministério da Saúde para diagnóstico dos arbovírus investigados (Brasil/MS 2015; Brasil/MS 2016). Entretanto, o número de cópias de RNA não reflete o número de partículas virais infectivas. Novos ensaios utilizando o método de *plaque* permitirão avaliar a infectividade desses vírus após o tratamento.

A citometria de fluxo, terceira metodologia empregada para avaliar a atividade antiviral do extrato de Ut, é a técnica que permite inferir a infecção diretamente na célula, através da detecção do antígeno intracelular. Este é um método bastante utilizado para detecção de antígenos virais nas células alvo (Lambeth et al. 2005), e nosso grupo foi um dos pioneiros na utilização desta metodologia para a marcação intracelular do vírus dengue (Sydow et al. 2000). O emprego de diferentes técnicas, com diferentes alvos nos fornece diferentes parâmetros para melhor avaliação do efeito do extrato de Ut sobre a infecção.

De acordo com o ensaio de MTT, a viabilidade das células HuH-7 não foi reduzida após o tratamento com o extrato de Ut, nas concentrações testadas até 100 µg/mL. Desta forma, o próximo passo foi avaliar a atividade antiviral do extrato hidroalcoólico de Ut frente à infecção *in vitro* pelos DENV. Apesar das diferenças não terem sido estatisticamente significativas, os resultados sugerem ação antiviral do extrato de Ut nas concentrações 50 µg/mL e 100 µg/mL. Entre as duas

concentrações testadas, a de 100 µg/mL se mostrou a mais eficiente em reduzir a infecção pelo DENV-2. A atividade antiviral foi observada tanto de forma indireta, através da quantificação das cópias de RNA de DENV, ou da detecção da proteína NS1 no sobrenadante, quanto de forma direta, com a detecção do antígeno viral no interior da célula HuH-7. Frente ao DENV em hepatócitos HuH-7, essa inibição ocorreu inclusive nos picos da infecção, ocorridos com 48h para DENV-2, e com 72h para DENV-1.

Na concentração de 50 µg/mL a atividade antiviral foi menor, não sendo observada através do ELISA para a proteína NS1, nas células HuH-7, nem nos monócitos infectados pelo DENV-2, sendo, no entanto, observada redução na porcentagem de células infectadas com essa concentração, utilizando-se a citometria de fluxo. De modo geral, a dosagem de NS1 associada à citometria de fluxo, mostrou-se vantajosa nos estudos de triagem de compostos naturais frente ao DENV-2 (Mello et al. 2017; Fialho 2012). É importante ressaltar que estes trabalhos envolvendo a atividade antiviral de Ut contra DENV-2, utilizaram apenas as técnicas de ELISA para NS1 e/ou citometria de fluxo, enquanto o presente estudo, além de utilizar cepas brasileira e testar paralelamente diferentes sorotipos, utilizou simultaneamente também a RT-qPCR.

A observação da atividade antiviral do extrato de Ut foi concordante nas três técnicas avaliadas, para a concentração de 100 µg/mL nos monócitos infectados pelo DENV-2. Nas células HuH-7, devido à limitação de tempo hábil, foram realizadas a detecção de NS1 e citometria de fluxo, mas não a RT-qPCR, e em ambas, a concentração de 100 µg/mL também apresentou atividade antiviral frente ao DENV-2.

Os testes iniciais realizados com DENV-3 a princípio não indicaram ação antiviral do extrato de Ut contra esse sorotipo em células HuH-7. Desta forma, uma vez que os DENV-1 e DENV-2 representam os sorotipos circulantes no país atualmente, estes sorotipos foram priorizados nos demais ensaios realizados. De forma interessante, Gutierrez e cols. (2019) observaram que a indução de morte das células HuH-7 infectadas variou entre as cepas dos DENV circulantes na Colombia. Os autores demonstraram que as cepas de DENV-1 e DENV-4 induziram taxas elevadas de morte celular e efeito citotóxico nessas células. A variabilidade na capacidade de indução de morte celular observada entre as cepas virais demonstrou que, as características biológicas dos DENV não são compartilhadas entre os subtipos, podendo contribuir aos diferentes desfechos clínicos observados nos

pacientes (Gutiérrez-barbosa et al. 2019). Neste contexto, reiteramos a importância da continuidade dos estudos com as cepas brasileiras dos DENV.

A dificuldade em realizar o teste de MTT, tanto nos ensaios com os monócitos purificados, como nas células infectadas sem tratamento, foi outra limitação observada para este estudo. De fato, as análises da viabilidade celular por citometria de fluxo, através do kit Live/Dead, após infecção e tratamento dessas células, demonstraram possível toxicidade na concentração de 100 µg/mL. O perfil morfológico, avaliado pelo tamanho e granulosidade das células, foi alterado após o tratamento, indicando maior toxicidade do extrato nessa concentração. Novos ensaios de MTT e de citometria são necessários para uma investigação mais aprimorada da citotoxicidade, tanto do extrato, quanto das cepas virais nos diferentes modelos *in vitro* utilizados neste trabalho.

Outro ponto importante a ser discutido refere-se às diferentes técnicas aplicadas e à cinética de infecção. Enquanto a PCR e o ELISA da proteína NS1 permitem a montagem de uma cinética de infecção, a citometria de fluxo, por sua vez, ao envolver fixação das células em formol, permitiu a observação de apenas um momento do ensaio, representando uma das dificuldades encontradas nas padronizações realizadas. Todas as preparações para a citometria de fluxo foram conduzidas após 48h de infecção, um período que permite a infecção celular, a replicação, e no qual a viabilidade das células é menos afetada. Apesar desse momento ser o pico da infecção de DENV-2, o mesmo não se aplica ao DENV-1. Portanto, a realização de ensaios futuros será necessária a fim de avaliar a infecção pelo DENV-1 após 72h, visto ser nesse período que a infecção pelo sorotipo 1 atinge seu pico, o que possivelmente apresentará melhores resultados.

Utilizando-se o modelo de infecção de monócitos humanos purificados e a cepa asiática protótipo de DENV-2 16681, foi demonstrado, também através da citometria de fluxo, redução significativa da frequência de detecção do antígeno viral no tratamento com 100 µg/mL do extrato hidroalcoólico, o que corrobora com nosso estudo. Entretanto, ao separar o extrato bruto, fração alcaloide e não alcaloide, foi observado por Reis e cols. (2008) que a fração não alcaloide não agiu sobre a infecção, enquanto a fração alcaloide foi mais eficiente do que o extrato hidroalcoólico bruto (Reis et al. 2008). Utilizando o modelo de infecção de células HuH-7 com a cepa protótipo de DENV-2, Mello e cols. (2017) encontraram redução significativa da infecção e menor mortalidade nas células tratadas com extratos da folha e da casca de outra espécie de unha de gato, a *U. guianensis*. Ambos os

extratos reduziram significativamente a detecção do antígeno viral após 72h de tratamento, embora o extrato da folha tenha se mostrado mais eficiente. A *U. guianensis* possui menos alcalóides do que a *U.*, e em sua folha são encontradas moléculas de campferitrina, um flavonol que, segundo os autores, possivelmente está envolvido nesse efeito inibidor (Mello et al. 2017).

Em relação ao CHIKV, também foi demonstrada a suscetibilidade das células HuH-7 à infecção, em conformidade com estudos prévios (Franco et al. 2018). As observações durante a cinética de infecção pelo CHIKV são ratificadas, dadas as altas cargas virais e o crescimento rápido alcançados nesta linhagem celular. Esse fenômeno pode ser explicado também pela capacidade do próprio vírus de produzir altas cargas virais, seja em pacientes (Gasque et al. 2016), seja em modelos *in vitro*, como nas linhagens epiteliais HeLa, 293T, BEAS-2B e nos fibroblastos primários MCR5 (Sourisseau et al. 2007). Além disso, os hepatócitos são considerados sítios primários de infecção pelo CHIKV (Lum & Ng 2015).

Neste trabalho, padronizamos a marcação intracelular do antígeno viral de CHIKV através da citometria de fluxo, uma metodologia ainda pouco empregada nos estudos com CHIKV. Nossos resultados preliminares demonstraram que os monócitos humanos são susceptíveis à infecção pelo CHIKV, e que, além do percentual de células infectadas detectadas através do antígeno intracelular de CHIKV pela citometria de fluxo, houve aumento do número de cópias de RNA durante as 72h de infecção avaliadas, o que indica a susceptibilidade das células alvo à infecção e a permissividade para a replicação do vírus.

Poucos trabalhos na literatura abordam a infecção *in vitro* de monócitos pelo CHIKV. Sourisseau e cols. (2007) não encontraram susceptibilidade de monócitos, PBMCs, linfócitos T e células dendríticas derivadas de monócitos ao CHIKV, com MOIs de 10 a 50 (Sourisseau et al. 2007). Por outro lado, Hers e cols. (2015) demonstraram a infecção dos monócitos utilizando MOI 1, através da detecção intracelular do antígeno viral e da RT-qPCR, encontrando  $10^9$  cópias de RNA/mL em 24h de infecção. Esse mesmo estudo mostrou que a infecção gera resposta imune inata com produção de citocinas e quimiocinas (Her et al. 2015). Silva e cols. (2016) realizaram a infecção de monócitos e observaram que a infecção induz a produção de MCP-1 por essas células, mas que a modulação do nível dessa quimiocina não altera a replicação viral (Ruiz Silva et al. 2016). Em nosso modelo de estudo, a infecção pelo CHIKV com MOI 0,1 foi robusta, mas se apresentou citopática, com

alterações do perfil morfológico dos monócitos, estabelecendo-se de modo eficaz com MOI 0,01.

Por se tratar de uma nova metodologia em desenvolvimento no laboratório, os ensaios com CHIKV envolveram também o uso de células Vero. A infecção de CHIKV nessa linhagem celular demonstrou número elevado de cópias já nas primeiras 24h, que se manteve em crescimento nas 48h e 72h seguintes. Franco e cols. (2018) ao investigar a ação de antivirais de amplo espectro sobre o CHIKV, utilizou como modelos células Vero, HuH-7 e A549. O padrão de replicação de CHIKV, por eles avaliado pelo método de plaque, foi semelhante ao observado em nosso estudo, crescente ao longo dos 3 dias de infecção (Franco et al. 2018).

O efeito antimicrobiano de Ut já foi investigado em outros modelos, mas nosso estudo investigou pela primeira vez sua atividade antiviral frente ao CHIKV. As cepas de CHIKV possuem a característica de produzirem efeito citopático na linhagem de células Vero, entre 24 e 48h. Diante disso, observamos que a dose de 100 µg/mL da Ut foi capaz de inibir o ECP viral nesta linhagem. Acreditamos que o estudo aqui realizado represente as etapas iniciais necessárias à triagem do fitoterápico, o qual possa reduzir efeitos inflamatórios e deletérios observados nos doentes acometidos pelo CHIKV.

É possível que a ação antiviral do extrato de Ut seja dependente da quantidade de partículas virais infectantes. Nas células HuH-7 infectadas pelo CHIKV, a inibição foi discreta durante toda a cinética, que já começou com um número elevado de cópias de RNA viral. Por outro lado, em células Vero e em monócitos, a inibição foi maior, enquanto o número de cópias de RNA presente nos sobrenadantes destas culturas, durante as 24, 48 e 72h de infecção e tratamento, foi menor. Em monócitos, a inibição mostrou-se estatisticamente significativa na RT-qPCR, entretanto, a carga viral nessas células se mostrou a menor do que nas células Vero e HuH-7 avaliadas.

A Ut é amplamente distribuída na Amazônia, e apresenta várias propriedades terapêuticas conhecidas por seus efeitos antiinflamatórios, antivirais e antitumorais. O extrato hidroalcoólico da casca de Ut foi capaz de reduzir a infecção de herpes virus simplex-1 (HSV-1) em células Vero. Acredita-se que seu efeito esteja relacionado à ação simultânea dos compostos presentes no extrato, uma vez que a fração purificada de glicosídeos do ácido quinóico e a de alcaloides oxindólicos não apresentou efeito antiherpético (Caon et al. 2014). Quanto ao efeito *in vivo*, o extrato contendo 5% de mitrafilina já foi sugerido como tratamento para herpes labial, mas



devido à propriedade de ação anti-inflamatória característica da espécie (Caldas 2010), e também para herpes genital (Passos et al. 2010).

Um estudo com 106 cepas de 10 diferentes gêneros de patógenos presentes na cavidade bucal humana demonstrou que 20 e 25 µg/mL de Ut comercial micropulverizada possui ação antimicrobiana sobre as cepas de Enterobacteriaceae, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus* spp. (Renzo et al. 2007). Souza-Júnior e cols. (2011) encontraram efeito antifúngico do micropulverizado do caule sobre cepas de *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (Júnior et al. 2011).

Além de atividade antiviral, a Ut já teve descrita sua atividade antitumoral. Em um estudo com 5 alcaloides oxindólicos altamente purificados da planta, quatro deles (isopteropodina, pteropodina, isomitrafalina, uncarina) inibiram a proliferação de células CCRF-100-C7H2, células T de leucemia linfoblástica aguda (Bacher et al. 2006). O extrato hidroalcoólico também já foi indicado como terapia complementar ao aumentar a apoptose induzida pela quimioterapia (medida através da expressão de anexina) aumentar a atividade de proteínas caspases e a quantidade de fragmentos no sobrenadante da cultura de células HT29 derivadas de adenocarcinoma colorretal (De Oliveira et al. 2014).

Kaiser e cols. (2016) investigaram a diferença da citotoxicidade do extrato bruto e da fração purificada de alcaloides oxindólicos de Ut em células tumorais e em PBMCs, e observaram que alcaloides pentaoxindólicos apresentaram maior toxicidade contra PBMCs. Ao testar concentrações entre 18,7 e 935,4 µM de alcaloides oxindólicos purificados, até a concentração mínima foi tóxica para leucócitos, e a viabilidade dessas células caiu até 50% dependendo do quimiotipo do alcaloide utilizado. O valor de IC50 encontrado para os alcaloides ficou entre 33,8 e 736,23 µM, e 44,32 µM para o extrato bruto (Kaiser et al. 2016).

Nosso trabalho condiz com as informações da literatura, pois a viabilidade das células HuH-7 de hepatocarcinoma foi menor do que aquela observada para as células Vero não humanas. Entretanto, as células aparentemente mais afetadas pelo extrato foram os monócitos humanos. Bors e cols. (2012) demonstraram que o extrato alcoólico da casca de Ut reduziu em 50% a viabilidade de monócitos na concentração de 250 µg/mL e reduziu também o tamanho das células já na concentração de 100 µg/mL (Bors et al. 2012). Em células HMEC, de microvasculatura endotelial, 50 µg/mL do extrato aquoso de Ut não apresentou citotoxicidade (Lima-Junior et al. 2013), porém, modelos de infecção e tratamento de

monócitos, especificamente com o extrato hidroalcoólico, envolveram concentrações abaixo de 10 µg/mL (Reis et al. 2008). Ensaios de marcação de anexina V para identificação das células apoptóticas, e do iodeto de propídeo para marcação das células mortas, na presença apenas do extrato, podem auxiliar no entendimento da citotoxicidade do extrato da Ut. Em nosso estudo, foram selecionadas concentrações que mantiveram a viabilidade acima de 80% nos testes de MTT, mesmo após o período de 72h de incubação.

A sintomatologia da dengue e da chikungunya estão relacionadas à resposta imunológica do hospedeiro. Acredita-se que a intensa produção de citocinas e infiltrados de células da resposta imune contribuam para os quadros de artrite da chikungunya e também para o comprometimento do fígado na dengue grave (Couvelard et al. 1999; Lum & Ng 2015; Silva & Dermody 2017; Sales et al. 2018; Hoarau et al. 2019; Amdekar et al. 2017). Por outro lado, a produção destes mediadores também é essencial para formação da resposta imune que permite, na maioria dos casos, o controle da infecção.

A Ut é conhecida popularmente e na literatura por sua atividade imunomoduladora, sendo por isso utilizada no tratamento de gastrites, artrites, febre, reumatismo, entre outras aplicações. Estudos do nosso grupo já apontaram a atividade imunomoduladora tanto de Ut quando da espécie do mesmo gênero *U. guianensis*, também chamada popularmente de unha-de-gato. Extratos de outras espécies, integrantes de outras famílias, como a Marcgraviaceae, também já tiveram descritas atividade antiviral/imunomoduladora na infecção pela cepa DENV-2 asiática (Fialho 2012).

Nosso trabalho envolveu a padronização de crescimento de cepas virais circulantes no país. Ressaltamos a importância desse trabalho visto que todos os estudos anteriores utilizaram cepas asiáticas e não aquelas que circulam no Brasil. No caso dos monócitos, encontramos a variação entre doadores, já que se tratam de diferentes indivíduos, com diferentes níveis de susceptibilidade ao vírus e também com diferentes perfis ou *backgrounds* genéticos. Novos testes com mais doadores devem ser conduzidos visando aumentar o n amostral e, deste modo, reduzir a variação e aumentar a significância entre as diferenças observadas.

Neste trabalho foi investigada a capacidade do extrato hidroalcoólico de Ut de agir inibindo a infecção de cepas circulantes no Brasil dos vírus dengue e chikungunya. Requerem esclarecimentos se essa inibição ocorre devido à ação sobre o vírus ou sobre as células, induzindo um estado antiviral ou produção de

substâncias imunomoduladoras, capazes de induzir o controle/redução da infecção nestas células. Para tal, é importante a realização de testes de ELISA para citocinas como IL-8, IL-6, IL-10, IL-4, IFN do tipo I, TNF- $\alpha$  e outras, que estejam envolvidas no controle e na clássica “tempestade de citocinas” descrita para a patogenia destas arboviroses.

Em suma, o presente estudo demonstra a possibilidade do uso de plantas medicinais na intervenção terapêutica, que se faz necessária, embora ainda limitada, para tratar casos de dengue e chikungunya. Esperamos comprovar a atividade antiviral e/ou imunomoduladora dos extratos hidroalcoólicos de folhas e casca das espécies medicinais (*U. tomentosa*) em modelos *in vitro* de infecção pelos DENVs e CHIKV circulantes no país, e futuramente identificar produtos naturais que possam ser usados como medicamentos.

## 6 PERSPECTIVAS

- Realizar a RT-qPCR do sobrenadante e citometria de fluxo para melhor compreensão da dinâmica de infecção da cepa brasileira de DENV-4;
- Padronizar controle de inibição da infecção pelos DENV e CHIKV;
- Dosar mediadores inflamatórios, anti-inflamatórios e antivirais nas infecções pelos DENV e CHIKV, utilizando as diferentes células alvo tratadas e não tratadas com o extrato;
- Efetuar o tratamento em diferentes momentos das infecções (antes, durante e depois);
- Investigar o mecanismo de ação do extrato de Ut.

## 7 CONCLUSÕES

- Esse trabalho ressaltou a relevância de estudos com produtos naturais, especialmente da espécie da Rubiaceae, na busca de fitoterápicos frente às infecções pelos DENVs e CHIKV;
- Foram estabelecidos modelos de infecção *in vitro* das células-alvo HuH-7, Vero e monócitos humanos pelas cepas brasileiras de DENVs e CHIKV. Os modelos *in vitro* se mostraram eficientes para avaliação de atividade antiviral de produtos naturais;
- As concentrações abaixo de 100 µg/mL do extrato de Ut apresentaram citotoxicidade abaixo de 20% nas células Vero e HuH-7
- O extrato hidroalcoólico de Ut apresentou atividade antiviral nas concentrações 50 e 100 µg/mL frente à infecção pelas cepas DENV-2 e CHIKV.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adan A, Yağmur K, Yusuf B. Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016; 17(14): 1873–4316.
- Ahmad N, Hina F, Muhammad A, Bilal AH, Ijaz M, Lubna F. “Dengue fever treatment with *Carica papaya* leaves extracts.” *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2011; 1 (4): 330–33.
- Alcon-LePoder S, Sivard P, Drouet MT, Talarmin A, Rice C, Flamand M. “Secretion of flaviviral Non-Structural Protein NS1: From diagnosis to pathogenesis.” *Novartis Found Symp*. 2006 277: 233–50.
- Allen-hall L, Pablo C, John TA, Rosario R, Olga L, Robert ML. “Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .” *J. Ethnopharmacol*. 2007; 109: 312–17.
- Amdekar S, Deepti P, Kalichamy A. “Chikungunya virus-induced arthritis: Role of host and viral factors in the pathogenesis.” *Viral Immunology*. 2017; 30 (10): 691–702.
- Anbazhagan, GK, Sankarganesh P, Baby J. “Antiviral Plant Extracts.” IntechOpen. 2019. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/plant-extracts/antiviral-plant-extracts>. Acessado em: 13 de dezembro de 2019.
- Anvisa. “Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais.” Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterpicos>. Acessado em: 2 de abril de 2019.
- Aquino R, Simone F, Pizza C. “Plant metabolites. Structure and *in vitro* antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*.” *Journal of Natural Products*. 1989; 52: 679–85.
- Arankalle VA, Shubham S, Sarah C, Rashmi SG, Atul MW, Santosh M J, Sudeep AB, Akhilesh CM. “Genetic divergence of chikungunya viruses in India (1963 – 2006) with Special Reference to the 2005 – 2006 Explosive Epidemic.” *J Gen Virol*. 2007; 88: 1967–76.
- Assunção-miranda I, Cruz-oliveira C, Poian AT. “Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis” *Biomed Res Int*. 2013: 973516.
- Awasthi LP, Menzel G. “Effect of root extract from *Boerhaavia diffusa* L., containing an antiviral principle upon plaque formation of RNA bacteriophages.” *Zentralblatt*

Für Mikrobiologie. 1986; 141 (5): 415–19.

Awasthi LP, Verma HN. “*Boerhaavia diffusa* - A wild herb with potent biological and antimicrobial properties.” Disponível em: <https://www.asianagrihistory.org/pdf/volume10/boerhaavia.pdf> . Acessado em: 13 de dezembro de 2019.

Aye KS, Komgrid C, Ne W, Kyaw ZW, Kyaw M, Nuntaya P, Somchai T, et al. “Pathologic highlights of dengue hemorrhagic fever in 13 autopsy cases from myanmar.” *Human Pathology*. 2014; 45 (6): 1221–33.

Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DIS, Nogueira RMR, Kubelka CF. “NK Cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease.” *Clin and Exp Immunol*. 2006; 143 (2): 345–56.

Bacher N, Martin T, Sonja S, Hermann S, Ausserlechner MJ, Reinhard K, Konwalinka G. “Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-Arrested and Bcl-2-Expressing acute lymphoblastic leukaemia cells.” *Br J Haematol*. 2006; 132 (5): 615–22.

Bachmetov L, Gal-Tanamy M, Shapira A, Vorobeychik M, Giterman-Galam T, Sathiyamoorthy P, Golan-Goldhirsh A, et al. “Suppression of hepatitis C virus by the flavonoid quercetin is mediated by inhibition of NS3 protease activity.” *J Viral Hepat*. 2012; 19 (2): 1–8.

Balsitis SJ, Josefina C, Castro G, Aracely A, Flores D, McKerrow JH, Beatty RP, Harris E. “Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining.” *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2009; 80: 416–24.

Barr KL, Anderson BD, Heil GL, Friary JA, Gray GC, Focks D. “Dengue serotypes 1-4 exhibit unique host specificity *in vitro*.” *Virus Adaptation and Treatment*. 2012; 4 (1): 65–73.

Bethell DBJ, Gamble PPL, Dung NM, Chau TTH, Loan HT, Thuy TTN, et al. “Noninvasive measurement of microvascular leakage in patients with dengue hemorrhagic fever.” *Clin Infec Dis*. 2001; 32(2): 243–53.

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. “The global distribution and burden of dengue.” *Nature*. 2013; 25 (496): 504–7.

Bisordi I, Rocco IM, Suzuki A, Katz G, Silveira VR, Maeda AY, de Souza RP, et al.

- “Avaliação da detecção do antígeno NS1 para diagnóstico de dengue nos laboratórios de saúde pública, estado de São Paulo, 2009.” *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2011; 53 (6): 315–20.
- Bonifay T, Prince C, Neyra C, Demar M. “Atypical and severe manifestations of chikungunya virus infection in French Guiana: A hospital-based study.” *Plos One*. 2013; 13 (12): 1–13.
- Bors M, Michałowicz J, Pilarski R, Sicińska P, Gulewicz K, Bukowska B. “Studies of biological properties of *Uncaria tomentosa* extracts on human blood mononuclear cells.” *J Ethnopharmacol*. 2012; 142 (3): 669–78.
- Brasil/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Febre de Chikungunya: Manejo Clínico. Brasília 2015. 28 p.
- Brasil/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Dengue: diagnóstico e manejo clínico. Adulto e Criança. Brasília 2016. 58 p.
- Bressan AL, Silva RS, Fontenelle E, Gripp AC. “Imunossupressores na dermatologia.” *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2010; 85 (1): 9–22.
- Brighton SW. “Chloroquine phosphate treatment of chronic chikungunya arthritis. An open pilot study.” *South African Medical Journal*. 1984; 66 (6): 217–18.
- Brito CAA, Sohsten AKA, Leitão CCS, Brito RCCM, Valadares LDA, Fonte CAM, Mesquita ZB, et al. “Pharmacologic management of pain in patients with chikungunya: a guideline.” *Rev Soc Br Med Trop*. 2016; 49 (6): 668–79.
- Burt FJ, Chen W, Mine R JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, Kohl A, et al. “Review Chikungunya Virus: An update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen.” *Lancet Infect Dis*. 2017; 17: 107–17.
- Byk LA, Gamarnik AV. “Properties and functions of the dengue virus capsid protein.” *Annual Review of Virology*. 2016; 3 (1): 263–81.
- Caldas L. “*Uncaria tomentosa* no tratamento de herpes labial: estudo duplo-cego randomizado.” *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*. 2010; 22 (2): 57–59.
- Calisher CH, Kcarabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE. “Antigenic relationships between flaviviruses as determined by



- cross-neutralization tests with polyclonal antisera.” J Gen Virol.1989; 70 (pt1): 37–43.
- Caon T, Kaiser S, Feltrin C, Carvalho A, Sincero TCM, Ortega GG, Simões CMO. “Antimutagenic and antiherpetic activities of different preparations from *Uncaria tomentosa* (cat’s claw).” Food Chem Toxicol. 2014; 66 (April): 30–35.
- Cavalcanti LPG, Mota LAM, Lustosa GP, Fortes MC, Mota DAM, Lima AAB, Coelho ICB, Mourão MPG. “Evaluation of the WHO classification of dengue disease severity during an epidemic in 2011 in the state of Ceará, Brazil.” Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014; 109 (1): 93–98.
- Ccahuana-Vasquez RA, Santos SSF, Koga-Ito CY, Jorge AOC. “Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens” Braz Oral Res. 2007; Vol. 21.
- Centers for Disease Control and Prevention. “Arbovirus Catalog.” 2016. Disponível em: <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/>. Acessado em: 01 de novembro de 2019.
- Chen W, Foo SS, Rulli NE, Taylor A, Sheng KC, Herrero LJ, Herring BL. “Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss.” PNAS USA. 2011; 111 (16): 6040–45.
- Chirathaworn C, Rianthavorn P, Wuttirattanakowit N, Poovorawan Y. “Serum IL-18 and IL-18BP levels in patients with chikungunya virus infection.” Viral Immunol. 2010; 21 (113–117).
- Chopra A, Saluja M, Venugopalan A. “Effectiveness of chloroquine and inflammatory cytokine response in patients with early persistent musculoskeletal pain and arthritis following chikungunya virus infection.” Arthritis & Rheumatology. 2014; 66 (2): 319–26.
- Chua KB. “A fatal case of chikungunya virus infection with liver involvement.” Med J Malaysia. 2010; 65 (1): 83–84.
- Chung KM, Diamond MS. “Defining the levels of secreted non-structural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice.” J. Med Virol. 2009 80 (3): 547–56.
- Chung RT, Fusco DN. “Review of current dengue treatment and therapeutics in development.” JBABM. 2014; s8.
- Chungue E, Poli L, Roche C, Gestas P, Glaziou P, Markoff LJ. “Correlation between

- detection of plasminogen cross-reactive antibodies and hemorrhage in dengue virus infection." *J Infect Dis.* 1994; 170 (5): 1304–7.
- Cohen SN, Halstead SB. "Shock associated with dengue infection. Clinical and physiologic manifestations of dengue hemorrhagic fever in Thailand." *J Pediatr.* 1964; 68: 448–56.
- Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Hénin D, Deubel V. "Report of a Fatal Case of Dengue Infection with Hepatitis: Demonstration of Dengue Antigens in Hepatocytes and Liver Apoptosis." *Human Pathology.* 1999; 30 (9): 1106–10.
- Cunha, RV, Nogueira RMN. 2013. "Dengue." In *Dinâmica Das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 1799–1815.
- Deeba F, Islam A, Kazim SN, Naqvi IH, Broor S, Ahmed A, Parveen A. "Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies." *Pathog Dis.* 2015; 74: 1–37.
- Delogu I, Xavier L. "Chikungunya Disease and Chloroquine Treatment." *Journal of Medical Virology.* 2011 83(6):1058-9.
- Dick, OB, Martín JLS, Montoya RH, Diego J, Zambrano B, Dayan GH. "Review: The history of dengue outbreaks in the americas." *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87 (4): 584–93.
- Duijl-Richter MK, Hoornweg TE, Rodenhuis-Zybert IA, Smit JM. "Early events in chikungunya virus infection—from virus cell binding to membrane fusion." *Viruses.* 2015; 7 (7): 3647–74.
- Durbin AP, Vargas MJ, Wanionek K, Hammond SN, Gordon A, Rocha C, Balmaseda A, Harris E. "Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever." *Virology.* 2008; 376 (2): 429–35.
- Economopoulou AM, Dominguez M, Helynck B, Sissoko D, Wichmann O, Quenel Q, et al. "Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion." *Epidemiol Infect.* 2009; 137: 534–41.
- Ekchariyawat P, Hamel R, Bernard E, Wichit S, Surasombatpattana P, Talignani L,

- Thomas F, et al. "Inflammasome signaling pathways exert antiviral effect against Chikungunya virus in human dermal fibroblasts." *Infect, Genetic Evol.* 2015; 32: 401–8.
- Emeny JM, Morgan MJ. "Regulation of the interferon system: Evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production." *J Gen Virol.* 1979; 43 (1): 247–52.
- Espinosa JAL. Memoria sobre la epidemia vulgarmente nombrada el dengue, que ha sufrido esta ciudad. ACIMED, Ciudad de La Habana , 18 (6), 2008 . Disponível em [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1024-94352008001200017&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352008001200017&lng=es&nrm=iso)>. Acessado em: 15 novembro de 2019.
- Esposito F, Carli I, Vecchio CD, Xu L, Corona A, Grandi N, Piano D, et al. "Sennoside A, derived from the traditional chinese medicine plant *Rheum* L., is a new dual HIV-1 inhibitor effective on HIV-1 replication." *Phytomedicine.* 2016; 23 (12): 1383–91.
- Farnsworth, NR. "Ethnopharmacology and future drug development: The North American experience." *J Ethnopharmacol.* 1993; 38 (2–3): 145–52.
- Fazekas de St Groth, Webster RG. "Disquisitions of original antigenic sin. I. Evidence in man." *J Exp Med.* 1966; 124 (3): 331–45.
- Feldstein LR, Ellis EM, Rowhani-Rahbar A, Hennessey MJ, Staples JE, Halloran ME, Weaver MR. "Estimating the Cost of Illness and Burden of Disease Associated with the 2014–2015 Chikungunya Outbreak in the U.S. Virgin Islands." *Plos Neg Trop Dis.* 2019; 13(7): e0007563.
- Ferreira AC, Reis PA, Freitas CS, Sacramento CQ, Hoelz LVB, Bastos MM, Mattos M, et al. "Beyond members of the Flaviviridae family, sofosbuvir also inhibits chikungunya virus replication." *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63 (2): 1–15.
- Fialho, LG. "Caracterização dos efeitos imunomodulador e *in vitro* de infecção e em linhagem de hepatócitos HuH-7 pelo vírus Dengue-2." Dissertação de mestrado. 2012. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 105pp.
- Field HJ, Wainberg MA. "Antiviral drug development - 546 Future Science Group." *Future Virol.* 2011; 6 (5): 6.
- Figueiredo MLG, Figueiredo LTM. "Emerging Alphaviruses in the Americas :

- Chikungunya and Mayaro.” *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47 (October): 677–83.
- Franco, EJ, Rodriguez JL, Pomeroy JJ, Hanrahan KC, Brown AN.. “The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines.” *Antivir Chem Chemother.* 2018; 26: 1–7.
- Fredericks AC, Fernandez-Sesma A. “The Burden of Dengue and Chikungunya Worldwide: Implications for the Southern United States and California.” *Ann Glob Health.* 2015; 80 (6): 466–75.
- FUNASA. 2002. “Programa Nacional de Controle Da Dengue.” 2002. [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd\\_2002.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pncd_2002.pdf).
- Gandini M, SRNI Reis, Torrentes-carvalho A, Azeredo EL, Freire MS, Galler R, Kubelka CF. “Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF-  $\alpha$  and IFN-  $\alpha$  profiles.” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011; 106 (August): 594–605.
- Ganesan VK, Duan B, St Patrick Reid. “Chikungunya Virus: Pathophysiology, mechanism, and modeling.” *Viruses.* 2017; 9 (368): 1–14.
- Gasque P, Bandjee MC, Reyes MM, Viasus D. “Chikungunya Pathogenesis: From the clinics to the bench.” *J. Infect.* 2016; 214 (Suppl 5): 446–48.
- Goupil BA, McNulty MA, Martin MJ, Mccracken MK, Christofferson RC, Mores CN. “Novel lesions of bones and joints associated with chikungunya virus infection in two mouse models of disease: New insights into disease pathogenesis.” *Plos One.* 2016; 11 (5): e0155243.
- Gubler DJ. “Dengue and dengue Hemorrhagic: Its History and Resurgence as a Global Public Health Problem.” In *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*, edited by DJ Gubler and G Kuno. 1997. 1–22. Londres: CAB International.
- . “Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.” *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11 (3): 89–99.
- . “Human arbovirus infections worldwide.” *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2001; 951 (1): 13–24.
- . “Dengue/Dengue haemorrhagic fever: History and current status.” *Novartis Foundation Symposium.* 2006; 277: 3–16; discussion 16-22, 71–73, 251–253.

- Gurib-fakim, A. "Medicinal Plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow." Mol Aspects Med. 2006; 27: 1–93.
- Gutiérrez-barbosa H, Casta NY, Castellanos JE. "Differential replicative fitness of the four Dengue virus serotypes circulating in Colombia in human liver Huh-7 cells." Braz. J. of Infect. Dis. 2019; no. x x: 1–12.
- Guzman MG, Kouri G. "Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges." J Clin Virol. 2003; 27 (1): 1–13.
- \_\_\_\_\_. "Dengue: An update." Lancet Infect Dis. 2002; 2 (1): 33–42.
- Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. "Dengue infection." Nature Publishing Group 2. 2016; 1–26.
- Halstead SB, O'Rourke EJ. "Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes." Nature. 1977; 265: 739–41.
- Halstead SB. "Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology." Science. 1988; 239 (4839): 476–81.
- \_\_\_\_\_. "Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue Viruses." Ad Virus Res. 2003; 60: 420–67.
- Hammon WM, Rudnik A, Sather GE. "Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand." Science. 1960; 131 (5): 6–7.
- Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. "Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae)". Phytochemistry. 2005; 66: 5–29.
- Henss L, Scholz T, Grünweller A, Schnierle BS. "Silvestrol inhibits chikungunya virus Replication." Viruses. 2018; 10 (11).
- Her Z, Malleret B, Chan M, Edward KS, Wong S, Kwek DJC, Tolou H, Lin RTP, Tambyah PA, Ng LFP. "Active Infection of human blood monocytes by chikungunya virus triggers an innate immune response." J Immunol. 2015; 184(10):5903-13
- Hoarau J, Bandjee MCJ, Trotot PK, Das T, Li-pat-yuen G, Dassa B, Denizot M, et al. "Persistent chronic inflammation and infection by chikungunya arthritogenic Alphavirus in spite of a robust host immune response." J. Immunol. 2019; 184 (10): 5914–26.

- Honório ICG, Bertoni BW, Telles MPC, Braga RS, França SC, Coppede JS, Correa VSC, Filho JAFD, Pereira AMS. "Genetic and chemical diversity of *Uncaria tomentosa* (Willd. Ex. Schult.) DC in the Brazilian Amazon." *Plos One*. 2017;12 (5): 1–17.
- Hotta S. "Experimental Studies on Dengue: I. Isolation, identification and modification of the Virus." *J Infect Dis*. 1952; 90 (1): 1–9.
- Javelle E, Ribera A, Degasne I, Gaüz B. "Specific management of post-chikungunya rheumatic disorders: a retrospective study of 159 cases in Reunion Island from 2006-2012." *PLOS Negl. Trop. Dis*. 9 (3): e0003603.
- Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. "Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay." *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (10): 4977–4983.
- Johnston LJ, Halliday GM, King NJC. "Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus." *J Invest Dermatol*. 2000; 114(3):560-8.
- Kaiser S, Carvalho AR, Pittol V, Dietrich F, Manica F, Machado MM, De Oliveira LFS, Battastini AMO, Ortega GG. "Genotoxicity and cytotoxicity of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw): Chemotype relevance." *Journal of Ethnopharmacol* 189: 90–98.
- Kam YW, Ong EKS, Tong JC, Re L, Ng LFP. "Immuno-biology of chikungunya and implications for disease intervention." *Microbes and Infection*. 2009; 11: 1186–96.
- Kamaladasa A, Gomes L, Wijesinghe A, Jeewandara C, Toh YX, Jayathilaka D, Ogg GS, Fink K, Malavige GN. "Altered monocyte response to the dengue virus in those with varying severity of past dengue infection." *Antiviral Research*. 2019; 169: 104554.
- Karabatsos N, Buckley SM. "Susceptibility of the baby-hamster kidney-cell line (BHK-21) to infection with arboviruses." *Am J Trop Med Hyg*. 1967; 16 (1): 99–105.
- Khan AH, Morita K, Parquet MC, Hasebe F, Mathenge EGM, Igarashi A. "Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site." *J Gen Virol*. 2002; 83 (12): 3075–84.
- Kirtikar KR, Basu BD. "Indian medicinal plants." In , 3:2045–48. 1956.852pp.

- Kliks, SC, S Nimmanitya, A Nisalak, and DS Burke. 1988. "Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants." *Am J Trop Med Hyg* 38 (2): 411–19.
- Kok EM. "New developments in Flavivirus drug discovery." *Expert Opin Drug Dis.* 2016; 11 (5): 433–45.
- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, et al. "Structure of Dengue Virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion." *Cell.* 2014; 108 (5): 717–25.
- Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, Guigand L, et al. "Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages." *J Clin Invest.* 2010; 120 (3): 894–906.
- Lambeth CR, White LJ, Johnston RE, De Silva AM. "Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus." *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (7): 3267–72.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Janeen J, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, Campbell GL. "Chikungunya Virus in US travelers returning from India, 2006." *Emerg Infect Dis.* 2007; 13 (5): 764–67.
- Lim EXY , Supramaniam A, Lui T, Coles P, Lee WS, Liu X, Rudd PQ, Herrero LJ. "Chondrocytes contribute to alphaviral disease pathogenesis as a source of virus replication and soluble factor production." *Viruses.* 2018; 10 (86): 1–10.
- Lima MRQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Santos FB. "Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil." *PLoS Neglect Trop Dis.* 2010; 4 (7): 1–8.
- Lima-Junior RS, Mello CS, Siani AC, Valente LMM, Kubelka CF. "*Uncaria tomentosa* alkaloidal fraction reduces paracellular permeability, IL-8 and NS1 production on human microvascular endothelial cells infected with dengue virus." *Nat Prod Commun.* 2013; 8(11):1547-50.
- Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Chiu SC, Lin YS. "Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide." *J Immunol.* 2002; 169 (4): 2215–2215.
- Lin YL, Liu CC, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, Chen RMY, Liu HS. "Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus." *J Med Virol.* 2000; 60 (4): 425–31.

- Lohachanakul J, Phuklia W, Thannagith M, Thongsakulprasert T, Smith DR, Ubol S. "Differences in response of primary human myoblasts to infection with recent epidemic strains of chikungunya virus isolated from patients with and without myalgia." *J. Med. Virol.* 2015; 87: 733–39.
- Longui CA. "Glucocorticoid therapy: Minimizing side effects." *J Pediatr.* 2007; 83 (5).
- Lum, FM, Ng LFP. "Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis." *Antiviral Res.* 2015; 120: 165–74.
- Manimunda SP, Vijayachari P, Uppoor R, Purushottaman A, Shankar S, Kumar S, et al. "Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging." *T Roy Soc of Trop Med H.* 2010; 104 (6): 392–99.
- Markoff LJ, Innis BL, Houghten R, Henchal LS. "Development of cross-reactive antibodies to plasminogen during the immune response to dengue virus infection." *J Infect Dis.* 1991; 164 (2): 294–301.
- Marovich M, Grouard-Vogel G, Louder M, Eller M, Sun W, Wu SJ, Putvatana R, et al. "Human dendritic cells as targets of dengue virus infection." *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2001; 6: 219–24.
- Matsumura T, Stollar V, Schlesinger RW. "Studies on the nature of dengue viruses. V. Structure and development of dengue virus in Vero cells." *Virology.* 1971; 46 (2): 344–55.
- Matusali G, Colavita F, Bordi L, Lalle E, Ippolito G, Capobianchi MR, Castilletti C. "Tropism of the Chikungunya Virus." *Viruses.* 2019; 11 (175): 1–26.
- Mello, CS. "Atividade antiviral e imunomoduladora de extratos originados de *Uncaria* sp. em infecção *in vitro* de linhagem contínua de hepatócitos humanos pelo vírus dengue." Dissertação de mestrado. 2015, Rio de Janeiro, FIOCRUZ 119 pp.
- Mello CS, Valente LMM, Wolff T, Lima-junior RS, Fialho LG, Marinho CF, Azeredo EL, et al. "Decrease in dengue virus-2 infection and reduction of cytokine/chemokine production by *Uncaria guianensis* in human hepatocyte cell line Huh-7." *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017; 112: 458–68.
- Miranda EM, Souza JA, Pereira RCA. "Caracterização e avaliação de populações nativas de unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. e *Uncaria guianensis*



- (Aubl.) Gmel.] no vale do Rio Juruá-AC.” *Rev. Bras. Pl. Med.* 2003; 5 (2): 41–46.
- Modhiran N, Watterson D, Muller DA, Panetta AK, Sester DP, Liu L, et al. “Dengue virus NS1 protein activates cells via toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity.” *Sci Transl Med.* 2015; 7 (304).
- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu N, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, et al. “Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever.” *Nature Medicine.* 2003; 9 (7): 921–27.
- Ng LFP, Chow A, Sun YJ, Kwek DJC, Lim PL, Ng LC, Ooi EE, et al. “IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES as biomarkers of chikungunya severity.” *Plos One.* 2009; 4 (1): 1–8.
- Nimmannitya S, Suntayakom S, Vaughn DW, Nisalak A, Green S, et al. (1999). Can Doctors make an accurate diagnosis of dengue infections at an early stage?. WHO Regional Office for South-East Asia. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/148669>>. Acessado em 16 de novembro de 2019.
- Nimmannitya S. “Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever.” *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1987; 18: 392–97.
- Nimmannitya S, Halstead SB, Cohen SN, Margiotta MR. “Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962–1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever.” *Am J Trop Med Hyg.* 1969; 18: 954–71.
- Nobuchi H. “The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia.” *Kanpo No Rinsho.* 1979; 26: 422–25.
- Nogueira FB. “História evolutiva, caracterização e vigilância molecular das diferentes linhagens do vírus dengue tipo 1 no Brasil.” Tese de doutorado. 2018. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 194pp.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG. “Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro.” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1990; 85 (2): 253.
- Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB, Santos FB, Cunha RV, Coelho JO, Souza LJ, et al. “Dengue Virus Type 3, Brazil, 2002.” *Emerg Infect Dis.* 2005; 11 (9): 1376–81.
- Nogueira, RMR, and Eppinghaus ALF. “Dengue virus type 4 arrives in the state of

- Rio de Janeiro: A challenge for epidemiological surveillance and control.” Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2011; 106: 255–56.
- Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MUG, Oliveira LF, Azevedo RSS, et al. “Emergence and potential for spread of chikungunya virus in Brazil.” BMC Medicine. 2015; 13 (102).
- Nunes PCG, Dumas RP, Sánchez-Arcila JC, Nogueira RMR, Horta MAP, Santos FB. “30 Years of Fatal Dengue Cases in Brazil: A Review.” BMC Public Health. 2019;19 (329).
- Nunes, PCG. “Aspectos Epidemiológicos , Viroológicos e Patológicos de Casos Fatais Suspeitos de Dengue Ocorridos Entre 1986 e 2015.” Tese de doutorado. 2018. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 257 pp.
- Oliveira LZ, Luiza I, Farias G, Rigo ML, Glanzner WG, Gonçalves PBD, Cadoná FC, et al. “Effect of *Uncaria tomentosa* extract on apoptosis triggered by oxaliplatin exposure on HT29 Cells.” *Hindawi Publishing Corporation*. 2014. ID 274786.
- Ono, Lucy, Wagner Wollinger, Iray M Rocco, Terezinha L M Coimbra, Philip A J Gorin, and Maria-Rita Sierakowski. “*In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 Strain) and dengue 1 virus (Hawaii Strain).” *Antiviral Res*. 2003; 60 (3): 201–8.
- Osanaí CH. “Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. preliminary report.” Rev. Ins. Med.1983; São Paulo 25 (1): 53–54.
- Ozden S, Huerre M, Riviere JP, Coffey LL, Afonso PV, Mouly V, De Monredon J, et al. “Human muscle satellite cells as targets of chikungunya virus infection.” Plos One. 2007; 2 (6): e527-.
- Padmakumar B, Jayan JB, Menon RMR , Krishnankutty B, Payippallil R, Nisha RS. “Comparative Evaluation of Four Therapeutic Regimes in Chikungunya Arthritis: A Prospective Randomized Parallel-Group Study.” Indian Journal of Rheumatology. 2009; 4 (3): 94–101.
- Paemane A, Wikan N, Roytrakul S, Smith D. “Application of GeIC-MS / MS to Proteomic Profiling of Chikungunya Virus Infection: Preparation of Peptides for Analysis.” Methods Mol Biol. 2016; 1426: 179–93.
- PAHO. “The Feasibility of Eradicating *Aedes Aegypti* in the Americas.” Rev Panam Salud Publica. 1997; 1: 381–88.

- PAHO, WHO. 2016. "PAHO WHO | Chikungunya | Data, Maps and Statistics." Paho.Org. 2016. Disponível em: <[https://www.paho.org/hq/index.php?option%3Dcom\\_topics%26view%3Drdmore%26cid%3D5927%26item%3Dchikungunya%26type%3Dstatistics%26Itemid%3D40931%26lang%3Den](https://www.paho.org/hq/index.php?option%3Dcom_topics%26view%3Drdmore%26cid%3D5927%26item%3Dchikungunya%26type%3Dstatistics%26Itemid%3D40931%26lang%3Den)> Acessado em 16 de novembro de 2019.
- Paixão ES, Rodrigues LC, Itaparica M, Barreto F. "Chikungunya chronic disease: A systematic review and meta-analysis." *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2018; 112: 301–16.
- Pardigon N. "The Biology of Chikungunya: A brief review of what we still do not know." *Pathol. Biol.* 2009; 57: 127–32.
- Passos MRL, Geller M, Barreto NA, Passos MDL, Passos FDL, Varella RQ. "Herpes genital vulvar e uso tópico de *Uncaria tomentosa*: relato de caso." *J Bras Doenças Sex Transm.* 2010; 22 (2): 81–83.
- Paterson HE, McIntosh BM. "Further Studies on the Chikungunya Outbreak in Southern Rhodesia in 1962." *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* 1964; 58 (1): 52–55.
- Pauvolid-corrêa, A. "Investigação para a circulação do vírus do Oeste do Nilo e outros flavivírus no pantanal de Mato Grosso Do Sul." Tese de doutorado. 2012, Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 289 pp.
- Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. "Flavivirus entry receptors: An update." *Viruses.* 2013; 6 (1): 69–88.
- Pohjala L, Utt A, Varjak M, Lulla A, Merits A, Ahola T, Tammela P. "Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable chikungunya replicon cell line and virus-based assays." *PLoS ONE.* 2011; 6 (12): e28923.
- Pongpanich B, Kumponpant S. "Studies of dengue hemorrhagic fever. V. Hemodynamic studies of clinical shock associated with dengue hemorrhagic fever." *J Pediatr.* 1973; 83: 1073–77.
- Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. "Re-Emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships." *J Gen Virol.* 2000; 81: 471–79.
- Puerta-Guardo H, Medina F, Hernández SIC, Rosales VH, Ludert JE, del Angel RM. "The 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-vitamin D3 reduces dengue virus Infection in human

- myelomonocyte (U937) and hepatic (HuH-7) cell lines and cytokine production in the infected monocytes." *Antiviral Research*. 2012; 94 (1): 57–61.
- Rajapakse S, Rodrigo C, Rajapakse A. "Atypical manifestations of Chikungunya infection." *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010; 104: 89–96.
- Ravichandran R, Manian M. "Ribavirin therapy for chikungunya arthritis." *J Infect Dev Countr*. 2008; 2 (02).
- Rees CR, Costin JM, Fink RC, McMichael M, Fontaine KA, Isern S, Michael SF. "In vitro inhibition of dengue virus entry by p-sulfoxy-cinnamic acid and structurally related combinatorial chemistries." *Antivir Res*. 2008; 80 (2): 135–42.
- Reis SRNI, Sampaio ALF, Henriques MGM, Gandini M, Azeredo EL, Kubelka CF. "An *in vitro* model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation." *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2007; 102 (8): 983–90.
- Reis SRNI, Valente LMM, Sampaio AL, Siani AC, Gandini M, Azeredo EL, D'Avila LA, et al. "Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with dengue virus-2." *Int Immunopharmacol*. 2008; 8: 468–76.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, et al. "Infection with chikungunya virus in Italy: An outbreak in a temperate region." *The Lancet*. 2007; 370: 1840–46.
- Ribeiro AMBM, Pimentel CM, Carvalho AC, Gonçalves Guerra, Lima MRO. "Physiotherapeutic Approach on the Late Phase of Chikungunya: A Case Report." *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant*. 2016; 51–56.
- Robert J, Fraser E, Ratnamohan M, Dowling JP, Becker GJ, Varigos GA. "The exanthem of Ross River virus infection: Histology, location of virus antigen and nature of inflammatory infiltrate." *J Clin Pathol*. 1983; Vol. 36.
- Robinson MC. "An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53." *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1955; 49 (1): 28–32.
- Rush AB. "An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the summer and autumn of the year 1780." *Medical Inquiries and Observations*. 1979; 104–17.
- Sabin AB, Schlesinger RW. "Production of immunity to dengue with virus modified by

- propagation in mice1.” *Science*. 1945; 101 (2634): 640–42.
- Sales GMPG, Barbosa ICP, Neta LMSC, Melo PL, Leitão RA, HMA Melo. “Treatment of Chikungunya Chronic Arthritis: A Systematic Review.” *Rev Ass Med Bras*. 2018; 64 (1): 63–70.
- Salles TS, Sá-Guimarães TE, Alvarenga ESL, Guimarães-Ribeiro V, Meneses MDF, Castro-Salles PF, Santos CR, et al. “History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: A review.” *Parasites and Vectors*. 2018; 11 (1): 1–12.
- Samuel, CE. “Molecular mechanisms of interferon action: Interferon-mediated phosphorylation of ribosome-associated protein P1 and protein synthesis initiation factor EIF-2.” *Tex. Rep. Biol. Med*. 1981; 41: 463–70.
- Sandoval M, Okuhama NN, Zhang X, Condezo LA, Lao J, Angeles FM. “Anti-inflammatory and antioxidant activities of Cat's Claw ( *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* ).” *Phytomedicine*. 2002; 9: 325–37.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT. “An Outbreak of Dengue Virus as Rio de Janeiro.” *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1986; 81 (2): 245–46.
- Schilte C, Staikovsky F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, Albert ML, Lecuit M, Michault A. “Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: A 36-month prospective longitudinal study.” *PLOS Negl. Trop. Dis*. 2013; 7 (3): e2137.
- Schrank A. “Estrutura Dos Ácidos Nucleicos.” In *Biologia Molecular Básica*, edited by Arnaldo Zaha, Henrique Bunselmeyer Ferreira, and Luciane M. P. Passaglia, 5<sup>a</sup>, 17–36. Porto Alegre: Artmed. 2014.
- Schuffenecker I, Iteaman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, Lavenir R, et al. 2006. “Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak.” *Plos Medicine* 3 (7): e263.
- Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C. “New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection.” *Nat Rev Immunol*. 2015; 15 (12): 745–59.
- Shu PY, Chen LK, Chang SF, Su CL, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. “Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays.” *J Clin Microbiol*. 2004; 42 (6): 2489–94.

- Silva LA, Dermody TS. "Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies." *J Clin Invest*. 2017; 127 (3): 737–49.
- Silva MR, Van Der Ende-Metselaar H, Mulder HL, Smit JM, Rodenhuis-Zybert IA. "Mechanism and role of MCP-1 upregulation upon chikungunya virus infection in human peripheral blood mononuclear cells." *Scientific Reports*. 2016; 6 (May): 1–9.
- Simon F, Javelle E, Cabie A, Bouquillard E, Troisgros O, Gentile G. "French guidelines for the management of chikungunya." *Med Mal Infect*. 2015; 45: 243–63.
- Simpson DIH, O'sullivan JP. "Studies on arboviruses and bats (Chiroptera) in East Africa." *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1968; 62 (4): 422–31.
- Snow AD, Castillo GM, Nguyen BP, Choi PY, Cummings JA, Cam J, Hu Q, et al. "The Amazon Rain Forest plant *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw) and its specific proanthocyanidin constituents are potent inhibitors and reducers of both brain plaques and tangles." *Scientific Reports*. 2019; 9 (1): 1–28.
- Snyder JE, Kulcsar KA, Schultz KLW, Riley CP, Neary JT, Marr S, Jose J, Griffin DE, and Kuhn RJ. "Functional characterization of the alphavirus TF protein." *J Virol*. 2013; 87 (15): 8511–23.
- Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. "Replication Cycle of Chikungunya: A Re-Emerging Arbovirus Maxime." *Clinical Lymphoma*. 2010; 9 (1): 19–22.
- Soumahoro MK, Boelle PY, Zere BAG, Atsou K, Pelat C, Lambert B, Ruche G, et al. "The chikungunya epidemic on La Ré Union Island in 2005-2006: A cost-of-illness study." *PLOS Negl. Trop. Dis*. 2011; 5 (6): e1197.
- Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, Sol-Foulon N, et al. "Characterization of reemerging chikungunya virus." *PLoS Pathogens*. 2007; 3 (6): 0804–17.
- Souza-Júnior UP, Pereira JV, Pereira MSV, Costa MRM, Pereira AV, Antunes RMP. "Atividade antifúngica *in vitro* do extrato da *Uncaria tomentosa* (Unha de gato) sobre cepas do gênero *Candida*." *Pesq Bras Em Odontopediatria Clin Integr*. 2011; 11 (4): 477–80.
- Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA,

- Nimmannitya S, Kalayanarooj S. "Dengue - How best to classify it." *Clin Infect Dis*. 2011; 53 (6): 563–67.
- Stegmann-Planchard S, Gallian P, Tressières B, Leparç-Goffart I, Lannuzel A, Signaté A, Laouénan C, Cabié A, Hoen B. "Chikungunya, a risk factor for Guillain-Barré syndrome." *Clin Infect Dis*. 2019; 66: 37–39.
- Sun P, Bauza K, Pal S, Liang Z, Wu SJ, Beckett C, Burgess T, Porter K. "Infection and activation of human peripheral blood monocytes by dengue viruses through the mechanism of antibody-dependent enhancement." *Virology*. 2011; 421 (2): 245–52.
- SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Volume 46 - nº 36 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45 de 2015. Brasília: Ministério da Saúde; 2015a.
- SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Volume 48 - nº 33 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2016. Brasília: Ministério da Saúde; 2017a.
- SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Volume 50 - nº 4 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Brasília: Ministério da Saúde; 2019a.
- SVS/MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Volume 50 - nº 28 - Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 36 de 2019. Brasília: Ministério da Saúde; 2019b.
- Sydow FF, Satiago MA, Neves-Souza PC, Cerqueira DIS, Gouvea AS, Lavatori MFH, Bertho AL, Kubelka CF. "Comparison of dengue infection in human mononuclear leukocytes with mosquito C6/36 and mammalian Vero cells using flow cytometry to detect virus antigen." *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95(4): 483-489.
- Tang LIC, Ling APK, Koh RY, Chye SM, Voon KGL. "Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants." *BMC Complement Altern Med*. 2012; 12:3.

- Taylor A, Melton JV, Herrero LJ, Thaa B, Karo-Astover L, Gage PW, Nelson MA, et al. "Effects of an in-frame deletion of the 6k gene locus from the genome of Ross River virus." *J Virol.* 2016; 28;90(8):4150-4159.
- Teng TS, Kam YW, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng LC, Ng LFP. "A Systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection." *J Infect Dis.* 2015; 211: 1925–35.
- Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SRIN, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, Kubelka CF. "Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes." *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(8):1091-9.
- Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, Mcgee CE, Higgs S. "A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential." *Plos Pathogens.* 2007; 3 (12): 1895–1906.
- Vagelos PR. 1991. "Prescription Drug Prices High?" *Science* 252 (5009): 1080–84.
- Valente LMM. "Unha-de-Gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: Um Panorama sobre seus aspectos mais relevantes." *Revista Fitos.* 2006; 2 (1): 48–58.
- Valero N, Mosquera J, Levy A, Añez G, Marcucci R, Alvarez-Mon M. "Differential induction of cytokines by human neonatal, adult, and elderly monocyte/macrophages infected with dengue virus." *Viral Immunology.* 2014; 27 (4): 151–59.
- Vasilakis N, Cardos J, Hanley KA, Holmes EC, Weaver SC. "Fever from the forest: Prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health." *Nat Rev Microbiol.* 2012; 9 (7): 532–41.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, et al. "Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity." *J Infect Dis.* 2000; 181 (1): 2–9.
- Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, Nasar F, et al. "Genome-Scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates" *J Virol.* 2010; 84 (13): 6497–6504.
- Wadhvani GG. "Homeopathic drug therapy homeopathy in chikungunya fever and post-chikungunya chronic arthritis: An observational study." *Homeopathy.* 2013



102 (3): 193–98.

Weaver SC, Forrester NL. “Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread.” *Antivir Res.* 2015; 120: 32–39.

Weinbren MP, Haddow AJ, Williams MC. “The occurrence of chikungunya virus in Uganda.” *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1958; 52 (3): 253–62.

World Health Organization. (1985). “WHO Scientific Group on Arthropod-Borne and Rodent-Borne Viral Diseases & World Health Organization.” 1985. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/39922>.

\_\_\_\_\_. (1986). *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*, 1st ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41988>

\_\_\_\_\_. 2003. “WHO Guidelines on Safety Monitoring of Herbal Medicines in Pharmacovigilance Systems.” 82pp.

\_\_\_\_\_. (2009). *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control : new edition.* World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188>

\_\_\_\_\_. (2017). “Chikungunya.” Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>> Acessado em: 10 de dezembro de 2019.

Wu SJL, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, et al. “Human skin langerhans cells are targets of dengue virus infection.” *Nature Medicine.* 2000; 6 (7): 816–20

Yoon IK, Alera MT, Lago CB, Tac-an IA, Villa D, Fernandez S, Thaisomboonsuk B, et al. “High rate of subclinical chikungunya virus infection and association of neutralizing antibody with protection in a prospective cohort in The Philippines.” *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9 (5): 1–14.

Zeng K, Thompson KE, Yates CR, Miller DD. “Synthesis and Biological Evaluation of Quinic Acid Derivatives as Anti-Inflammatory Agents.” *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19 (18): 5458–60.