

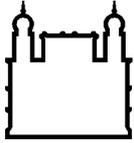
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ATIVIDADE ANTIVIRAL E IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS
ORIGINADOS DE *UNCARIA SP.* EM INFECÇÃO *IN VITRO* DE
LINHAGEM CONTÍNUA DE HEPATÓCITOS HUMANOS PELO VÍRUS
DENGUE

CÍNTIA DA SILVA MELLO

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CÍNTIA DA SILVA MELLO

Atividade antiviral e imunomoduladora de extratos originados de *Uncaria sp.* em infecção *in vitro* de linhagem contínua de hepatócitos humanos pelo vírus Dengue

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

Orientadora: Dra. Claire Fernandes Kubelka.

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ICICT / FIOCRUZ - RJ

M527...Mello, Cíntia da Silva

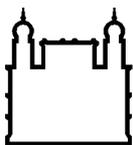
Atividade antiviral e imunomoduladora de extratos originados da *Uncaria sp.* em infecção *in vitro* de linhagem contínua de hepatócitos humanos pelo vírus Dengue / Cíntia da Silva Mello. – Rio de Janeiro, 2015.

xx, 119 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.
Bibliografia: f. 95-110.

1. Dengue. 2. *Uncaria sp.* 3. Huh-7. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: CÍNTIA DA SILVA MELLO

ATIVIDADE ANTIVIRAL E IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS ORIGINADOS
DE *UNCARIA SP.* EM INFECÇÃO *IN VITRO* DE LINHAGEM CONTÍNUA DE
HEPATÓCITOS HUMANOS PELO VÍRUS DENGUE

ORIENTADORA: Dra. Claire Fernandes Kubelka.

Aprovada em: 24 / 02 / 2015.

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Carmen Penido Monteiro – Presidente.

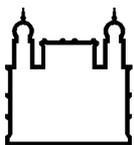
Prof. Dra. Luciana Barros de Arruda.

Prof. Dra. Andrea Henrique Pons.

Prof. Dra. Iranaia Assunção Miranda.

Prof. Dra. Patrícia Cristina Neves.

Rio de Janeiro, 24 de Fevereiro de 2015.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedico este trabalho à minha Mãe Sônia *in memoriam*,
minha “borboleta-guia”, meu anjo, minha inspiração.

À Sra., todo meu amor e saudade.

Te amo hoje, amanhã e sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo o que tens feito, por tudo que vais fazer. Por tuas promessas e tudo que És. O Dono do meu ser, meu Senhor e Salvador;

À Dra. Claire Kubelka, por ter depositado confiança na minha trajetória. Obrigada por todos os anos de sabedoria e amizade que me foram proporcionados. Obrigada por ser meu exemplo de profissional e excelência. Sentirei saudades;

À Dra. Sônia Regina Nogueira Ignácio Reis e à Técnica Maryrose Lavatori (FIOCRUZ), pelos primeiros ensinamentos. Obrigada pela paciência e palavras de incentivo;

Ao Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior, o qual foi meu co-orientador na época da iniciação científica e, mais que isso, um grande amigo de trabalho. Obrigada pela parceria e conhecimentos compartilhados;

Aos pesquisadores Ligia Marinho Valente (UFRJ), e Antonio Carlos Siani (Far-Manquinhos – FIOCRUZ) pela parceria e concessão dos extratos utilizados neste trabalho;

Às Doutoradas que aceitaram o convite da leitura deste projeto, sugerindo melhorias, de forma a aperfeiçoar o mesmo. Sobretudo, à Dra. Carmem Penido pelo belíssimo trabalho de revisão;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz;

Ao CNPq, a FAPERJ e ao PDTIS pelo apoio financeiro;

À minha tão amada Mãe Sônia *in memoriam*, por todos os seus ensinamentos e dedicação. Àquela que me amava incondicionalmente, e tudo fez para criar a mim e ao meu Irmão Igor. Obrigada por me ensinar a ser uma mulher guerreira e determinada. Meus caminhos hoje se resumem em te orgulhar. Amo-te eternamente;

Aos meus avós Josefa *in memoriam* e Luiz, por serem meus ícones de amor, bondade e família. Meu vovô, que tanto acredita nos meus sonhos e torce pela minha felicidade, Obrigada por tudo, te amo demais;

Aos meus tios Maria da Conceição e Cláudio, por todo carinho, apoio e amor. Pessoas fundamentais em minha vida, exemplos de garra e superação. Amo vocês;

Ao meu irmão Igor, por todos as alegrias, briguinhas e por torcer pelo meu sucesso. Às minhas primas-irmãs Tatiana e Talita, por serem tão amigas e confidentes. Amo vocês, meus lindos;

Ao meu namorado Thiago, por todo apoio, amor, carinho e compreensão. Você me faz muito feliz. Obrigada por ser meu companheiro de alegrias e tristezas. Te amo, Amore;

À minha Grande Família, que mesmo com tantas atribuições permanece unida e forte. Obrigada a cada um;

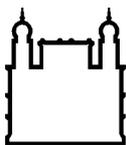
À minha sogra Eliete, por ser tão generosa e amiga. Por me apoiar como mãe e torcer pela minha felicidade. Obrigada por ser tão especial;

À minha "gêmula" Jéssica por ser uma amiga tão leal e indispensável em todos os momentos da minha vida. Te amo;

À toda família do Laboratório de Imunologia Viral, especialmente, a todos os companheiros da B120, por fazerem meus dias mais divertidos. Minhas pedras preciosas;

A todos que de alguma maneira me ajudaram na caminhada até este momento.

“Tudo posso naquEle que me fortalece”.
Filipenses 4:13.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

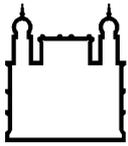
ATIVIDADE ANTIVIRAL E IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS ORIGINADOS DE *UNCARIA SP.*
EM INFECÇÃO *IN VITRO* DE LINHAGEM CONTÍNUA DE HEPATÓCITOS HUMANOS PELO VÍRUS
DENGUE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Cíntia da Silva Mello

A incidência de dengue em todo o mundo tem aumentado nas últimas décadas. As respostas imunológicas exacerbadas desempenham um papel crucial para a sua fisiopatologia, tais como a indução do extravasamento plasmático, originado principalmente pela produção de uma cascata de citocinas inflamatórias e que podem induzir distúrbios de coagulação e alteração da permeabilidade vascular levando, eventualmente, a hemorragias graves e ao choque. Os produtos naturais, que têm propriedades imunomoduladoras descritas na etnofarmacologia, podem promover o controle da replicação viral e uma redução de citocinas que induzem a permeabilidade endotelial, o que poderia resultar em manifestações clínicas mais leves. O objetivo deste estudo foi investigar se compostos provenientes de uma planta medicinal poderiam modular a resposta imune inata associada com características imunopatológicas na infecção pelo vírus Dengue (DENV), usando um modelo de infecção *in vitro* com linhagens contínuas de hepatócitos humanos (Huh-7). **Métodos e Resultados:** Após infecção das células-alvo Huh-7 pelo DENV-2, as culturas foram tratadas com lotes únicos de extratos hidroalcoólicos de *Uncaria sp.* (UGC ou UGF), em diferentes concentrações. A taxa de células contendo antígenos virais foi determinada após períodos de incubação por imunofluorescência vírus específica e citometria de fluxo. A proteína viral não estrutural (NS1), indicativa de replicação viral, foi detectada nos sobrenadantes de cultura de células assim como as citocinas/quimiocinas MIF, IL-8 e IL-6, todas determinadas por ensaios de ELISA. Nos mesmos sobrenadantes, a produção do fator inflamatório óxido nítrico foi determinada indiretamente pela detecção de nitrito (Reação de Griess). Além disso, foram observados por citometria de fluxo alterações de viabilidade celular, apoptose e necrose, utilizando marcações pelo kit LIVE/DEAD e por Anexina V e Iodeto de propídio (PI). Foram observados efeitos antivirais de UGC e UGF, estatisticamente significantes, em comparação com células não tratadas, em concentrações que reduziram a frequência de células positivas para o antígeno viral e a quantidade de NS1 secretada. Efeitos imunomoduladores significantes foram mostrados pela redução da secreção de MIF, IL-8 e IL-6. Houve um aumento na produção de nitrito em culturas infectadas e tratadas com os dois extratos em diferentes concentrações, além de redução das taxas de apoptose e necrose, significantes. **Conclusão:** Existem compostos ativos na espécie vegetal que possuem capacidades antiviral e imunomoduladora. Sendo assim, mostraram-se potenciais candidatos para o desenvolvimento de um produto para tratamento da dengue. Apoiado por FIOCRUZ / RPT11D; IOC / PROEP; CNPq; FAPERJ; CAPES.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANTIVIRAL AND IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF EXTRACTS ORIGINATED FROM *UNCARIA SP.* IN INFECTION *IN VITRO* CONTINUOUS LINE OF HUMAN HEPATOCYTES BY THE VIRUS DENGUE

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGY PARASITARY

ABSTRACT

Cíntia da Silva Mello

The incidence of dengue worldwide has increased in recent decades. The exacerbated immune responses play a crucial role in the infection pathophysiology, such as the induction of plasma extravasation. It is caused mainly by the production of a cascade of inflammatory cytokines that can induce coagulation disorders and alterations in vascular permeability leading, eventually, to severe hemorrhages and shock. Natural products, which have immunomodulatory properties described in ethnopharmacology, can promote the control of viral replication and a reduction of cytokines that induce endothelial permeability, which could result in milder clinical manifestations. The aim of this study was to investigate whether compounds from a medicinal plant could modulate the innate immune response associated with immunopathological characteristics in infection Dengue virus (DENV), using an *in vitro* model of infection with continuous lines of human hepatocytes (Huh-7). **Methods and Results:** After infection of Huh-7 target cells by DENV-2, cultures were treated with single lots hydroalcoholic extracts of *Uncaria sp.* (UGC or UGF), at different concentrations. The rate of cells containing viral antigens was determined after incubation periods by virus-specific immunofluorescence and flow cytometry. Viral non-structural protein (NS1), indicative of viral replication, was detected in cell culture supernatants and cytokines/chemokines, MIF, IL-8 and IL-6, all determined by ELISA assays. In the same supernatants, the production of inflammatory factor nitric oxide was determined indirectly by nitrite (Griess reaction). Moreover, cells were analyzed by flow cytometry for cell viability changes, apoptosis and necrosis, by using LIVE/DEAD and Annexin V and Propidium iodide (PI) kits. Antiviral effects were observed by UGC and UGF, statistically significant, compared to untreated cells at concentrations that reduced the rate of viral antigen positive cells, and the amount of the secreted NS1. Significant immunomodulatory effects were shown by the reduction in secretion of MIF, IL-8 and IL-6. An increase in nitrite production in infected and treated cells was observed with the two extracts in different concentrations. In addition, reduced rates of apoptotic and necrotic cells were significant. **Conclusion:** There are active compounds in plant species that have antiviral and immunomodulatory capabilities. Therefore, were potential candidates for the development of a product for treatment of dengue. Supported by FIOCRUZ/RPT11D; IOC/PROEP; CNPq; FAPERJ; CAPES.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico e epidemiologia da dengue	1
1.1.1. Dengue nas Américas e no Brasil	1
1.2. O vírus Dengue	10
1.2.1. A família <i>Flaviviridae</i>	10
1.2.2. Variações genéticas do vírus dengue	10
1.2.3. Características estruturais do vírus	11
1.2.4. Morfogênese viral	15
1.2.5. Ciclo de transmissão	18
1.2.6. Células alvo e replicação viral	18
1.2.7. Manifestações clínicas	19
1.2.7.1. Dengue	20
1.2.7.2. Dengue Grave	21
1.2.8. Patogênese da dengue	22
1.2.8.1. Teoria da facilitação dependente de anticorpos	23
1.2.8.2. Teoria da virulência viral	23
1.2.8.3. Teoria do pecado antigênico original	24
1.2.8.4. Teoria do mimetismo molecular	25
1.2.8.5. Teoria do polimorfismo genético	25
1.2.8.6. Teoria da interação multifatorial	26
1.3. Os papéis de mediadores e processos biológicos na resposta imunológica da dengue	26
1.4. Células hepáticas na dengue	29
1.4.1. Células de Hepatocarcinoma Humano (Huh-7)	29
1.5. Vacinas para a dengue	30
1.6. Drogas antivirais	30
1.7. Plantas Medicinais	31
1.7.1. Produtos Naturais	34
1.7.2. Fitoterápicos	34
1.8. <i>Uncaria sp.</i>	35
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS	38
3.1. OBJETIVO GERAL	38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Materiais e reagentes	39
4.1.1. Meios de cultura	39
4.1.2. Reagentes	39
4.1.3. Soluções gerais	40
4.1.4. Soluções para citometria de fluxo	40

4.1.5. Soluções para ELISA MIF / IL-8 -----	41
4.1.6. Soluções para ELISA IL-6-----	42
4.1.7. Soluções de kit para marcação de células mortas fixadas "LIVE/DEAD" (Vivas/mortas) -----	42
4.1.8. Soluções para FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I-----	43
4.1.9. Reconstituição dos reagentes do kit <i>Platelia</i> Dengue NS1 Ag:-----	43
4.1.10. Anticorpos e marcadores protêicos -----	43
4.2. Cepa viral-----	43
4.2.1. Produção da massa viral -----	44
4.2.2. Titulação viral-----	44
4.3. Amostras vegetais-----	44
4.3.1. Preparo das amostras vegetais -----	45
4.4. Manutenção das Huh-7-----	45
4.5. Ensaio de viabilidade celular / citotoxicidade – MTT-----	46
4.6. Infecção / tratamento das Huh-7 -----	47
4.7. Citometria de fluxo -----	47
4.7.1. Marcação intracelular do antígeno viral-----	47
4.8. Avaliação da produção de NS1 nos sobrenadantes das culturas-----	48
4.8.1. Detecção semi-quantitativa de NS1 -----	48
4.9. Avaliação da produção de MIF, IL-8 e IL-6 nos sobrenadantes das culturas-----	48
4.10. Avaliação da viabilidade celular por marcação de proteína celular-----	49
4.10.1. Kit para marcação de células mortas fixadas "Live/Dead" (Vivas/mortas) com Marcação Intracelular do Ag Denv -----	49
4.10.2. Kit para detecção de apoptose com Anexina V FITC-----	50
4.11. Avaliação indireta da produção de óxido nítrico (NO) -----	51
4.12. Análise estatística -----	51
5. RESULTADOS-----	52
5.1. Padronização do modelo de infecção pelo vírus Dengue usando a linhagem de hepatócitos Huh-7 e produção de mediadores inflamatórios -----	52
5.2. Efeitos citotóxicos dos tratamentos com os extratos UGC e UGF sobre a linhagem contínua de Huh-7, usando ensaio de viabilidade celular (MTT).-----	60
5.3. Avaliação da atividade antiviral dos extratos de UGC e UGF, determinado pela dosagem de NS1 secretada, em linhagem contínua de células Huh-7 infectadas por DENV-2-----	62
5.3.1. Efeitos dos extratos UGC / UGF na detecção de antígenos virais intracelulares, em linhagem contínua de células Huh-7 infectadas por DENV-2.-----	65
5.4. Avaliação do efeito imunomodulador dos extratos de UGC e UGF-----	67
5.4.1. Produção de MIF nos sobrenadantes das culturas de Huh-7 infectadas por DENV-2 e tratadas com UGC -----	67
5.5. Avaliação da viabilidade das células Huh-7 infectadas com DENV-2 e os efeitos dos extratos nessa viabilidade (uso do kit Live/Dead) -----	69
5.6. Avaliação da apoptose e da viabilidade de células Huh-7 infectadas por DENV e a associação com os efeitos dos extratos (marcação por Anexina V e iodeto de propídio)-----	73

5.7. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) na linhagem celular Huh-7 infectada e tratada, por UGC e UGF -----	75
5.8. Relação entre NS1, apoptose, necrose e produção de óxido nítrico, no modelo de Huh-7 infectada por DENV-2. -----	77
5.9. Avaliação da atividade imunomoduladora dos extratos UGC e UGF -----	79
5.9.1. Efeito imunomodulador de UGC e UGF determinado pela dosagem de IL-8, nos sobrenadantes das células Huh-7 infectadas por DENV-2. -----	79
5.9.2. Efeito imunomodulador de UGC e UGF determinado pela dosagem de IL-6, nos sobrenadantes das células Huh-7 infectadas por DENV-2. -----	81
6. DISCUSSÃO-----	83
7. CONCLUSÃO -----	93
8. PERSPECTIVAS -----	94
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	95
10. ANEXOS -----	111
ANEXO A: Densidades ópticas dos tratamentos de UGC sobre Huh-7 - MTT -----	111
ANEXO B: Taxas do ensaio de viabilidade (MTT) em Huh-7 tratadas com UGC comparadas com o Controle (24h-96h)-----	112
ANEXO C: Densidades ópticas dos tratamentos de UGF sobre Huh-7 - MTT-----	113
ANEXO D: Taxas do ensaio de viabilidade (MTT) em Huh-7 tratadas com UGF comparadas com o Controle (24h-96h)-----	114
ANEXO E : ANEXINA V FITC / PI - Controles sem Infecção -----	115
ANEXO F : ANNEXIN V FITC / PI - Controles infectados com DENV-2-----	116
ANEXO G: Reação de Griess - Controles-----	117
ANEXO H: Médias das Taxas de NS1 -----	118
ANEXO I: Resumo dos resultados de Huh-7 DENV+ tratadas com UGC e UGF.....	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Reinfestação das Américas pelo <i>Aedes aegypti</i> (1930 – 2011).....	2
Figura 2: Propagação global dos sorotipos da dengue (1943 - 2013).	4
Figura 3: Reintrodução do <i>Aedes aegypti</i> no Brasil	5
Figura 4: Características estruturais e genômicas do vírus Dengue (DENV)	12
Figura 5: Imagem computadorizada da estrutura tridimensional do vírus Dengue.	14
Figura 6: Ciclo de replicação do vírus Dengue.....	17
Figura 7: Nova classificação da Dengue de acordo com a OMS, 2009.....	20
Figura 8: <i>Uncaria sp.</i>	36
Figura 9: Morfologia celular das Huh-7 na análise por citometria de fluxo.....	53
Figura 10: Marcação Intracelular do Antígeno Viral do DENV por imunofluorescência e análise por citometria de fluxo	54
Figura 11: Produção da proteína viral não-estrutural NS1 em células Huh-7 infectadas pelo DENV-2	55
Figura 12: Detecção do mediador inflamatório MIF, no modelo de infecção de Huh-7 pelo DENV-2	56
Figura 13: Detecção do mediador inflamatório IL-8, no modelo de infecção de Huh-7 pelo DENV-2	57
Figura 14: Detecção do mediador inflamatório IL-6, no modelo de infecção de Huh-7 pelo DENV-2	58
Figura 15: Produção do mediador NO através da detecção indireta de nitrito no modelo de infecção de Huh-7 pelo DENV-2.	59
Figura 16: Viabilidade Celular (%) da linhagem de células Huh-7 tratadas com UGC (24h-96h), por MTT.....	60
Figura 17: Viabilidade Celular (%) da linhagem de células Huh-7 tratadas com UGF (24h-96h), por MTT.....	61
Figura 18: Detecção da proteína não estrutural NS1 após tratamento por UGC.....	63
Figura 19: Detecção da proteína não estrutural NS1 após tratamento por UGF	64
Figura 20: Detecção de antígenos virais intracelulares em células da linhagem Huh-7 infectadas por DENV-2 e tratadas com UGC	65
Figura 21: Detecção de antígenos virais intracelulares em células da linhagem Huh-7 infectadas por DENV-2 e tratadas com UGF	66
Figura 22: Produção de MIF em sobrenadantes de células Huh-7 infectadas com DENV-2 e tratadas com UGC.	67
Figura 23: Produção de MIF em sobrenadantes de células Huh-7 infectadas com DENV-2 e tratadas com UGF.	68
Figura 24: Determinação da viabilidade de células Huh-7 infectadas e tratadas por UGC com kit LIVE/DEAD e detecção do Ag DENV intracelular (24h-72h).	70
Figura 25: Determinação da viabilidade de células Huh-7 infectadas e tratadas por UGF com kit LIVE/DEAD e detecção do Ag DENV intracelular (24h-72h).	72
Figura 26: Apoptose e necrose nas células Huh-7 infectadas pelo DENV-2 e efeito do tratamento por UGC determinados por Anexina V e PI.....	73
Figura 27: Apoptose e necrose nas células Huh-7 infectadas pelo DENV-2 e efeito do tratamento por UGF determinados por Anexina V e PI	74
Figura 28: Detecção de nitrito nos sobrenadantes de células Huh-7 infectadas com DENV-2 e tratadas com UGC (24h-72h).....	75

Figura 29: Detecção de nitrito nos sobrenadantes de células Huh-7 infectadas com DENV-2 e tratadas com UGF (24h-72h)	76
Figura 30: Detecção da proteína viral não estrutural NS1 em células Huh-7 tratadas com UGC	77
Figura 31: Detecção da proteína viral não estrutural NS1 em células Huh-7 tratadas com UGF	78
Figura 32: Efeito Imunomodulador de UGC na produção de IL-8 pela linhagem Huh-7 (24h-72h)	79
Figura 33: Efeito Imunomodulador de UGF na produção de IL-8 pela linhagem Huh-7 (24h-72h)	80
Figura 34: Efeito Imunomodulador de UGC na produção de IL-6 pela linhagem Huh-7 (24h-72h)	81
Figura 35: Efeito Imunomodulador de UGF na produção de IL-6 pela linhagem Huh-7 (24h-72h)	82

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Casos notificados de dengue e taxas de incidência por 100 mil habitantes nos municípios com população acima de 100 mil habitantes com maior registro de casos em 2014.....	8
Tabela II: Número de amostras examinadas, percentual de positividade e sorotipos virais de dengue confirmados em 2014, por região e Unidade da Federação.....	9
Tabela III: Receptores do vírus Dengue em diferentes tipos celulares.....	16

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac = Anticorpo.

a.C = Antes de Cristo.

ADE = Facilitação dependente de anticorpo (do inglês *antibody-dependent enhancement*).

Ag = Antígeno.

AP-1 = Proteína ativadora-1.

APMc = Adenosina monofosfato cíclica.

BFA = Brefeldina A.

BSA = Albumina bovina.

C6/36 = Células de glândula salivar do mosquito da espécie *Aedes albopictus*.

CC = Controle.

CCL = Ligante 3 de CC quimiocinas/proteína.

CO = *Cut-off*, limite ou ponto de corte entre positivo e negativo (calibrador).

CSFV = Vírus da peste suína clássica.

d.C = Depois de Cristo.

DC = Célula dendrítica.

DC-SIGN = Ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de célula dendrítica (do inglês *DC-specific ICAM-grabbing nonintegrin*).

DEN = Dengue.

DENV = Vírus da Dengue.

DENV-1 = Vírus da Dengue sorotipo 1.

DENV-2 = Vírus da Dengue sorotipo 2.

DENV-3 = Vírus da Dengue sorotipo 3.

DENV-4 = Vírus da Dengue sorotipo 4.

DMSO = Dimetil sulfóxido (do inglês *Dimethyl sulfoxide*).

DO = Densidade óptica.

ELISA = Método imunoenzimático (do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*).

EUA = Estados Unidos da América.

FACS = Classificação de células ativadas por fluorescência (do inglês *Fluorescence-activated cell sorting*), aplicada para citometria de fluxo.

Fc = Fragmento cristalizado.

FcR γ = Receptor para porção Fc de anticorpos classe γ (G).

FD = Febre da dengue.

FHD = Febre hemorrágica da dengue.
FIOCRUZ = Fundação Oswaldo Cruz.
FITC = Isotiocianato de fluoresceína.
GMPc = guanosina monofosfato cíclica.
GRP78/BiP = Proteína reguladora de glicose 78.
H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio.
H₂SO₄ = Ácido sulfúrico.
H₃PO₄ = Ácido fosfórico.
HCV = Vírus da hepatite C.
HepG2 = Células de carcinoma hepatocelular humano.
HMEC-1 = Célula endotelial da microvasculatura dermal humana-1.
HPLC = Cromatografia líquida de alta performance (do inglês *High performance liquid chromatography*).
HRP = Do inglês *Horseradish Peroxidase*.
Huh-7 = Célula de hepatocarcinoma humano-7.
ICAM-1 = Molécula de adesão intercelular-1.
IFN = Interferon.
IL-1 = Interleucina-1.
IL-10 = Interleucina-10.
IL-6 = Interleucina-6.
IL-8 = Interleucina-8.
IOC = Instituto Oswaldo Cruz.
JEV = Vírus da encefalite japonesa.
MIF = Fator inibidor da migração de macrófagos (do inglês *Factor Macrophage Migration Inhibitor*).
MIP-1 α = Proteína inflamatória de macrófago-1 α (do inglês *Macrophage Inflammatory Protein-1 α*).
MTT = 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-yl) – brometo de difenil tetrazólio.
NAP = Acetato de NG-metil-L-arginina.
NF-kb = Fator nuclear-kB.
NH₄OH = Hidróxido de amônio.
NO = Óxido nítrico.
NOS = Óxido nítrico sintetase.
NS1 = Proteína viral não-estrutural-1.
OMS = Organização Mundial de Saúde.

OPAS = Organização Pan-Americana de Saúde.

ORF = Fase aberta de leitura (do inglês *Open Reading Frame*).

PBMCS = Células mononucleares do sangue periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*).

PBS = Tampão salina fosfato.

PFA = Paraformaldeído.

PI = Iodeto de propídio (do inglês *Propidium Iodide*).

PKs = Proteínas quinases.

prM = Precursor da proteína M.

Proteína C = Proteína do Capsídeo.

Proteína E = Proteína do Envelope.

Proteína M = Proteína de Membrana.

PS = Fosfatidilserina.

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

RT = Temperatura ambiente (do inglês *room temperature*).

SCD = Síndrome do choque da dengue.

SE = Semana epidemiológica.

SFB = Soro fetal bovino.

SNAP = S-nitroso-N-acetilpenicilamina.

sVCAM-1 = Molécula de adesão celular vascular solúvel-1.

SVS/MS = Secretaria de Vigilância e Saúde do Ministério da Saúde.

TCID₅₀ = Do inglês *50% tissue culture infectious dose*.

TGF- β = Fator transformador de crescimento- β (do inglês *Transforming Growth Factor- β*).

THP-1 = Linhagem monocítica humana-1.

TMB = 3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina.

TNF- α = Fator de necrose tumoral- α .

UFRJ = Universidade Federal do Rio de Janeiro.

UGC = Extrato bruto das cascas do caule de *Uncaria sp.*

UGF = Extrato bruto das folhas de *Uncaria sp.*

UTFA = *Uncaria tomentosa* fração alcaloide.

VEC = Células endoteliais vasculares.

VEGF = Fator de crescimento vascular endotelial (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*).

YFV = Vírus da febre amarela.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e epidemiologia da dengue

A dengue é uma doença antiga e bem adaptada ao homem, causando sintomas brandos na maioria dos casos, entretanto em torno de 10% evolui para a forma grave (1). Ainda, ocupa o posto de doença emergente e reemergente mais importante em morbidade e mortalidade na atualidade (2). Esta enfermidade é considerada um dos mais sérios problemas de saúde pública do mundo, afetando mais de 100 países, com mais de 50 milhões de ocorrências por ano. Esta arbovirose que emerge em áreas urbanas pobres e porções periféricas dos países, principalmente aqueles situados nas zonas tropicais e subtropicais (3). Mais de 2,5 bilhões de pessoas – 40% da população mundial – vivem em áreas de risco (4). A atual incidência anual global, aproxima-se de 390 milhões, o triplo do número de casos estimados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2009 (5).

Tal enfermidade impõe uma carga social difícil de ponderar, com grande demanda por atendimento médico, comprometimento laboral e de estudo, além do impacto negativo na qualidade de vida das pessoas e familiares afetados (6). São apontados diversos fatores como responsáveis pelo ressurgimento e emergência desta epidemia, como: mudanças climáticas, demográficas e sociais, urbanização e transporte de produtos, vigilância falha, complacência frente às doenças infecciosas e vetores, falta de recursos para a saúde pública e pesquisas, além de programas de controle e prevenção ineficientes (5, 7-10).

1.1.1. Dengue nas Américas e no Brasil

A principal espécie transmissora da dengue possui origem no Egito, na África, e espalha-se pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta desde o século 16, período das Grandes Navegações. É de consenso que o vetor tenha sido introduzido no Novo Mundo, no período colonial, por meio de navios que traficavam escravos. Ele foi descrito cientificamente pela primeira vez em 1762, quando foi denominado *Culex aegypti*. O nome definitivo – *Aedes aegypti* – foi estabelecido em 1818, após a descrição do gênero *Aedes*. Relatos da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) mostram que a primeira epidemia de dengue no continente americano ocorreu no Peru, no início do século 19, com surtos no Caribe, Estados Unidos, Colômbia e Venezuela (11, 12).

O vírus Dengue foi isolado somente na década de quarenta, por Kimura, em 1943, e Hotta, em 1944, sendo a cepa denominada *Mochizuki*. Em 1945, Sabin e Schlesinger, isolaram a cepa Havaí, quando o primeiro, neste mesmo ano, ao identificar outro vírus em Nova Guiné, observou que as cepas tinham características antigênicas distintas e passou a considerar que eram sorotipos do mesmo vírus. Às primeiras cepas ele denominou sorotipo 1 e à da Nova Guiné sorotipo 2. Em 1956, no curso da epidemia de dengue hemorrágica no Sudeste Asiático, foram isolados os vírus 3 e 4, definindo-se, a partir daí, que o complexo dengue é formado por quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (12, 13). Todavia, é importante ressaltar a sugestão de um quinto sorotipo que, sendo reconhecido como transmissível assim como os outros, pode seguir um padrão similar de distribuição geográfica, visto com estes ao longo das últimas duas décadas (5).

Nas Américas, a epidemia de dengue foi efetivamente controlada, simultaneamente a de febre amarela na maior parte da região. O Programa de Erradicação do *Aedes aegypti*, conseguiu eliminar o mosquito vetor de 23 países durante os anos 1950 e 1960 (14) (FIGURA 1). Contudo, quando este programa foi encerrado no início de 1970, o *Aedes aegypti* começou a reinfestar os países tropicais das Américas (FIGURA 1). Esta re-invasão do vetor coincidiu com o crescimento urbano dramático nos trópicos americanos, e no final da mesma década, os vírus da dengue estavam começando a ser introduzidos a partir da Ásia (15, 16).

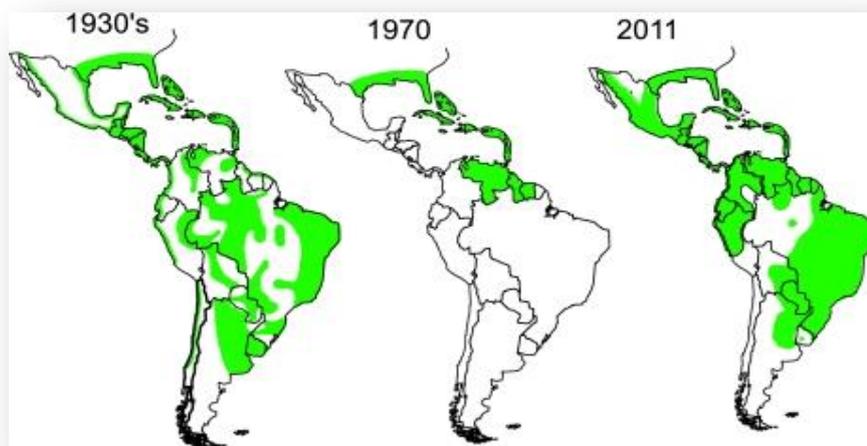


Figura 1: Reinfestação das Américas pelo *Aedes aegypti* (1930 – 2011).

Fonte: Gubler, Duane J., 2011.

O sorotipo 1, apareceu pela primeira vez em 1977, inicialmente na Jamaica, mas foi a partir de 1980 que foram notificadas epidemias em vários países. O sorotipo 2, encontrado em Cuba, foi o responsável pelo primeiro surto de febre hemorrágica ocorrido fora do Sudoeste Asiático e Pacífico Ocidental (17, 18). Em outubro de 1989, eclodiu na Venezuela o segundo surto de Febre Hemorrágica do Dengue (FHD), totalizando 8.619 casos e 117 óbitos, com isolamento dos vírus DEN-1, DEN-2 e DEN-4. Dois terços dos casos ocorreram em crianças menores de 14 anos, sendo considerado o segundo episódio mais grave nas Américas (19). No entanto, essa época se destaca pela intensa circulação dos vírus no continente americano e os países que mais notificaram casos foram: Brasil, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai, Porto Rico e Venezuela (19). Chegando à década de 90, o quadro epidemiológico das Américas e do Caribe agravou-se e epidemias de dengue foram intensamente notificadas em diversos centros urbanos, muitas delas associadas à ocorrência de casos de dengue hemorrágico (20).

Durante as três últimas décadas, ocorreu um crescimento progressivo dos casos de dengue nas Américas, alcançando quase a totalidade dos países da região (21). No ano de 2002, foram notificados surpreendentemente mais de um milhão de casos de Febre da dengue (FD) em mais de 30 países da América Latina. Destes, 17 mil casos foram de Febre hemorrágica da dengue (FHD) notificados em 20 países, totalizando 225 óbitos (22). Messina e colaboradores / 2014, fizeram um mapeamento da propagação individual de cada sorotipo pelo planeta nos últimos 70 anos, desde 1943, pelo qual podemos observar o grande acometimento no Brasil (23) (FIGURA 2).

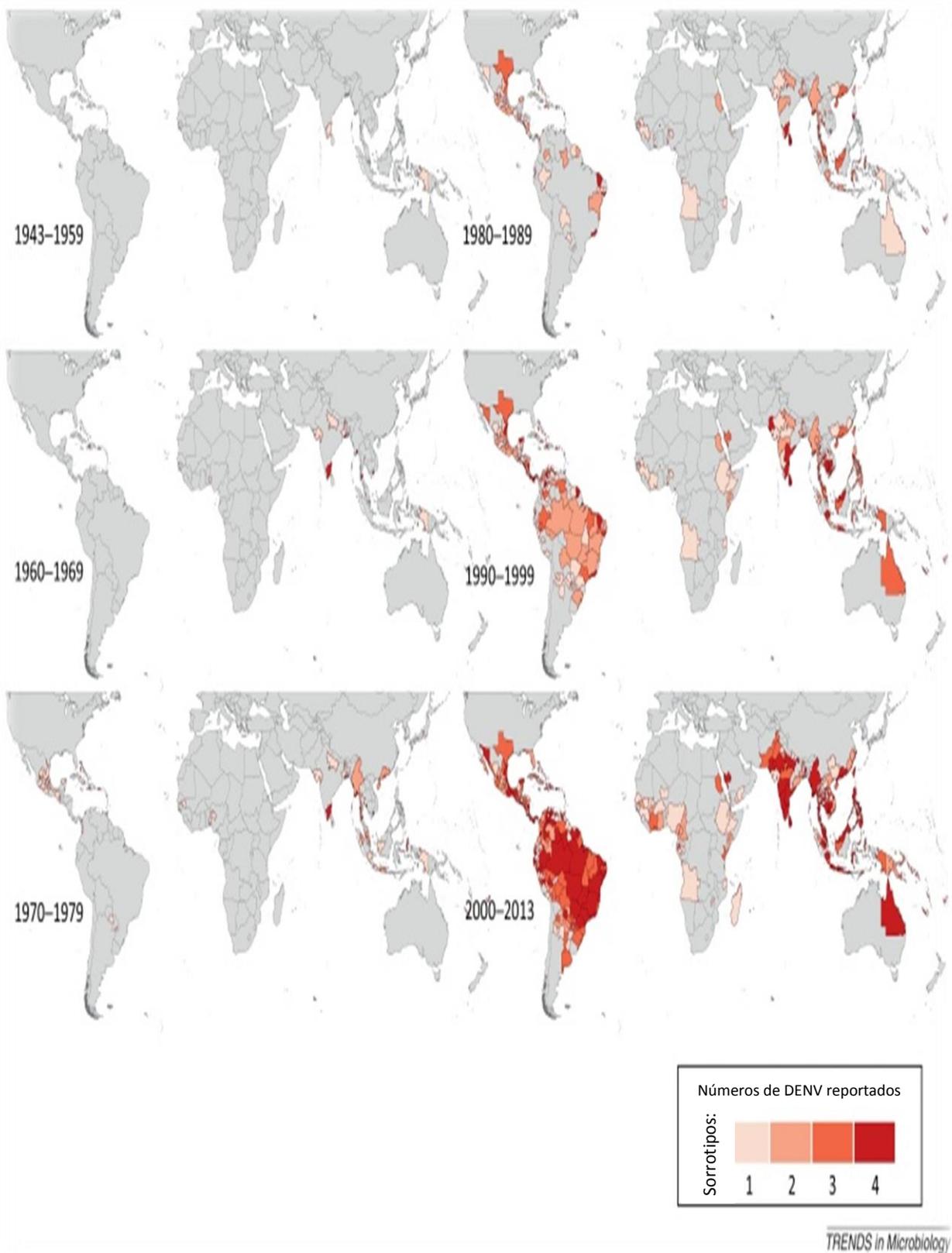


Figura 2: Propagação global dos sorotipos da dengue (1943 - 2013).

Fonte: Adaptada de Messina, J.P., *et al.*, 2014.

Como já mencionado, o programa para erradicar o *Aedes aegypti* do Brasil, iniciado em 1947, foi declarado um sucesso pela OMS em 1958. Entretanto, no ano de 1970, o vetor voltou a ser capturado em território brasileiro. Os pesquisadores acreditam que sua reintrodução no país ocorreu não apenas uma, mas duas vezes, seguindo caminhos diferentes em cada uma delas. Tal conclusão foi baseada pela análise genética das populações do mosquito da dengue no Brasil, onde observaram que os insetos encontrados entre o nordeste e o sudeste parecem ser oriundos do Caribe. Já aqueles do norte seriam originários de outra parte das Américas, na região compreendida entre a Venezuela e o sudeste dos Estados Unidos (FIGURA 3). Sendo assim, embora a campanha tenha sido eficaz no sentido de evitar novos casos de febre amarela, quando o vírus da Dengue chegou ao Brasil, na década de 80 do século passado, encontrou um ambiente propício para a sua disseminação. Com os mosquitos transmissores espalhados por todo o território nacional, as epidemias da doença se tornaram frequentes (24).



Figura 3: Reintrodução do *Aedes aegypti* no Brasil. Em 1970, houve a introdução do principal mosquito vetor da dengue no território nacional, a partir de duas origens diferentes. Dessa maneira, facilitando o aparecimento de epidemias na década de 80.

Fonte: Fernando A. Monteiro, *et al*, 2014. Arte: Jefferson Mendes, 2014.

A primeira descrição de um surto de dengue no Brasil após a reinfestação, com casos confirmados laboratorialmente, ocorreu na cidade de Boa Vista, Estado de Roraima, entre 1981 e 1982 (2, 25). Estima-se que 11 mil pessoas foram infectadas, marcando a introdução dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 no país (26). Alguns anos depois, em 1986, ocorreram epidemias no Rio de Janeiro e em algumas capitais do Nordeste, causada pelo DENV-1 (27). Este sorotipo foi reintroduzido no Brasil, tendo sido isolado em Nova Iguaçu, cidade que compõe a segunda maior região metropolitana do país, situada no estado do Rio de Janeiro. A partir daí, a dengue passou a se disseminar com surpreendente força de transmissão para as cidades vizinhas, incluindo Niterói e Rio de Janeiro. Desse modo, só naquele primeiro ano, mais de 33.500 casos foram notificados; em 1987, cerca de 60 mil, com taxas de incidência alcançando mais de 276 e 490 por 100 mil habitantes, respectivamente. São Paulo, Bahia e Minas Gerais foram acometidos por surtos localizados em pequenas cidades (28).

Nos dois primeiros anos da década de 1990, a dengue permaneceu quase que exclusivamente nas cidades dos Estados do Rio de Janeiro, Ceará, Alagoas e Pernambuco, com poucas notificações de casos oriundos do Mato Grosso e do Mato Grosso do Sul (28). Nos anos seguintes, a circulação dos dois sorotipos virais (DENV-1 e 2) se expandiu rapidamente para outras áreas do território brasileiro, acompanhada da expansão do seu principal mosquito vetor, o *Aedes aegypti* (29). Em 1999, o sorotipo DENV-3 foi introduzido no território brasileiro através de Limeira, Estado de São Paulo, porém sua confirmação e isolamento deram-se somente em 2001, no Rio de Janeiro. Sendo este sorotipo considerado o mais virulento do país (30, 31). Assim, em 2002, foram confirmados cerca de 697 mil casos, refletindo a introdução do DENV-3. Essa epidemia ocasionou uma célebre dispersão deste sorotipo para outros estados, sendo que, em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentavam a circulação simultânea dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus da dengue (32).

Desde os primeiros casos notificados, os adultos jovens eram os mais atingidos pela doença. No entanto, a partir de 2006, alguns estados apresentaram a re-circulação do sorotipo 2, após alguns anos de predomínio do DENV-3. Esse panorama acarretou o aumento no número de casos, de formas graves e de hospitalizações em crianças, sobretudo no Nordeste do país. Desta maneira, no ano de 2008, novas epidemias causadas pelo DENV-2 ocorreram em diversos estados do país, assinalando o mais grave cenário da doença no Brasil em relação ao total

de internações e de óbitos até o momento. Essas epidemias seguiram um padrão de gravidade em crianças, representantes de mais de 50% dos casos de internações nos municípios de maior contingente populacional. Mesmo nos de menor população, mais de 25% dos pacientes internados por dengue eram crianças, demonstrando a exposição de todo o país, de forma semelhante, a essas alterações no perfil da doença (32).

Atualmente, no Brasil, o Ministério da Saúde ainda usa uma classificação de estágios (A-F) com o intuito de orientar médicos nos procedimentos terapêuticos, sendo que recentemente, passou a adotar a nova classificação de casos de dengue da OMS: Dengue, Dengue com Sinais de Alarme e Dengue Grave (33). A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou um total de 572.308 casos de dengue no país de janeiro a novembro de 2014. Na análise comparativa em relação ao ano de 2013, foi observada redução de 60% dos casos, sendo a Região Sudeste com o maior número de casos prováveis (306.890) equivalente a 53,6% em relação ao total do país (Tabela I). Com relação ao sorotipo viral, o DENV-1 foi o que teve maior prevalência entre os casos confirmados, 82% de 3.714 amostras positivas (Tabela II) (34).

Tabela I: Casos notificados de dengue e taxas de incidência por 100 mil habitantes nos municípios com população acima de 100 mil habitantes com maior registro de casos em 2014.

Região/UF	SE 01 a 47		Incidência (/100 mil hab.)	
	2013 ^a	2014 ^b	2013 ^a	2014 ^b
Norte	47.894	43.605	277,5	252,6
Rondônia	8.347	1.809	477,4	103,5
Acre	2.473	24.456	313,0	3.095,3
Amazonas	17.359	6.205	448,1	160,2
Roraima	886	1.076	178,3	216,5
Pará	8.880	4.571	109,6	56,4
Amapá	1.699	1.809	226,3	240,9
Tocantins	8.250	3.679	551,1	245,8
Nordeste	148.984	87.063	265,2	155,0
Maranhão	3.512	2.373	51,3	34,6
Piauí	4.886	7.539	152,9	236,0
Ceará	29.601	22.156	334,7	250,6
Rio Grande do Norte	18.321	10.547	537,5	309,4
Paraíba	13.181	5.325	334,2	135,0
Pernambuco	7.735	10.286	83,4	110,9
Alagoas	10.547	12.715	317,5	382,8
Sergipe	735	2.233	33,1	100,6
Bahia	60.466	13.889	399,7	91,8
Sudeste	914.055	306.890	1.073,9	360,6
Minas Gerais	414.758	58.310	2.000,4	281,2
Espírito Santo	67.173	18.804	1.729,0	484,0
Rio de Janeiro	212.052	7.437	1.288,2	45,2
São Paulo	220.072	222.339	499,8	504,9
Sul	66.389	24.099	228,8	83,1
Paraná	65.591	23.798	591,9	214,8
Santa Catarina	355	134	5,3	2,0
Rio Grande do Sul	443	167	4,0	1,5
Centro-Oeste	261.009	110.651	1.715,0	727,0
Mato Grosso do Sul	78.639	3.437	3.001,9	131,2
Mato Grosso	34.386	6.850	1.066,4	212,4
Goiás	136.211	88.747	2.088,1	1.360,5
Distrito Federal	11.773	11.617	412,7	407,3
Total	1.438.331	572.308	709,2	282,2

Fonte: a. Sinan *online* (atualizado em 10/07/2014), b. Sinan *online* (atualizado em 25/11/2014) - Ministério da Saúde / Brasil - 2014. SE = Semana epidemiológica.

Tabela II: Número de amostras examinadas, percentual de positividade e sorotipos virais de dengue confirmados em 2014, por região e Unidade da Federação.

Região/ UF	Amostras enviadas n	Positivos		Sorotipos confirmados (%)			
		n	%	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
Norte	560	53	9,5	24,5	7,5	2,3	66,0
Rondônia	35	3	8,6	33,3	0,0	0,0	66,7
Acre	3	1	33,3	100,0	0,0	0,0	0,0
Amazonas	97	16	16,5	0,0	0,0	0,0	100,0
Roraima	21	6	28,6	33,3	16,7	16,7	33,3
Pará	324	16	4,9	25,0	18,8	0,0	56,3
Amapá	2	1	50,0	100,0	0,0	0,0	0,0
Tocantins	78	10	12,8	40,0	0,0	0,0	60,0
Nordeste	2.557	383	15,0	30,0	2,9	4,0	63,2
Maranhão	45	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Piauí	351	3	0,9	100,0	0,0	0,0	0,0
Ceará	638	88	13,8	58,0	0,0	4,7	37,5
Rio Grande do Norte	181	65	35,9	18,5	1,5	0,0	80,0
Paraíba	49	25	51,0	16,0	32,0	28,0	24,0
Pernambuco	591	47	8,0	61,7	4,3	8,7	25,5
Alagoas	305	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sergipe	56	17	30,4	58,8	0,0	0,0	41,2
Bahia	341	138	40,5	4,3	0,0	0,0	95,7
Sudeste	5.790	2.101	36,3	90,2	1,9	0,0	7,9
Minas Gerais	1.922	314	16,3	88,2	0,0	0,3	11,5
Espírito Santo	334	46	13,8	52,2	0,0	0,0	47,8
Rio de Janeiro	1.089	81	7,4	65,4	0,0	0,0	34,6
São Paulo	2.445	1.660	67,9	92,9	2,3	0,0	4,8
Sul	950	497	52,3	98,6	0,0	0,0	1,4
Paraná	901	461	51,2	98,9	0,0	0,0	1,1
Santa Catarina	4	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rio Grande do Sul	45	36	80,0	94,4	0,0	0,0	5,6
Centro-Oeste	1.941	680	35,0	77,9	0,1	0,0	21,9
Mato Grosso do Sul	173	77	44,5	27,3	1,3	0,0	71,4
Mato Grosso	59	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Goiás	1.156	536	46,4	82,5	0,0	0,0	17,5
Distrito Federal	553	67	12,1	100,0	0,0	0,0	0,0
Brasil	11.798	3.714	31,5	82,0	1,5	0,5	16,1

Fonte: Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), Instituto Adolfo Lutz-SP (IAL) e Instituto Evandro Chagas-PA (IEC) (consultado em 27/11/2014). Dados sujeitos à alteração.

1.2. O vírus Dengue

1.2.1. A família *Flaviviridae*

A família *Flaviviridae* é composta por pequenos vírus de RNA fita simples e envelopados, constituída de três gêneros: *Hepacivírus*, *Flavivírus* e *Pestivírus*. Seus representantes são considerados patógenos potencialmente fatais, como: o Dengue (DEN), Hepatite C (HCV) e o Vírus da peste suína clássica (CSFV), respectivamente (35). O gênero *Flavivírus* é o maior representante da família, com mais de 70 vírus, majoritariamente causadores de doenças. A superioridade é de Arbovírus, ou seja, vírus transmitidos por artrópodes, como mosquitos e carrapatos. Geralmente, são zoonoses independentes do ser humano para manutenção, excetuando-se o vírus Dengue (DENV). Normalmente, o homem é um hospedeiro acidental não contribuinte para o ciclo de transmissão natural. No entanto, o DENV adaptou-se inteiramente ao ser humano, sendo conservado em grandes áreas urbanas por meio da transmissão pelo vetor e não dependendo de reservatórios animais (36).

Infecções com *Flavivírus*, tais como o DENV, Vírus da febre amarela (YFV) e Vírus da encefalite japonesa (JEV) estão surgindo em todo o mundo (37). As epidemiologias dessas arboviroses estão mudando em resposta às mudanças de fatores sociais, como o comércio crescente, urbanização de áreas rurais e o crescimento populacional. Todos os quatro vírus estão se expandindo geograficamente (38).

1.2.2. Variações genéticas do vírus dengue

Os quatro sorotipos do vírus Dengue são antigenicamente distintos, porém existem evidências de que podem existir subcomplexos sorológicos em cada grupo. Técnicas moleculares permitiram a classificação dos vírus em genótipos. Por sequenciamento, conseguiu-se uma visualização melhor das relações genéticas, permitindo reuni-los em grupos genômicos ou em subgrupos. Os genótipos refletem o acúmulo de mudanças evolucionárias sofridas pelos vírus (39-41).

Na escala evolutiva, o primeiro a diferenciar-se foi o DENV-4 e, sequencialmente, o DENV-2, DENV-3 e DENV-1 (36). Tais estudos, demonstraram que o DENV-1 possui três grupos de genótipos diferentes (42, 43), porém uma pesquisa mais completa reuniu o sorotipo DENV-1 em cinco grupos genotípicos (39). Em um estudo que incluía 40 amostras, isoladas de diversas áreas geográficas e

hospedeiros, o sorotipo DENV-2 foi reunido em cinco grupos genotípicos (39). Já para o DENV-3 foram encontrados quatro grupos de genótipos (44), enquanto que para o DENV-4, dois grupos (45).

Em 2007, uma epidemia de dengue acometeu o estado de Malaysia Sarawak, em Bornéu - Malásia, e o sangue e amostras de soro de um caso grave identificado como "Dengue 4" foram coletados, por meio de uma rede de vigilância instituído pela Dra. Jane Cardoso, virologista da University Malaysia Sarawak. Porém, mais tarde, um pesquisador verificou que as amostras testadas não correspondiam ao DENV-4. Sendo assim, o Dr. Nikos Vasilakis, virologista da Universidade do Texas Medical Branch, em Galveston, EUA, e sua equipe, sequenciaram o genoma e descobriram que o vírus ocupa um novo ramo na árvore genealógica Dengue. Posteriormente, definiram que os anticorpos induzidos em macacos e seres humanos com o vírus da Malásia diferem, de maneira significativa, dos provocados pelas outras quatro estirpes. Sugerindo, portanto, a existência de um quinto sorotipo do Dengue (5).

O avanço da epidemiologia molecular é de enorme relevância, pois tem contribuído para determinar a origem dos vírus que vêm causando novas epidemias, especialmente na tentativa de estabelecer a correlação entre a virulência da amostra e impacto destes na população.

1.2.3. Características estruturais do vírus

O vírus Dengue (DENV) é um representante do grupo B dos Arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae* (FIGURA 5). Na verdade, o termo "Vírus da Dengue" refere-se a um grupo de quatro vírus relacionados geneticamente e antigenicamente conhecidos como sorotipos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (46).

Os vírions DENV são icosaédricos envelopados (47) com diâmetro de aproximadamente 500Å. Possuem genoma de RNA fita simples com senso positivo. O material genético é envolto pela proteína do capsídeo e mais externamente pela membrana bilipídica da célula hospedeira com a inclusão de 180 cópias de duas glicoproteínas virais (48, 49). O genoma de cerca 11 Kb possui uma única fase aberta de leitura (ORF – *Open Reading Frame*) que começa no resíduo metionina e codifica uma poliproteína, a qual é processada co-traducionalmente e pós-traducionalmente por proteinases virais e celulares em proteínas estruturais e não estruturais (50, 51). Esta clivagem gera 3 proteínas estruturais, as quais estão

relacionadas ao vírus maduro, e constituem a partícula viral: capsídeo [C]; membrana [M / transcrita na forma do seu precursor prM] e envelope [E]. Além de 7 proteínas não-estruturais (NS), que são primordiais na replicação viral: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (48, 50, 52) (FIGURA 4).

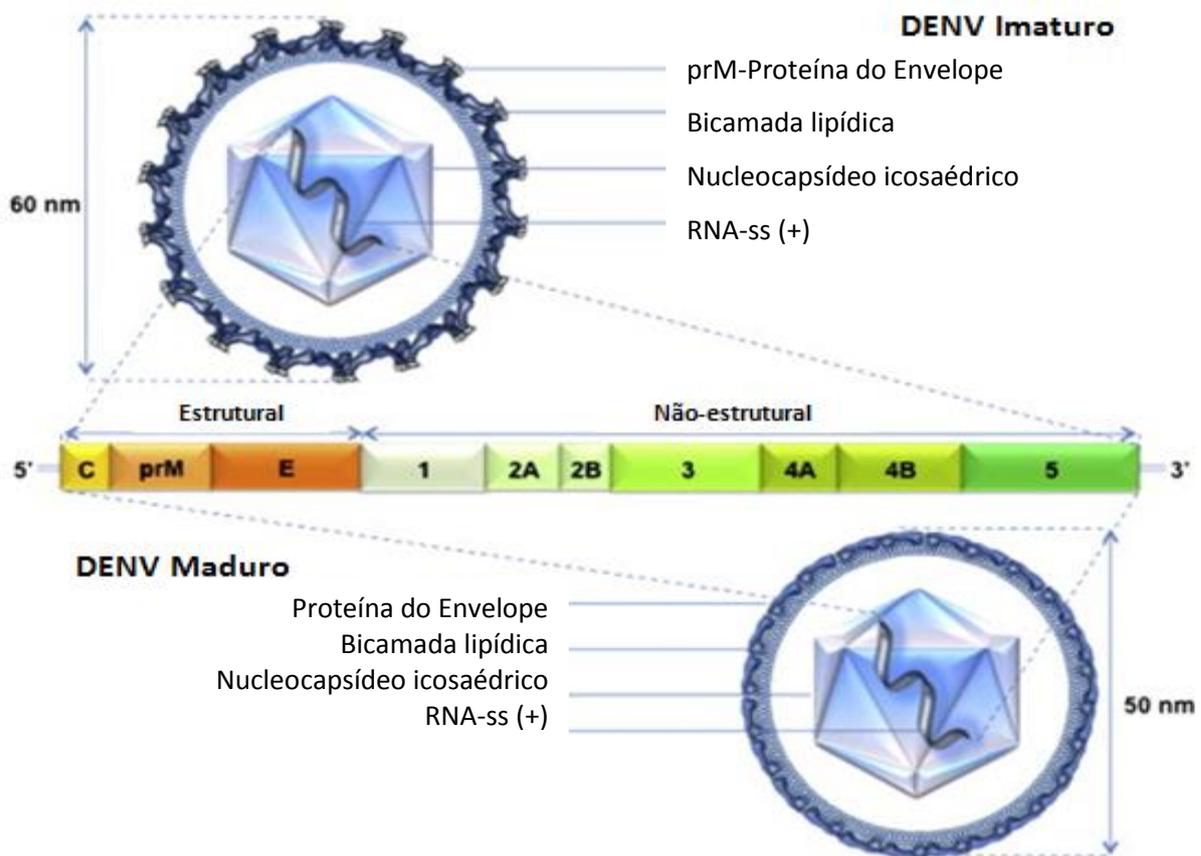


Figura 4: Características estruturais e genômicas do vírus Dengue (DENV). O vírion Dengue possui um RNA de fita simples senso positivo, que está encapsulado no interior do nucleocapsídeo, envolvido por uma bicamada lipídica com glicoproteína incorporada. O RNA genômico é composto por uma única fase abertura de leitura que codifica 10 proteínas virais: 3 estruturais (C, prM e E) e 7 não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As partículas imaturas têm uma concha protetora de glicoproteína ancoradas com prM-Envelope dispostas em saliências icosaédricas. Já o vírus maduro possui uma casca lisa de glicoproteína com dímeros da proteína E, dispostos em um padrão de espinha de peixe. C, capsídeo; E, envelope; prM, pré membrana; NS, não estrutural; ss-RNA, cadeia simples de um único ácido ribonucleico.

Fonte: Adaptada de Herrero, L.J. *et al.*, 2013.

Os três componentes estruturais são necessários para a formação do capsídeo (C) e para a montagem das partículas virais (prM e E). A proteína C (proteína do capsídeo) tem um peso molecular em torno de 13,5 kDa e é o primeiro polipeptídeo sintetizado durante a tradução. Esta proteína possui uma alta frequência de 120 aminoácidos básicos que parecem neutralizar a carga negativa da molécula de RNA viral com a qual está associada. Ela participa da montagem da partícula viral, formando o nucleocapsídeo (50, 53).

Acredita-se que a proteína prM com 75 aminoácidos, antes de ser clivada na maturação viral, auxilia a montagem da proteína E, agindo como *chaperona* (53, 54). Para obtenção de partículas virais maduras, ocorre o processamento proteolítico da proteína prM, em pH 6,0, que sofre uma mudança conformacional reversível. Sugere-se, desta forma, que a porção *pr* da proteína M é mantida na rede trans-Golgi e, com o heterodímero prM-E presente, evita-se a fusão com as membranas das células hospedeiras durante a replicação (55). A proteína de membrana (M), originada pela clivagem da proteína prM, é ligada à membrana e é composta por 75 aminoácidos, os quais possuem 40 resíduos N-terminal (ectodomínio) e os demais 35 estão envolvidos no transdomínio C-terminal. Foi demonstrado que a porção C-terminal da proteína M forma canais que são permeáveis a uma variedade de íons, incluindo sódio, potássio, cloreto e cálcio (56). Também existem evidências de que o ectodomínio possui uma região promotora de apoptose (57).

A proteína E com 495 aminoácidos, apresenta-se como o principal componente da superfície dos vírions de *flavivírus* e está envolvida em variadas funções biológicas, tais como: ligação aos receptores das células-alvo e endocitose do vírus; indução da produção de anticorpos neutralizantes; hemaglutinação de eritrócitos e montagem da partícula viral (54, 58-60). A arquitetura molecular desta glicoproteína é essencial para a infecção viral e qualquer alteração conformacional altera a superfície do vírion por completo (61). Ela é constituída por três domínios: DI, DII e DIII (FIGURA 5). O DI compõe a região central, o DII é o local de dimerização e está envolvido na fusão membranar e o DIII é um domínio de imunoglobulina, provavelmente importante para a ligação do receptor. No hospedeiro, as respostas de anticorpos são direcionadas principalmente, contra a proteína E. Enquanto isso, anticorpos dirigidos contra DI e DII da proteína E são reativos de maneira cruzada entre os sorotipos do Dengue e outros *flavivírus* (62, 63), e os que são voltados contra o DIII são neutralizantes e sorotipo específico (62). Vale ressaltar que a reatividade cruzada de anticorpos não neutralizantes pode

contribuir para quadros hemorrágicos e choque em uma infecção secundária com um sorotipo heterólogo (64).

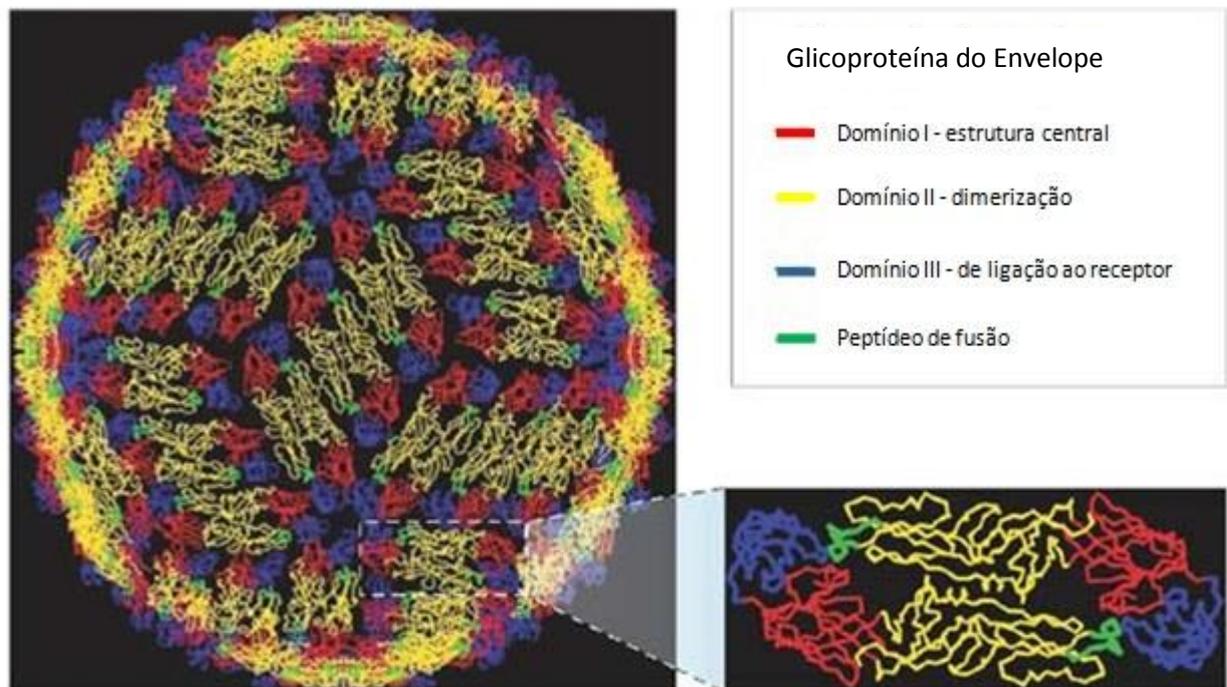


Figura 5: Imagem computadorizada da estrutura tridimensional do vírus Dengue. Representados em amarelo, vermelho e azul, os domínios da proteína E do envelope viral, com áreas de fusão em verde, formando assim, uma concha protetora que recobre toda a partícula. Observação de estrutura viral diferenciada com superfície incomumente lisa (65).

Fonte: Adaptada de Stephen S. Whitehead. *et al.*, 2007.

As proteínas não estruturais (NS) possuem uma protease de serina e uma helicase dependente de ATP (NS3), que é necessária para o processamento da poliproteína do vírus; uma metiltransferase e RNA-polimerase dependente de RNA (NS5); e, um co-fator para a protease NS3 (NS2B). A NS4B tem sido implicada no bloqueio da resposta de interferon (IFN). A NS1, NS2A e NS4A possuem funções desconhecidas ou incompletamente compreendidas. Todas as proteínas NS parecem ser necessárias para uma replicação eficiente (48).

As sequências nucleotídicas das proteínas NS têm sido estudadas detalhadamente, uma vez que variações nas sequências de NS1 e NS3 podem estar associadas ao aumento de virulência de alguns genótipos (66). Ademais, anticorpos contra proteínas NS são mais comumente encontrados em casos secundários de

infecção de dengue, o que pode estar relacionado com a complicação da doença em uma segunda infecção (67).

Das proteínas não estruturais, a melhor caracterizada é a NS3 (70 kDa). Ela tem sido implicada na interação com a proteína de ligação do receptor nuclear humano, que modula o tráfego intracelular entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (68). A proteína NS3 é multifuncional e apresenta funções de quimiotripsina, serina/protease, bem como de helicase e RTPase/NTPase (69). Sua atividade protease é altamente dependente da presença do seu co-fator, NS2B, que é conservado entre os *flavivírus* (70). A proteína NS5 é mais conservada entre os sorotipos Dengue (67% de identidade na sequência), sendo bifuncional: um domínio metiltransferase na sua extremidade N-terminal e uma polimerase dependente de RNA na extremidade C-terminal (71). Ambas as proteínas estariam envolvidas na replicação viral e na resposta imune de linfócitos T (58, 59).

A proteína NS1 é encontrada nas membranas das células infectadas e, também, na forma solúvel presente no plasma de pacientes infectados, refletindo seu envolvimento na replicação viral (72). Além disso, a NS1 tem a capacidade de ativar, *in vitro*, proteínas do sistema complemento e esta atividade é aumentada pela presença do anticorpo DENV-específico (73). O desempenho da NS1 como atividade fixadora do complemento no extravasamento plasmático vem sendo questionado devido às discordâncias entre o pico dos níveis de NS1, que ocorrem durante a fase febril e o período do extravasamento plasmático, mais tardiamente. Sendo assim, os níveis do antígeno NS1 em amostras biológicas podem ser usados como um indicador precoce da forma grave da doença (74). Acredita-se que tal proteína ainda tenha importância na patogênese da doença, pois anticorpos anti-NS1 estão envolvidos na destruição pelo sistema complemento de células infectadas, podendo, portanto, ser um importante mecanismo antiviral a ser estudado (67). Porém, sua exata função ainda não foi totalmente elucidada, embora existam diversas tentativas na utilização desta proteína como um alvo para abordagens preventivas, terapêuticas e de diagnóstico (75, 76).

1.2.4. Morfogênese viral

Assim como ocorre com outros vírus envelopados, o Dengue entra na célula hospedeira por endocitose mediada por receptores e reorganiza as membranas

internas das células para assim, estabelecer locais específicos de replicação (77). Como receptores primários para o vírus foram propostas as moléculas DC-SIGN (do inglês *Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule 3 – Grabbing Non-Integrin*), GRP78/BiP (Proteína reguladora de glicose 78) e moléculas associadas ao CD14 (78-80). Contudo, tem havido avanços significativos na compreensão das interações de DENV com células-alvo, tais como células dendríticas (DCs), macrófagos, células endoteliais vasculares (VEC) e hepatócitos, bem como na identificação dos seus respectivos receptores (81) (Tabela III).

Tabela III: Receptores do vírus Dengue em diferentes tipos celulares.

Tipo celular	Receptores
DC	DC-SIGN/L-SIGN
Monócito/Macrógafo	DC-SIGN, MR, CRD4-7-Fc, CLEC5A, HSP90/HSP70, proteína associada-CD14 e Fc γ R
VEC	Heparan sulfato, HSPGs e integrina β 3
Hepatócito	Heparan sulfato, laminina de alta-afinidade 37/67-kDa, proteína prion, GRP78 e L-SIGN
C6/36	HSP90/HSP70, proteínas de membrana 40/45kDa, 50, 67, 80 e proteínas 100kDa e proteína-like-tubulina

Fonte: Adaptada de Fang, S. *et al*, 2013.

O ambiente acidofílico do endossomo é responsável por desencadear uma mudança conformacional irreversível nas glicoproteínas de fusão, resultando na fusão das membranas viral e celular (49, 82). Neste caso, a transformação ocorre na glicoproteína do envelope [E] que é a responsável tanto pela ligação ao receptor quanto pelo processo de fusão com a membrana celular do endossomo e liberação dos componentes virais no citoplasma celular. Desta maneira, a correta organização do envelope viral é essencial durante as fases de adsorção e penetração (83).

Para a produção de proteínas virais no retículo endoplasmático (RE) ocorre a tradução do RNA viral e, conseqüentemente, síntese de vírions imaturos. A clivagem de prM, pela enzima furino-protease da célula hospedeira, conduz à formação de partículas maduras, que são secretadas a partir da célula, por exocitose. Adicionalmente, a proteína não estrutural 1 (NS1) é expressa na membrana plasmática celular ou segregada, e alguns vírus são segregados numa forma imatura (46) (FIGURA 6).

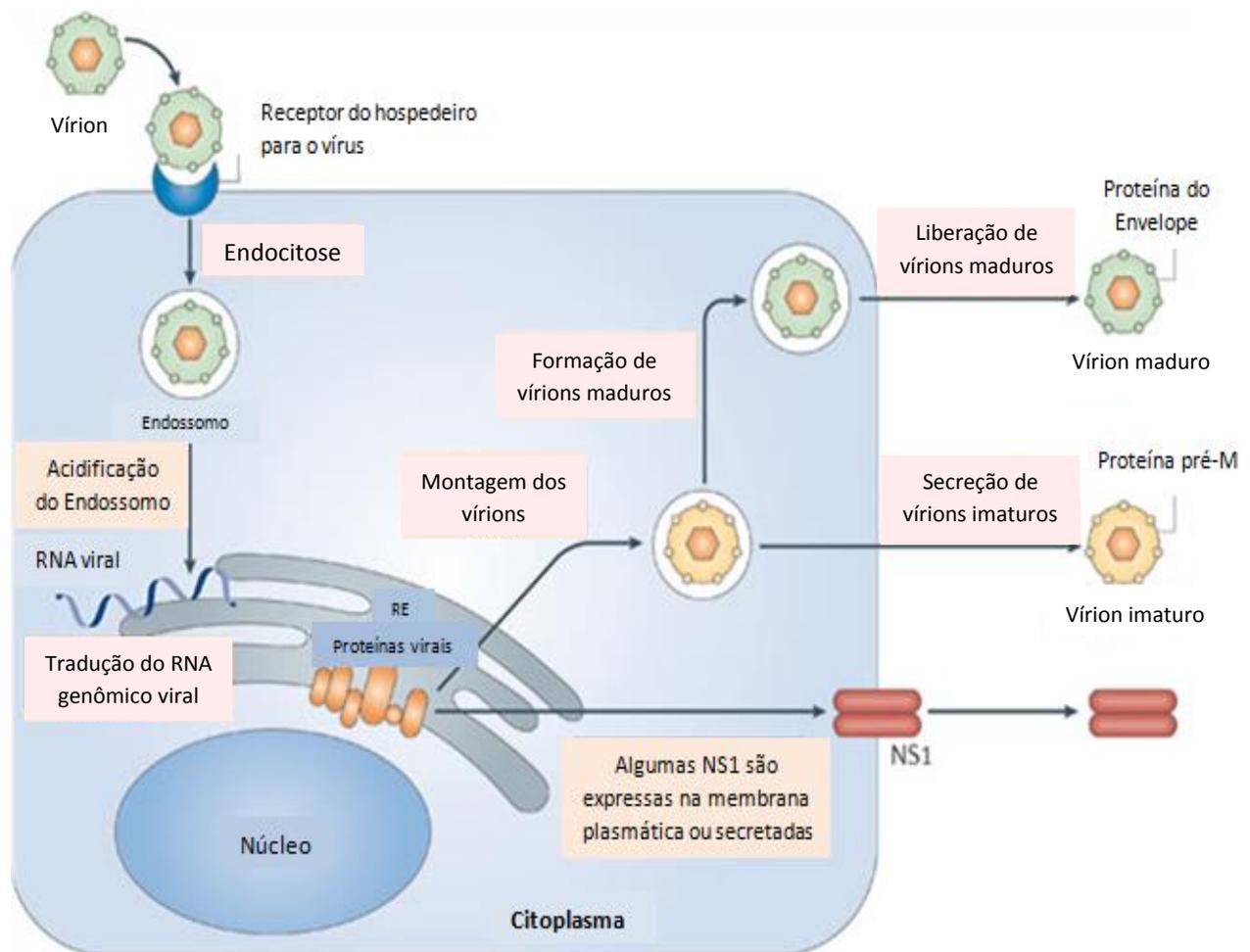


Figura 6: Ciclo de replicação do vírus Dengue. Após interação com o receptor da célula-alvo, ocorre a endocitose da partícula viral e, com a diminuição do pH dentro do endossomo, o material genético do vírus é liberado. Este, é traduzido e dá-se a síntese de partículas virais maduras e imaturas que são secretadas por exocitose. Além disso, NS1 é expressa na membrana ou secretada.

Fonte: Adaptada de Rothman, A.L., 2011.

A clivagem de prM em M é fundamental para a infectividade do vírus, uma vez que partículas imaturas são incapazes de promover a fusão do vírus com as membranas celulares, inclusive com a do endossomo. Todavia, a maturação da partícula a torna mais lábil e menos resistente, sendo a partícula imatura inerte mais estável (83).

1.2.5. Ciclo de transmissão

Os vírus da Dengue são totalmente adaptados aos seres humanos e não precisam mais do ciclo silvestre de sobrevivência, já que seu principal vetor *Aedes aegypti* é um mosquito urbano altamente domesticado (17, 84). As larvas do vetor são encontradas principalmente em água estagnada contida em recipientes plásticos, pneus, vasos de plantas, latas, cisternas, bromélias, buracos em árvores e troncos de palmeiras. O mosquito é mais ativo durante o dia, com picos de atividade entre 2 e 3 horas após o amanhecer e algumas horas antes do anoitecer. As fêmeas desse inseto são as responsáveis pela transmissão e dispersão de vários sorotipos e um único mosquito, se infectado, pode infectar várias pessoas (17),(85).

No vetor, o ciclo inicia-se quando o mesmo pica um indivíduo virêmico e, o DENV penetra na fêmea adulta. A primeira replicação viral ocorre no intestino delgado do mosquito infectado, alcançando sua hemocele e hemolinfa, conseguindo acesso aos tecidos do inseto. A chegada do vírus às glândulas salivares do mosquito ocorre após um período de incubação de 7 a 11 dias, onde acontece uma segunda replicação, determinando o início da transmissão viral pelo vetor, que passa a transmiti-lo por toda a vida (86); (87). Outra possibilidade é que ocorra a infecção pelo DENV no aparelho genital do inseto, permitindo a propagação do patógeno via trans-ovariana. Este tipo de transmissão pode ser responsável pela manutenção dos vírus em dada região durante períodos inter-epidêmicos, sem a participação humana ou de outros reservatórios (87).

1.2.6. Células alvo e replicação viral

Após serem inoculados através da picada do mosquito, provavelmente no espaço subcutâneo ou no espaço intradérmico, os vírus Dengue fazem as replicações iniciais em células retículo-endoteliais, células de *Langerhans* e fibroblastos, bem como em linfonodos locais (88-91). Demonstrou-se que as células dendríticas intersticiais da derme, localizadas no epitélio, seriam os primeiros alvos potenciais *in vivo* da infecção (91). Seguindo tal multiplicação, a viremia se inicia, disseminando-se por todo o organismo. Os vírus podem circular livres, no plasma ou no interior de monócitos/macrófagos (88). Sabe-se que os vírus Dengue têm tropismo por essas células fagocíticas, as quais são os maiores sítios de replicação viral (92, 93).

Os primeiros estudos *in vitro* demonstraram que entre as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), os monócitos eram a população mais permissível à infecção pelo DENV (94). Estudos similares com PBMCs obtidos de pacientes com dengue demonstraram que o vírus foi detectado mais frequentemente, e com títulos elevados, nas células aderentes comparadas às não-aderentes (95), indicando o monócito como célula-alvo da infecção. A equipe do nosso laboratório demonstrou pela técnica de citometria de fluxo (FACS) que os monócitos circulantes de pacientes na fase aguda da doença eram as células mais frequentemente infectadas pelo DENV (96). Outros estudos *in vitro* demonstraram que células da linhagem monocítica, como monócitos e células dendríticas imaturas (91), são as mais hábeis em desenvolver a replicação viral, porém os antígenos virais podem também, ser encontrados em células hepáticas, células de Kupffer, macrófagos alveolares, órgãos linfoides e linfócitos B (97-103), inclusive em tecidos de casos fatais de órgãos como fígado, cérebro, baço, pulmões e coração (102, 104-106).

1.2.7. Manifestações clínicas

A dengue tem um amplo espectro de manifestações clínicas, muitas vezes com sintomas, evolução e desfecho imprevisíveis. Enquanto a maioria dos pacientes se recupera após um curso clínico auto-limitado não grave, uma pequena proporção tem progresso para a doença grave, principalmente caracterizada por extravasamento de plasma com ou sem hemorragia, podendo evoluir para o choque (107).

No século passado, as infecções sintomáticas do vírus Dengue foram agrupadas em três categorias: Febre indiferenciada, Febre da dengue (DF) e Dengue hemorrágica (FHD). A FHD foi classificada em quatro graus de gravidade, sendo os graus III e IV definidos como Síndrome do choque da dengue (SCD). Dificuldades na aplicação dos critérios de FHD na situação clínica, juntamente com o aumento de casos de dengue clinicamente graves que não se incluíam nos rigorosos critérios de FHD, levou ao pedido de reclassificação da doença. Atualmente, a classificação em DF / FHD / SCD continua a ser amplamente usada (3). Entretanto, a partir de 2009, a OMS passou a classificá-la binariamente como *Dengue* e *Dengue Grave*, analisando os sinais de alerta, a fim de classificar o nível de gravidade (3) (FIGURA 7).



Figura 7: Nova classificação da Dengue de acordo com a OMS, 2009.

Fonte: Adaptado de OMS, 2009.

1.2.7.1. Dengue

Usualmente, a dengue é uma doença não fatal, auto-limitada, que pode ocorrer tanto em infecções primárias quanto secundárias, afetando adultos e crianças (87). Os pacientes costumam desenvolver febre alta de maneira súbita. Esta fase febril aguda dura cerca de 2-7 dias e é muitas vezes acompanhada de rubor facial, eritema cutâneo, dor generalizada pelo corpo, mialgia, artralgia e dor de cabeça (108). Alguns pacientes podem, ainda, apresentar hiperemia conjuntival. Anorexia, náuseas e vômitos, são comuns. Pode ser difícil distinguir, clinicamente, a dengue de outras doenças febris nesta fase inicial. Além disso, estas características clínicas iniciais são indistinguíveis entre os casos graves e não-graves de dengue. A prova do laço positiva (petéquias) e leucopenia nesta etapa aumenta a probabilidade de diagnóstico (109-111). Portanto, o monitoramento dos sinais de alerta e outros parâmetros clínicos é crucial para reconhecer a progressão para a fase crítica (3).

Dentre os sinais de alerta, a dor abdominal é um fator de risco significativo tanto para crianças quanto para adultos, da mesma forma que o sangramento em mucosas e plaquetas menor que 10mil/mm³. Outros sinais em adultos são a

sonolência, podendo ser alertada com irritabilidade, hipoalbumemia, hematócrito elevado, significativa comorbidade, além de vômitos frequentes e acúmulo clínico de líquidos (111).

Próximo ao período de defervescência, quando a temperatura decai para 38°-37.5°C ou menos e permanece abaixo deste nível, em torno dos dias 3-7 da doença, o aumento da permeabilidade capilar em paralelo com o aumento de hematócrito pode ocorrer (112), marcando assim o início da fase crítica. Ainda, um período de extravasamento de plasma clinicamente significativo, que dura 24-48 horas. Uma leucopenia progressiva (109) seguida por um rápido decréscimo na contagem de plaquetas, em geral precede o extravasamento. Pacientes que chegam nesta fase, porém sem aumento na permeabilidade capilar, costumam melhorar, enquanto que aqueles com o aumento progressivo da mesma pioram à medida que ocorre perda do volume plasmático (3). Aqueles que se deterioram irão manifestar sinais de alerta, sendo classificados, portanto, dentro de dengue com sinais de alerta. Nestes casos, a recuperação pode acontecer com reidratação intravenosa precoce. Porém, alguns casos podem evoluir para Dengue grave (3).

1.2.7.2. Dengue Grave

Pacientes que se curam, apresentam uma diminuição da febre com quadros de sudorese e fraqueza transitórios. No entanto, esses quadros podem representar indícios do agravamento da doença e a defervescência anuncia o início da fase crítica, como descrito anteriormente (111). Desta forma, a febre diminui, porém a dor abdominal é mantida e apresenta-se intensa. São constatados derrame pleural ou ascite, além de vômitos persistentes e hepatomegalia, caracterizando a fase crítica e o ponto de maior incidência da instalação do choque (111). Resistindo à fase crítica, no paciente ocorre uma reabsorção gradual do fluido do compartimento extravascular nas seguintes 48-72 horas. Além da melhora do bem-estar geral, retorno do apetite, os sintomas gastrointestinais diminuem, o estado hemodinâmico é estabilizado e a diurese segue (3).

Todavia, a evolução da fase crítica da dengue grave é definida por um ou mais dos seguintes procedimentos: (i) perda de plasma que pode levar ao choque hipovolêmico, com ou sem dificuldade respiratória, devido ao acúmulo de líquido nos pulmões e / ou (ii) sangramento grave e / ou (iii) acometimento severo de órgãos (3). Com a progressão da permeabilidade vascular, a hipovolemia piora e resulta em

choque. Durante a fase inicial do choque, o mecanismo compensatório que mantém uma pressão sanguínea sistólica normal também produz taquicardia e vasoconstrição periférica com perfusão da pele reduzida, tornando as extremidades frias. Pacientes em choque muitas vezes permanecem conscientes e lúcidos. Porém, pode ocorrer uma descompensação e as pressões desaparecem abruptamente. O choque hipotensivo prolongado e hipóxia podem levar a falência de múltiplos órgãos e um curso clínico de difícil reversão (3).

Vale a ressalva que não existe um tratamento específico para a dengue. Este, é baseado principalmente, em hidratação adequada. Leva-se em consideração o estadiamento da doença, segundo os sinais e sintomas apresentados pelo paciente, para decidir condutas, bem como o reconhecimento precoce dos sinais de alarme. Uma vez que é extremamente importante reconhecer precocemente os sinais de extravasamento plasmático para correção rápida com infusão de fluidos (113).

1.2.8. Patogênese da dengue

Embora todos os sorotipos possam estimular a formação de anticorpos específicos, a imunidade induzida por um sorotipo é apenas parcialmente protetora contra outros sorotipos (imunidade heteróloga ou cruzada) e desaparece após um determinado tempo. Por outro lado, a imunidade conferida pela infecção do vírus (homóloga) é permanente para o sorotipo que causou a infecção (111). Sendo assim, existem dois padrões de respostas à infecção pelo vírus do dengue: primária e secundária.

A resposta primária acontece em indivíduos que não são imunes aos *flavivírus*, pois ainda não haviam sido infectados ou inoculados com vacinas. Neste tipo de infecção, os anticorpos são monoespecíficos (mais reativos contra o sorotipo infectante que contra os outros). A resposta secundária é observada em pessoas com infecção por dengue que já tiveram infecção prévia por *flavivírus*. Pode apresentar-se como resultado à imunidade a algum sorotipo diferente do vírus dengue, que é o mais frequente, ou por vacinação prévia contra outros do gênero (25).

As manifestações clínicas das infecções por DENV envolvem uma interação muito complexa entre o vírus e o hospedeiro. Associado ao fato de não haver modelos animais que reproduzam as particularidades fisio e imunopatológicas da

doença, e ao elevado grau de variações dessas manifestações causadas pelo microrganismo, foram formuladas teorias que propuseram uma explicação para as diferentes reações ao DENV, sobretudo às graves.

1.2.8.1. Teoria da facilitação dependente de anticorpos

A Teoria da facilitação dependente de anticorpos também é conhecida como Teoria de Halstead ou da Infecção Sequencial ou dos Anticorpos Potencializadores da Infecção. Para sua formulação, Halstead e colaboradores basearam-se em dados epidemiológicos para sugerir o papel dos anticorpos não-neutralizantes, produzidos na infecção pelo DENV, na patogênese da doença (97). Ela associa a ocorrência das formas graves a duas infecções sequenciais, por diferentes sorotipos, após ter transcorrido um tempo mínimo entre elas de aproximadamente, três anos, quando então a resposta imunológica do indivíduo sensibilizado seria amplificada pela segunda infecção, em função da existência prévia de anticorpo heterólogo (*Antibody dependent enhancement - ADE*). Mais especificamente, esses anticorpos desenvolvidos na infecção pelo primeiro sorotipo estariam em níveis subneutralizantes durante a segunda infecção por diferente sorotipo e se ligariam ao vírus. Esse complexo formado, Antígeno-Anticorpo, seria atraído por meio da ligação da porção Fc da imunoglobulina com o FcR γ de monócitos e aproximaria o vírus do seu receptor, resultando no aumento da infecção dessas células (114).

No entanto, essa teoria foi contestada por alguns trabalhos nos quais, em ensaios *in vitro*, não foi observado ADE quando plasma de indivíduos com infecção primária ficou em contato com outros sorotipos dos vírus DEN (115). A equipe mostra que não há associação da presença de anticorpos de ADE no período pré-infecção à carga viral durante a infecção secundária e a clínica do paciente. Ainda, foi demonstrado que as células dendríticas, altamente permissivas ao DENV, também não apresentam este fenômeno da facilitação *in vitro* (91, 100).

1.2.8.2. Teoria da virulência viral

A Teoria da virulência viral, defendida por Rosen (116, 117), relaciona as formas graves à uma maior virulência de determinadas cepas dos vírus. Estudos filogenéticos e epidemiológicos demonstram que genótipos específicos são capazes de produzir maior incidência da doença grave.

Foi descrito que cepas DENV-2 do Sudeste Asiático, causam dengue grave enquanto o genótipo Americano não (66). Em estudo de vigilância das características clínicas e sorológicas de casos de dengue no Peru, que tiveram como agente etiológico o genótipo americano do DENV-2, concluiu-se que possivelmente esta cepa não detém as propriedades necessárias para causar formas severas da doença, o que, em parte, reforça o pensamento de Rosen (118). No Brasil, a partir de 2006 observou-se a introdução de uma nova cepa de DENV-2 que coincidiu com o aparecimento de casos graves em crianças (119). Estudos epidemiológicos e sorológicos realizados em Cuba e na Tailândia são bons exemplos da importância da infecção secundária como fator de risco para FHD (120). Desde as primeiras observações feitas por Halstead em 1970, a FHD tem estado presente em situações onde há circulação de mais de um sorotipo do vírus (120-122). De forma geral, genótipos asiáticos seriam mais virulentos que os encontrados nas Américas e no Pacífico Sul (123). Ademais, estudos em animais têm fornecido mais evidências que correlacionam a sequência viral e com a virulência (124, 125). Cologna e colaboradores propuseram que os vírus com potencial de causar a forma grave da doença tem vantagem seletiva sobre as formas menos virulentas, devido à dificuldade do isolamento dos vírus americanos após a entrada das cepas asiáticas nas Américas (126).

1.2.8.3. Teoria do pecado antigênico original

Em 2003, um novo conceito foi postulado para tentar explicar como as células T DENV específicas poderiam participar na gravidade de infecções secundárias. Esta teoria, defende que durante a infecção primária, ocorre a expansão clonal da população de células T com maior afinidade pelos epítomos presentes no sorotipo infectante, acarretando a formação de células de memória para este sorotipo. No entanto, em uma infecção secundária, células de memória formadas durante a primeira infecção seriam ativadas e iriam se expandir mais rapidamente que as células T *naive* específicas para o novo sorotipo infectante. Assim, os clones de células T de memória, por não terem alta afinidade pelos antígenos virais da infecção secundária, teriam menor eficiência na eliminação viral. Porém, eles possuiriam alta capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias, influenciando na imunopatologia da doença (127).

Sendo assim, pesquisas com crianças do Sudeste Asiático que apresentavam infecção aguda por DENV mostraram novas evidências que apoiam essa teoria. Neste levantamento, células T citotóxicas específicas para o DENV de reatividade cruzada, apresentaram níveis abaixo do normal de degranulação. Entretanto, essas células produziram altos níveis de citocinas que podem contribuir para o extravasamento do plasma, característico da forma hemorrágica da doença (128). Outros estudos recentes também corroboram tal teoria (129).

1.2.8.4. Teoria do mimetismo molecular

A Teoria do mimetismo molecular se baseia na comparação entre o gene da proteína E e de proteínas da coagulação humana que revelaram trechos com homologia entre eles (130). Sendo assim, anticorpos de reatividade cruzada estariam influenciando nas cascatas de coagulação e a presença dessas moléculas foi correlacionada com manifestações hemorrágicas da doença (131). Foi demonstrado ainda, que anticorpos contra a proteína viral não-estrutural NS1, podem reagir com antígenos presentes na superfície de células endoteliais e induzir o processo de apoptose, acarretando dano ao endotélio (132).

1.2.8.5. Teoria do polimorfismo genético

Propõe-se que características genéticas dos pacientes tenham importância no curso da doença. Realmente, foram identificados polimorfismos em determinados genes considerados responsáveis por manifestações diferentes da dengue, inclusive com a gravidade da doença (133-136). Mais recentemente, observou-se que os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) podem participar da infecção ocasionando aumento da internalização viral ou estimulando a produção de citocinas. Entre eles, o Ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de célula dendrítica (DC-SIGN) e o Membro da superfamília lectina 5 tipo-C (CLEC5A) (79, 137, 138).

Em parceria com o nosso laboratório, Xavier-Carvalho e colaboradores, apontaram polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) de CLEC5A e DC-SIGN relacionados à proteção e à gravidade da doença em estudos de caso controle, funcionais e meta-análise em crianças acometidas pelo Dengue, na epidemia de 2008, Rio de Janeiro (139). Ademais, foi constatada maior resistência à infecção

pela raça negra e maior sensibilidade na população asiática em relação à americana (22, 140). Na África, onde ocorre a co-circulação dos quatro sorotipos e frequentes epidemias de FD, são observados raros casos de FHD (140). Adicionalmente, um alelo do promotor da molécula DC-SIGN está associado à ocorrência de FD e FHD em grupos étnicos tailandeses (141).

1.2.8.6. Teoria da interação multifatorial

A Teoria da interação multifatorial defende que as outras teorias não explicam de forma isolada os eventos epidemiológicos que vêm ocorrendo no mundo e propõe uma teoria integral de multicausalidade, segundo a qual se aliam vários fatores de risco: (i) individuais - idade, sexo, raça, estado nutricional, pré-existência de enfermidades crônicas, presença de anticorpos, intensidade da resposta imunológica a infecções anteriores (ii) virais: virulência da cepa circulante, sorotipo(s) viral(is) envolvido(s) em cada evento epidemiológico; e (iii) epidemiológicos - imunidade de grupo, competência vetorial, densidade vetorial, intervalo de tempo entre as infecções por diferentes sorotipos e intensidade da circulação viral (13, 142, 143). Esta teoria, trata-se portanto, de uma tentativa de explicação mais totalizadora, ao reconhecer que o resultado das apresentações epidemiológicas e clínicas no indivíduo e nas populações depende de todos os elos e fatores interligados, aproximando e considerando a complexidade dos fenômenos envolvidos na determinação destas infecções (87, 144).

1.3. Os papéis de mediadores e processos biológicos na resposta imunológica da dengue

O reconhecimento pelo sistema imune de moléculas virais leva à ativação de fatores regulatórios, como a cascata de sinalização para produção do conjunto IFN, além da secreção de citocinas pró-inflamatórias (145). Diversas evidências mostram o papel da ativação imunológica durante o curso da dengue e foram descritas na literatura. Por exemplo, níveis aumentados citocinas e quimiocinas inflamatórias: fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, IL-8/CXCL-8, IP-10/CXCL-10, e IFN- γ foram relatados em pacientes com dengue grave (46, 90, 146). Marcadores solúveis de ativação, como sIL-2R, sCD4, sCD8 são encontrados em níveis mais elevados em pacientes com Dengue

Hemorrágico (DHF) (147). Muitos desses mediadores já têm sido associados à gravidade da doença, incluindo disfunção hepática, hipotensão, trombocitopenia, hemorragia e choque (46). Fatores anti-inflamatórios também se encontram elevados nos estágios mais tardios da doença (na fase de defervescência). Entre eles, estão associados à gravidade: IL-1Ra (receptor) (148), TGF β -1 (149, 150), e IL-10 (151, 152), também presentes em pacientes brasileiros estudados por nosso grupo. A IL-10 foi detectada com maior frequência em pacientes com plaquetopenia, uma das características cruciais no estabelecimento da gravidade da dengue (153).

O TNF- α pode inibir a replicação viral tanto interferindo na síntese do vírus como induzindo apoptose nas células infectadas, e atuando em conjunto com IFN- γ para eliminação do HBV em hepatócitos infectados (154). Estudos realizados *in vitro* demonstraram que a replicação do DENV em monócitos humanos não é afetada pela adição de altos níveis de TNF- α , sugerindo que a replicação do DENV ocorra num estágio de não responsividade celular ao TNF- α (155). Por outro lado, o TNF- α , a IL-1 e a IL-6 desempenham papéis importantes no desenvolvimento dos choques endotóxicos durante infecções bacterianas (156) e estão envolvidos em sintomas semelhantes aos apresentados durante FHD/SCD, tais como hemoconcentração e choque hipovolêmico. Em pacientes brasileiros, tem sido detectada a elevação do TNF- α sérico, que pode estar associada com a gravidade da doença (157); (158).

Demonstrou-se que a IL-8 pode subverter a defesa imunitária inata, inibindo os efeitos antivirais do IFN- α , potencializando assim, a disseminação viral de poliovírus (159). Ademais, de acordo com Talavera e colaboradores, essa interleucina aumenta diretamente a permeabilidade sobre a monocamada da linhagem de células endoteliais da microvasculatura dermal humana (HMEC-1) infectada com DENV-2 (160). Outro estudo, que comparou a resposta celular à infecção pelo Dengue em diferentes tipos de células, demonstrou a diversidade de mecanismos pelos quais a infecção induz a secreção de IL-8 (161). Adicionalmente, altos níveis de IL-8 em pacientes graves sugerem que esta quimiocina, assim como a MIP-1 α e a molécula de adesão solúvel sVCAM-1, estejam envolvidos na migração de células circulantes infectadas e na permeabilidade endotelial (160, 162, 163). Ainda, estudos recentes, demonstram que há expressão do receptor de IL-8, CXCR1, em células T CD8 de memória. Esses resultados sugerem o papel da IL-8 no extravasamento plasmático, característico de DHF (164).

A interleucina-6 é uma citocina multifuncional que desempenha um papel central na defesa do hospedeiro, devido à sua gama de atividades nos sistemas

imunológico e hematopoiético, além da sua capacidade de induzir resposta de fase aguda (165). A IL-6 pode aumentar a permeabilidade endotelial e amplificar o recrutamento de leucócitos em reações inflamatórias locais, juntamente com a IL-8 (166). Estudos clínicos relacionam altos níveis desta molécula nos soros de pacientes graves e em casos fatais (165, 167)

O MIF (Fator Inibidor da Migração ou Fator Inibidor da Migração de Macrófagos) é um mediador inflamatório que foi originalmente descrito como uma proteína de linfócito T que inibiu a migração aleatória de macrófagos. Porém, posteriormente, verificou-se que trata-se de uma molécula produzida e liberada por diversas células de muitos tecidos em resposta a uma variedade de estímulos (168). Uma vez secretado, estimula a produção de óxido nítrico (NO) e TNF- α . Níveis séricos de MIF, assim como de IL-6 e IL-10, foram significativamente aumentados em pacientes adultos de dengue, os quais foram correlacionados com a gravidade da doença e morte em pacientes adultos de DHF (169). Assim, se por um lado citocinas e quimiocinas produzidas na fase inicial da infecção atuam nas células imunológicas ativando-as e mobilizando-as para o controle da infecção (170),(171), por outro lado, a produção desregulada dessas mesmas proteínas solúveis potencializaria a patofisiologia da doença (46, 172).

O óxido nítrico (NO) é um fator produzido por diversas células, tais como macrófagos, células endoteliais vasculares e células de Kupffer (173). Apresenta uma variedade funcional, onde possui atividade antiviral durante a infecção pelo DENV, com ação protetora e regulatória das células. No entanto, NO em concentrações elevadas, apresenta efeitos tóxicos para estas (174).

A apoptose é um processo fisiológico natural de morte celular programada, que ocorre no desenvolvimento embrionário bem como na manutenção da homeostase dos tecidos. Esse mecanismo é bem caracterizado morfológicamente, incluindo a perda da assimetria da membrana plasmática, condensação do citoplasma e do núcleo, além da clivagem do DNA internucleossomal. No entanto, este caminho complexo pode ser desencadeado por muitas infecções virais entre elas, a dengue. Torrentes-Carvalho, 2009, da nossa equipe, verificou que a fosfatidilserina, um marcador precoce de apoptose, foi aumentada na superfície de monócitos humanos infectados por DENV-2 (175). Porém, os mecanismos de indução da apoptose em células-alvo infectadas com o vírus Dengue ainda não estão definidos.

1.4. Células hepáticas na dengue

O fígado é composto principalmente por hepatócitos (80%), incluindo outros tipos celulares como as células de *Kupffer*, endoteliais, estreladas e biliares. Estas últimas podem ser infectadas pelo vírus Dengue, embora suas infecções não sejam produtivas e acarretem morte celular. Sendo os hepatócitos mais permissivos à infecção pelos sorotipos (176). Tal elucidação deve-se às evidências em processos clínicos e experimentais do envolvimento do fígado na infecção pelo DENV. Em certos casos da infecção confirmada, foram observados quadros de hepatomegalia e aumento nos níveis séricos de enzimas hepáticas presentes no soro de pacientes infectados (177). Em um estudo atual de casos fatais, além dos cenários apontados anteriormente, detectaram-se: alto grau de esteatose e alterações nos hepatócitos, como degeneração nuclear e aumento mitocondrial, sugerindo processo apoptótico (106). Avaliando-se a imunohistoquímica das populações celulares de linfócitos TCD4 e TCD8 em lesões hepáticas de casos de FHD, foi constatado aumento de ambas as populações de células T tanto na área portal quanto na zona 2 da área acinar, onde a predominância normalmente, é de TCD4. Neste locais, a expressão de IFN- γ predominou sobre IL-4 e IL-10, caracterizando uma predominância de um perfil de citocinas Th1 (inflamatórias) (178).

Respostas imunológicas desreguladas do hospedeiro desempenham um papel crucial na ocorrência de lesões no fígado. Sendo assim, a modulação destas respostas pode representar um potencial terapêutico (179).

1.4.1. Células de Hepatocarcinoma Humano (Huh-7)

A linhagem Huh-7 foi estabelecida por Nakabayshi e colaboradores, em 1982, a partir do tumor hepático de um paciente masculino japonês de 57 anos (180). Desde então, passou a ser utilizada em variadas pesquisas (181-186). As células hepáticas, como as Huh-7 (células de hepatocarcinoma humano), são consideradas por diversos estudos como sítios de replicação para o vírus Dengue (176, 179, 187, 188). A utilização desta linhagem objetiva não só mimetizar o ambiente hepático de pacientes quando infectados, mas também investigar as interações que ocorram entre o vírus e a célula do hospedeiro. Por exemplo, a entrada do DENV por endocitose mediada por clatrina (189) ou, ainda, o seu uso para triagem de substâncias com propriedades antivirais (190).

O uso de um isolado purificado de hepatócitos primários, demonstrou que essas células são capazes de serem infectadas *in vitro* pelo DENV-2, e que tal infecção resulta em uma significativa resposta de citocinas (176). Da mesma maneira, as células Huh-7, podem secretar fatores inflamatórios como o MIF, responsável pelo aumento da permeabilidade vascular na dengue (191). Além disso, a cultura da linhagem de hepatócitos uma vez tratada com MIF recombinante, é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio, como o óxido nítrico, induzindo autofagia. Ademais, ocorre secreção de IL-8 pelos hepatócitos infectados em resposta ao vírus (192). Nestas condições, ratificando seu potencial como modelo de infecção pelo Dengue.

1.5. Vacinas para a dengue

Apesar de esforços intensos para o desenvolvimento de vacinas tetravalentes contra dengue e um significativo progresso ter sido alcançado, esta ainda não é uma realidade (52, 65, 193-196). Com isso, tem havido um renovado interesse desta doença infecciosa por pesquisadores, agências de financiamento, políticos e fabricantes de vacinas, igualmente. A criação de parcerias público-privadas para o desenvolvimento de produtos tem facilitado o processo. Estudos recentes sobre a carga de doença têm quantificado o custo da dengue, tanto para o setor público quanto para as famílias, demonstrando o potencial custo-eficácia de uma vacina para esta enfermidade (197-200).

Sendo assim, uma boa vacina para a prevenção da dengue em países endêmicos, deve ser: i) eficaz contra todos os sorotipos, ii) segura, iii) de longa duração (de preferência até aos 10 anos) e iv) econômica (3).

1.6. Drogas antivirais

A busca por medicamentos antivirais contra a dengue é um novo empreendimento que está ganhando força devido à evolução da doença e a substancial biologia estrutural do vírus, uma vez que o HCV e o vírus dengue são membros da família *Flaviviridae*, o trabalho intensivo para antivirais HCV - especialmente aqueles que visam a RNA polimerase - pode beneficiar a busca de antivirais da dengue (201), embora os mecanismos de patogênese possam ser diferentes já que o DENV não desenvolve uma infecção crônica.

A justificativa para procura de antivirais contra a dengue surge a partir de estudos clínicos que têm observado que a quantidade de vírus em circulação no sangue de pacientes que desenvolvem Dengue grave é mais elevada, por cerca de 1-2 registros, em comparação com os pacientes que sofrem da Febre da dengue, mais branda. Diferenças semelhantes da carga viral, relacionadas com a gravidade, foram observadas em modelos animais ADE (202, 203). Esta observação sugere que a progressão para as formas grave da doença pode ser revertida pela administração de potentes e seguros compostos de moléculas pequenas, que têm como alvos os passos essenciais da replicação do vírus numa fase precoce da doença, diminuindo assim, em níveis marcantes, a carga viral (3).

Existem numerosas exigências para o desenvolvimento uma droga anti-dengue: (i) via oral de administração, (ii) frequência de administração - uma vez, com estabilidade de dias, (iii) devido ao calor e a umidade, uma longa vida útil, (iv) baixo / razoável custo do produto e (v) facilidade de formulação, para permitir medicamentos a preços viáveis (204), entre outras. Com relação à eficácia clínica, a droga de escolha deve ser ativa contra todos os sorotipos, reduzir os sintomas e diminuir a incidência da forma grave. Além disso, um medicamento seguro pode ser avaliado para utilização profilática, bem como pediátrica, após ensaios apropriados (3).

1.7. Plantas Medicinais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), *planta medicinal* é definida como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (205).

O uso de plantas com fins medicinais, para prevenção, tratamento e cura de enfermidades, é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade (206). Bem antes do surgimento da escrita, o homem já utilizava ervas para fins alimentares e clínicos. Buscando as espécies vegetais mais apropriadas para sua alimentação ou para cura de seus males, nossos ancestrais foram descobrindo as que serviam para se alimentar, se medicar, as que eram venenosas e as que causavam efeitos alucinógenos (207). Um dos primeiros relatos para tal uso data de 2.600 a.C., período que as civilizações mesopotâmicas utilizavam aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas, em sua maioria, óleos essenciais obtidos de

Cedrus, *Cupressus sempervirens* e *Papaver somniferum* (208). A Grécia Antiga contribuiu de forma significativa para o desenvolvimento consciente do uso das plantas. Elas eram descritas e classificadas por Theophrastus (300 a.C.), naturalista conhecido como “pai da Botânica” e que foi de extrema importância ao descrever suas qualidades, desvendar mudanças nas características vegetais advindas do cultivo e anunciar a possível descoberta dos flavonoides (209, 210).

Ainda em relação às civilizações mais recentes, uma contribuição importante foi dada pelos povos Helênicos, que ao receberem dos Persas muitos produtos orientais, tiveram grandes médicos como Hipócrates, o “pai da medicina” e Galeno a quem se devem algumas das formas farmacêuticas precursoras dentre as que ainda hoje são usadas (211). O escritor mais proeminente a respeito de drogas vegetais foi Dioscorides, “o pai da farmacognosia”, médico, que estudou plantas medicinais no decorrer de suas viagens com o exército romano. Por volta de 77d.C, ele escreveu a obra clássica “De Matéria Médica”, a qual oferecia uma abundância de dados sobre as plantas medicinais que constituíram a base médica até o final da Idade Média e Renascença (212). Dentre as drogas descritas, 65 eram de origem vegetal, com descrições da aparência externa, localidade, modo de recolha, preparações medicinais e seus efeitos terapêuticos. As plantas com efeitos leves eram dominantes, mas também há referências quanto as que continham alcalóides ou outras substâncias com efeitos mais fortes (213). Enquanto os povos antigos usavam, principalmente, formas simples farmacêuticas e infusões de plantas medicinais, entre os séculos XVI e XVIII a demanda por drogas compostas foi aumentando (214).

O início do século XIX caracterizou-se como uma grande virada no conhecimento do uso de plantas medicinais. A descoberta, comprovação e isolamento de alcalóides da papoula, ipecacuanha, *Strychnos*, quinino, romã e outras plantas, seguidamente do isolamento de glicosídeos, marcaram o começo da farmácia científica. Com a modernização dos métodos químicos, outras substâncias ativas também foram descobertas, como vitaminas, hormônios entre outros (215).

No Brasil, o conhecimento das propriedades de plantas medicinais é uma herança da cultura indígena, uma sabedoria tradicional que é transmitida no decorrer das gerações. O índio tem um conhecimento profundo da flora medicinal, retirando dela os mais diversos remédios, usados de maneiras variadas. Suas práticas curativas e preventivas estão relacionadas com o modo como ele percebe a doença e suas causas, sendo realizadas pelo pajé em rituais cheios de elementos mágicos e

místicos. Existem inúmeras espécies em todo o mundo e a Amazônia abriga cerca de 50% da biodiversidade do Planeta. De acordo com dados de instituições de pesquisas da região, cerca de cinco mil, dentre as 25 mil espécies amazônicas, já foram catalogadas e suas propriedades terapêuticas estudadas (207).

As plantas medicinais têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: interferindo na produção de mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros); agindo sobre a produção ou ação de mensageiros secundários como guanosina monofosfato cíclica (GMPc), adenosina monofosfato cíclica (AMPc), proteínas quinases (PKs), na expressão de fatores de transcrição como proteína ativadora-1 (AP-1), fator nuclear κ B (NF- κ B) e proto-oncogenes (cjun, c-fos e c-myc); inibindo ou ativando a expressão de moléculas pró-inflamatórias como sintetase do óxido nítrico (NOS), ciclooxigenases (COX), citocinas (interleucina IL-1 β , fator de necrose tumoral TNF- α , e outros) e sobre a produção e ação de neuropeptídeos e proteases (216).

Muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização destas plantas medicinais, entre eles, o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência ao uso de produtos de origem natural (217). Percebe-se o interesse em associar avanço tecnológico, conhecimento popular e desenvolvimento sustentável visando uma política de assistência em saúde eficaz, abrangente, humanizada e independente da tecnologia farmacêutica (218). Suas aplicações baseiam-se nas experiências da medicina popular (tradicional) ou na nova pesquisa científica com resultados experimentais (medicina convencional). Muitas plantas medicinais são empregadas de forma independente ou em combinação com drogas sintéticas (medicina complementar). Para aplicação de uma terapia adequada que obtenha sucesso, o conhecimento do diagnóstico preciso da doença bem como os efeitos farmacológicos dos componentes dessas, são essenciais (219). No entanto, uma grande quantidade de espécies vegetais com propriedades medicinais perigam extinguir-se antes mesmo dos seus valores serem identificados e reconhecidos, sendo inerente a intensificação dos investimentos neste campo (220). Além disso, estima-se que 70-90% das pessoas do mundo utilizem plantas medicinais para tratar doenças e tem recomendado que os países membros, principalmente os em via de

desenvolvimento, incluem o arsenal terapêutico na saúde pública (221, 222). A adoção da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS - Brasil), a partir de 2006, permitiu maior e melhor acesso ao conhecimento das plantas medicinais brasileiras e seu emprego na recuperação e manutenção da saúde (223).

Desta forma, o amplo uso de medicamentos à base de plantas e o próprio conhecimento popular trazem consigo a necessidade de estudos para esclarecimentos e confirmações de informações sobre as ações das plantas, visando à minimização de efeitos colaterais e toxicológicos, haja vista que tal uso deve ser confiável e seguro (224). Portanto, pesquisas com plantas medicinais, partindo das suas aplicações pelas comunidades, podem fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos, com grande economia de tempo e dinheiro.

1.7.1. Produtos Naturais

Produtos naturais são compostos químicos ou substâncias produzidas por um ser vivo. Estes são encontrados na natureza e, geralmente, tem atividade biológica ou farmacológica que podem ser usadas na descoberta ou concepção de produtos farmacêuticos (225, 226). Eles podem ser classificados de acordo com suas estruturas químicas, atividades fisiológicas, especificidades da planta ou organismo (taxonomia) e origem bioquímica (227). Os produtos naturais extraídos de plantas sempre exerceram um papel importante na descoberta de novos fármacos e podem atuar como modelos estruturais para a síntese de substâncias novas ou protótipos ativos (220).

São descritas muitas atividades relacionadas aos compostos provenientes dos produtos naturais. Entre elas, a ação antiviral sobre diversos patógenos potencialmente infecciosos (228-232), bem como, contra o DENV (233-236). Além de atividade imunomodulatória ampla (236-238).

1.7.2. Fitoterápicos

A palavra *Fitoterapia* tem origem grega e resulta da combinação dos termos *Phito* = plantas e *Therapia* = tratamento e, de acordo com o Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa, seu significado é “tratamento de doença mediante o uso de plantas” (239). É o estudo das plantas medicinais e suas aplicações nos tratamentos

de morbidades, seja na prevenção, alívio ou cura das doenças. A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico (206).

À vista disso, segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), *Fitoterápico* é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas” (240)

Visando contribuir para a evolução da pesquisa científica, a espécie escolhida para este estudo pertence ao gênero *Uncaria* e está presente preferencialmente em regiões tropicais, como na Amazônia Legal.

1.8. *Uncaria sp.*

A família *Rubiaceae*, descrita primeiramente por Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, tem seu nome derivado do gênero *Rubia L.*, do latim *rubium*, relativo à tinta vermelha produzida pelas raízes de plantas deste gênero, utilizadas para tingir tecidos (241). É composta por cerca de 637 gêneros e aproximadamente 12.000 espécies (242). Sua distribuição geográfica é cosmopolita e abrange principalmente as regiões tropicais e subtropicais alcançando, também, as regiões temperadas e frias da Europa e norte do Canadá (243). No território brasileiro, existem por volta 120 gêneros e 2.000 espécies de *Rubiaceae* (244), sendo considerada uma das principais famílias da flora, ocorrendo como um importante elemento em quase todas as formações naturais (245, 246). Suas espécies estão distribuídas por diversas formações vegetacionais do território brasileiro, sendo registradas principalmente no domínio Atlântico (247).

Esta família apresenta um considerável número de espécies com importância econômica, principalmente medicinal, ornamental ou alimentícia (248, 249). Destaca-se pela variedade de compostos químicos produzidos, incluindo alcalóides, especialmente alcalóides indólicos, alguns taninos, triterpenos e, menos

frequentemente, saponinas (241, 250). Espécies de *Uncaria*, entre outras da família *Rubiaceae*, são muito estudadas sob o enfoque químico devido à presença de alcalóides do tipo oxindólico (251), para os quais são relatadas várias atividades farmacológicas (252).

Na atualidade, as chamadas "unha de gato" possuem significativa importância devido às suas propriedades antiinflamatórias, estimulantes do sistema imunológico e antitumorais (253-255) (FIGURA 8). Recentemente, em estudos do Laboratório, foi demonstrado que extratos de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC apresentaram propriedades imunomoduladoras e antivirais em modelos de infecção (256, 257).



Figura 8: *Uncaria sp.* Folhas e espículas características de espécies de *Uncaria*, conhecidas como “unha de gato”.

Fontes: Dimetre, R.

2. JUSTIFICATIVA

A dengue é uma virose aguda febril com sintomas característicos que pode evoluir para uma doença grave. O tratamento é sintomático não havendo vacinas ou medicamentos específicos disponíveis (234, 258-261). Portanto, devido às evidências concretas indicando que as reações imunológicas desempenham um papel crucial para a patogênese da infecção e, considerando que o organismo em poucos dias consegue controlar a replicação viral durante a enfermidade, uma relevante abordagem de investigação é o estudo de compostos que possuam propriedades imunomoduladoras.

A equipe do Laboratório de Imunologia Viral (IOC/FIOCRUZ) tem trabalhado em estreita parceria com os pesquisadores químicos Dra. Ligia Marinho Valente (UFRJ), e Dr. Antonio Carlos Siani (Far-Manquinhos – FIOCRUZ), focando em plantas da medicina popular que tenham atividades antifebris ou imunomodulatórias. Assim, tornam-se relevantes estudos de outros novos extratos/frações, passíveis de patente ou não, para o desenvolvimento de um produto de origem fitoterápica para esta doença infecciosa. Não será divulgada a espécie estudada por estar sob sigilo, uma vez que ainda não existem patentes relacionadas aos seus efeitos em infecção pelo Dengue.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer modelo *in vitro* de infecção para dengue para identificação de possíveis atividades imunomoduladora e/ou antiviral de extratos originados de *Uncaria sp.*, reconhecida pela etnofarmacologia como planta medicinal com propriedades antifebris e/ou imunomoduladoras.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar as propriedades dos extratos hidroalcoólicos usando o modelo de infecção em linhagem contínua de hepatócitos humanos (Huh-7), por DENV-2:

1. Avaliar o modelo *in vitro* quanto à infectividade e à produção de citocinas/fatores imunológicos;
2. Determinar a citotoxicidade dos extratos brutos de *Uncaria sp.* em cultura de hepatócitos;
3. Selecionar as concentrações que apresentarem menor citotoxicidade e usando hepatócitos infectados e tratados:
 - a. Avaliar a atividade antiviral pela detecção da secreção da proteína não estrutural NS1 e a atividade imunomoduladora pela detecção da secreção da proteína inflamatória MIF;
 - b. Confirmar a atividade antiviral pela avaliação das taxas de infecção obtidas através da detecção dos antígenos virais intracelulares;
4. Selecionar as concentrações dos extratos que apresentarem melhores efeitos antiviral / imunomodulador e com a cultura infectada e tratada:
 - a. Identificar possíveis mecanismos de ação dos extratos:
 - i) realizando avaliação da viabilidade celular, relacionando-a à detecção dos antígenos virais intracelulares;
 - ii) determinando as taxas de células apoptóticas e necróticas, fazendo relação com a carga viral extracelular (NS1);
 - iii) detectando a produção de óxido nítrico (NO) – um mediador antiviral;
 - iv) avaliando a atividade imunomoduladora pela detecção de IL-8 e IL-6, citocinas que induzem permeabilidade endotelial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais e reagentes

4.1.1. Meios de cultura

Meio Dulbecco's - GIBCO # 41300-070;

Meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol – LBG Biotecnologia # BR 30197.05.

4.1.2. Reagentes

Acetato de NG-METIL-L-ARGININA - SIGMA-ALDRICH # M7033;

Aminoácidos não-essenciais – GIBCO # 11140-050;

Azul de Trypan – SIGMA # T8154;

BFA - SIGMA-ALDRICH # B7651;

Bicarbonato de Sódio P.A – SIGMA-ALDRICH # S8875;

BSA – SIGMA-ALDRICH # A7906;

Decadron injetável (fosfato dissódico de dexametasona-4mg) - Aché;

Dengue NS1 Ag kit Platelia – BIORAD # 72830;

DMSO - SIGMA-ALDRICH # D2650;

Estreptavidina-HRP – R&D Systems # 890803;

Fungizona – GIBCO # 15290-018;

Human IL-6 Matched Antibody Pairs - eBioscience # 84614022;

Human IL-8 ELISA Development Kit – PeproTech # 1012018;

Human MIF ELISA Development Kit – R&D Systems # DY289;

L-Glutamina – GIBCO # 25030-081;

MTT Cell Proliferation Assay Kit – INVITROGEN # M6494;

Paraformaldeído – SIGMA # P6148;

Penicilina-Estreptomicina – GIBCO # 15070-063;

PlasmocinTM Treatment - InvivoGen # 11J11-MM;

Reagente de Griess (modified) - SIGMA-ALDRICH # G4410;

Saponina – SIGMA-ALDRICH # S7900;

SFB – GIBCO # 12657-029;

S-NITROSO-N-ACETILPENICOILAMINA - SIGMA-ALDRICH # N3398;

TMB – SIGMA-ALDRICH # T0440;

Tripsina-EDTA 0,25% (1X) – GIBCO # 25200-056;

Triptose Fosfato – SIGMA # T-8482;

Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate) – SIGMA-ALDRICH # 1280.

4.1.3. Soluções gerais

PBS 10X (ph 7,2 – 7,4):

Cloreto de Sódio 80 g;
Cloreto de Potássio 2 g;
Fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4) anidro..... 9,6 g;
Fosfato monobásico de potássio (KHPO_4) 1,4 g;
Água destilada q.s.p. 1000 mL.

Solução de Azul de Trypan 2%:

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

Bicarbonato de sódio:

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

4.1.4. Soluções para citometria de fluxo

Solução de lavagem (BSA 1%, azida 0,1% e PBS 1X)

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

Solução de bloqueio (BSA 1%, azida 0,1%, PBS 1X e plasma 5% inativado)

Azida sódica 0,1 g;
BSA 1 g;

Plasma autólogo inativado a 56° por 30min 5 mL;
PBS q.s.p. 100 mL.

Solução de permeabilização (BSA 1%, azida 0,1%, saponina 0,15% e PBS 1X)

Azida sódica 0,1 g;
BSA 1 g;
Saponina 0,15 g;
PBS q.s.p. 100 mL.

Solução de fixação (PFA 2% e PBS 1X)

Paraformaldeído 2 g;
PBS q.s.p. 100 mL.

4.1.5. Soluções para ELISA MIF / IL-8

Solução de lavagem (Tween 20 0,05% e PBS 1X)

Tween 20 0,5 mL;
PBS q.s.p. 1000 mL.

Solução de bloqueio (BSA 1% e PBS 1X)

BSA 1 g;
PBS q.s.p. 100 mL.

Solução diluente (BSA 1%, Tween 20 0,5% e PBS 1X)

BSA 0,1 g;
Tween 20 0,5 mL;
PBS q.s.p. 100 mL.

Solução para substrato (1:1 de TMB em PBS);

Solução de Parada (H₂SO₄ 2N).

4.1.6. Soluções para ELISA IL-6

Solução de lavagem (Tween 20 0,05% e PBS 1X)

Tween 20 0,5 mL;
PBS q.s.p. 1000 mL.

Solução tampão (1X)

BSA 5g;
Tween 20 0,5 mL;
PBS q.s.p. 1000 mL.

Solução para Substrato (1:1 de TMB em PBS);

Solução de parada (H₃PO₄ 1N).

4.1.7. Soluções de kit para marcação de células mortas fixadas "LIVE/DEAD" (Vivas/mortas)

Solução de lavagem (PBS 1X)

PBS 10X 100 mL;
Água destilada q.s.p.....1000 mL.

Solução de Fixação (PFA 2% - SFB 2%)

PFA 2% 49 mL;
SFB q.s.p.....50 mL.

Solução de bloqueio (BSA 1% - plasma humano inativado 5% - PBS 1X)

Plasma 50 mL;
BSA 10 mL;
PBS 1X q.s.p 1000 mL.

Solução de permeabilização (saponina 0,1% - BSA 1% - PBS 1X)

Saponina	1 mL;
BSA	10 mL;
PBS 1X q.s.p	1000 mL.

4.1.8. Soluções para FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I

Tampão de ligação (1X)

Binding Buffer 10X	10 mL;
Água destilada q.s.p	100 mL.

4.1.9. Reconstituição dos reagentes do kit *Platelia* Dengue NS1 Ag:

Lavagem – 1/20 em água destilada;

Conjugado e diluente – 1/50 em diluente;

Cromógeno e tampão de substrato – TMB (<0,1%), H₂O₂ (<1%);

Solução de parada (H₂SO₄ 1N).

4.1.10. Anticorpos e marcadores protéicos

Anticorpo de camundongo anti-Dengue Complex – MILLIPORE # MAB8705;

Alexa Fluor 488 – Life technologies # A20181;

IgG2a Control-Ac Monoclonal Purificado – CHEMICON # MABC004;

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I - BD Pharmingen™ # 556547;

LIVE/DEAD Fixable Read Dead Cell Stain Kits - Molecular Probes # L10120;

4.2. Cepa viral

Utilizou-se para os ensaios de infecção das células de hepatocarcinoma humano uma cepa asiática padrão universal – 16681 do vírus DENV-2, a qual foi cedida pelo Dr. Halstead do Instituto Militar de Pesquisa Walter Reed, Maryland/EUA (262). O lote 13 do vírus foi passado duas vezes em célula epitelial de rim de

macaco Rhesus (LLCMK2) e, crescido em células de glândula salivar do mosquito da espécie *Aedes albopictus* (C6/36). O vírus foi ativado, inicialmente, em tubos de ensaio contendo monocamada de células C6/36. Para a verificação do efeito citopático (CPE), a cultura foi mantida a 28°C e observada por um período de 7 a 10 dias. Após a verificação de 50% de CPE, o sobrenadante da cultura foi recolhido e mantido a -70°C. Para confirmar a presença de vírus na célula foi realizada Imunofluorescência Indireta.

4.2.1. Produção da massa viral

A produção da massa viral foi realizada em células clone do mosquito *Aedes albopictus*, C6/36, no Laboratório de Imunologia Viral. Num período de 8 dias após a infecção, o sobrenadante contendo as partículas virais foi colhido e limpo de detritos celulares por centrifugação sob baixa velocidade (1000g) durante 10 min a 4°C. Posteriormente, o sedimento foi descartado e o sobrenadante foi ultracentrifugado (100000g) durante 1 hora a 4°C. Depois, o *pellet* foi ressuspenso em Soro, isento de meio RPMI 1640 e, posteriormente, realizou-se purificação numa unidade de filtração com poros de tamanho de 0,22 um (Millipore) e as alíquotas foram guardadas a -70°C.

4.2.2. Titulação viral

A titulação do inóculo viral foi realizada por diluição em série em placas de microtitulação e detectada por imunofluorescência, como já descrito (263, 264). O título do Vírus foi calculado como 50 por cento da dose de infecção de cultura de tecidos (TCID₅₀) (265), resultando numa concentração de 5×10^9 TCID₅₀/mL, passagem #7.

4.3. Amostras vegetais

Foram utilizadas amostras originadas de uma planta medicinal que possui seus efeitos imunomodulatórios e/ou antivirais verificados pela medicina popular ou, ainda, de maneira científica. Desta maneira, usamos lotes únicos de extratos brutos

derivados das cascas do caule (UGC = 787,0g) e folhas moídas (UGF = 528,0g), em etanol-água 1:1, coletadas do espécime selvagem de *Uncaria* em Rio Branco, Acre, Brasil / 2007. O material foi identificado pelo botânico Mário Gomes (JBRJ) e uma exsiccata encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o N°. RFA 36973.

As espécies do gênero *Uncaria* contêm, em diferentes proporções, alcalóides indólicos e oxindólicos, triterpenóides glicosilados, esteróides e proantocianidinas que podem variar conforme a região da planta (266). Entretanto, para a espécie utilizada neste projeto, ainda não existe um marcador químico confiável. No entanto, ressaltamos que foram usados lotes únicos e que a investigação do seu perfil químico já está sendo realizada por nossos colaboradores.

4.3.1. Preparo das amostras vegetais

O material vegetal (UGC/UGF) foi extraído a exaustão, em temperatura ambiente. Ou seja, transferiu-se o mesmo para um recipiente de vidro e cobriu-se com a mistura de solventes por uma noite. Em seguida, o solvente foi filtrado e novo lote de mistura de solvente foi adicionado ao conteúdo residual. Esta etapa repetiu-se cerca de cinco vezes ou até o solvente não apresentar mais coloração. Todos os filtrados foram reunidos e o solvente evaporado a pressão reduzida de 37°C (rota-vapor). O processo de destilação a pressão reduzida faz com que o solvente destile a uma temperatura inferior ao seu ponto de ebulição, diminuindo assim (ou mesmo anulando), a probabilidade de danos às substâncias presentes nos extratos. O rendimento desses extratos (secos) foi na ordem de 10%.

Para este estudo foram utilizadas, inicialmente, as concentrações de 100, 50, 25, 10 e 1µg/mL de UGC e de UGF. As quais partiram de uma concentração estoque de 1mg/mL, diluída em 1% de DMSO e PBS 1X q.s.p 0,2mL. Esta foi irradiada com 200 rads por 5 horas.

4.4. Manutenção das Huh-7

As células de hepatocarcinoma humano (Huh-7) foram mantidas em garrafas de 25 cm³, contendo meio Dulbecco's completo, suplementado com 10% SFB, 2mM de L-glutamina, 100µg/mL de Estreptomicina e 100U/mL de Penicilina, incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O crescimento das Huh-7 foi acompanhado

diariamente com o auxílio de um microscópio invertido de contraste de fase, sendo que a passagem para novas garrafas foi realizada quando a monocamada celular atingia mais de 80% de confluência. As garrafas 25cm³ foram lavadas com meio Dulbecco's, sendo destacadas após com Tripsina-EDTA 0,25%. Em seguida, as mesmas foram incubadas a 37°C/5%CO₂ por 3 a 5 minutos. Depois, neutralizou-se a tripsina com meio Dulbecco's contendo 10% SFB. Após, ocorreu centrifugação 250g/7min/RT. O *pellet* formado foi ressuspenso com meio Dulbecco's contendo 10% SFB, e transferido para novas garrafas de 25cm³, completando-as para o volume de 10mL. As mesmas foram mantidas incubadas em estufa 37°C/5%CO₂ e utilizadas nos ensaios da passagem 74 até 92.

4.5. Ensaio de viabilidade celular / citotoxicidade – MTT

Utilizando cultura de Huh-7, foi realizada contagem celular no TC20™ Automated Cell Counter (BioRad) utilizando azul de trypan 0,4% e, após, plaqueamento do meio com células (10⁵ células por poço) em placa de 96 poços. Adicionou-se 200µL de meio Dulbecco's 10% SFB por poço, sendo cada placa incubada a 37°C/5%CO₂ por cerca de 48h, em média. Após formação da monocamada celular, o experimento prosseguiu. Seguido este período, retirou-se todo o sobrenadante e foram acrescentados 200µL de meio específico 2% SFB nos poços controle e nos outros poços 200µL das amostras de UGC/UGF diluídas: 50µg/mL, 25µg/mL 10µg/mL, 5µg/mL e 1µg/mL. As placas foram incubadas na estufa por 24h à 96h. Depois de cada período da cinética, retirou-se 180µL de sobrenadante dos poços e adicionou-se 100µL de Meio RPMI sem vermelho de fenol e 10µL de MTT em todos. Ainda, foi adicionado um controle negativo com apenas MTT e Meio RPMI. Cada placa foi protegida da luz e incubada por 4h a 37°C/5%CO₂. Em seguida, retirou-se o sobrenadante por poço de maneira que restasse apenas 25µL. Por fim, acrescentou-se 50µL de DMSO por poço, homogeneizando 3x. Incubou-se por 10min a 37°C/5%CO₂. Seguidamente, homogeneizou-se por mais 3 vezes. Ao final, fez-se a leitura no SpectraMax Paradigm Software SoftMax® Pro 6, 620nm - 570nm e os resultados foram projetados no Programa GraphPad Prism 6, para posterior aplicação de testes estatísticos.

4.6. Infecção / tratamento das Huh-7

Foram plaqueadas 10^5 células por poço em placa de 96 poços, completando para um volume final de 200 μ L por poço. Incubou-se em estufa 37°C/5%CO₂ por 48h, em média, ou até a formação da monocamada. Passado esse período, retirou-se, com cuidado, o sobrenadante e adicionou-se 50 μ L do inóculo viral 1/100 em meio Dulbecco's sem SFB. Ocorreu incubação por mais 1h30/2h para adsorção viral em estufa 37°C/5%CO₂. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 200 μ L por poço de meio com 2% de SFB ou meio com 2% de SFB mais tratamentos de UGC/UGF. Em seguida, incubou-se nas mesmas condições até as marcações e coletas desejadas serem realizadas. Ressaltam-se as realizações de cinéticas, onde se verificou diferentes períodos da infecção viral e os respectivos tratamentos. Como controle positivo, utilizamos a Dexametasona (0,1mM) no intuito de controlar a taxa viral e a produção de mediadores inflamatórios (256).

4.7. Citometria de fluxo

4.7.1. Marcação intracelular do antígeno viral

Foram recolhidos 200 μ L por poço dos sobrenadantes das células Huh-7, infectadas e tratadas, armazenando-os a -70°C. Adicionou-se então, 50 μ L por poço (em placa de 96 poços) de Tripsina-EDTA 0,25% e incubou-se a 37°C/5%CO₂ de 2 a 3min. Consecutivamente, foram adicionados 50 μ L de SFB e 100 μ L de Solução de Lavagem, e os volumes dos poços foram recolhidos e transferidos para uma placa de 96 poços com fundo em "U". Posteriormente, ocorreu centrifugação a 250g/7min/RT. Descartou-se o sobrenadante e foi feita ressuspensão com 180 μ L por poço de Solução de Lavagem. Depois, foi realizada nova centrifugação. Seguiram-se etapas de fixação com PFA 2%, permeabilização e bloqueio. Sendo assim, adicionou-se 20 μ L por poço de Dengue Complex diluído (1:100 – anti-proteína E) em Saponina 0,15% e do Isotipo IgG2A (1:100), incubou-se a 4°C por 60min. Decorrido o tempo, adicionou-se 150 μ L por poço de Solução de Saponina 0,15%. A placa foi centrifugada, novamente. Descartaram-se os sobrenadantes. Depois, adicionou-se 20 μ L por poço de Alexa Fluor 488 diluído (1:400) em Saponina 0,15%. A etapa de centrifugação foi repetida. Descartaram-se os sobrenadantes. As células foram ressuspendidas, fixadas por 15 minutos e, em seguida, centrifugadas.

Por fim, foram transferidas com 200µL de PBS 1X para os tubos de leitura no FACS Accuri. Os resultados foram analisados no Programa FlowJo 7.6.5 para posterior projeção gráfica no Programa GraphPad Prism 6.

4.8. Avaliação da produção de NS1 nos sobrenadantes das culturas

4.8.1. Detecção semi-quantitativa de NS1

Utilizando o Dengue NS1 Ag kit Platelia (BioRad # 72830), adicionou-se por poço da placa (Precoated: pré-revestidas com anticorpo de captura) 50µL de Solução Diluente, 50µL de amostra diluída 1:50 ou controle, 100µL de Conjugado diluído, seguidamente. Depois, adesivou-se e incubou-se a placa a 37°C/5%CO₂ por 90 minutos. Após este período, lavou-se a placa 6 vezes na lavadora Elisa com Solução de Lavagem (1:20). Preparou-se a solução de TMB e foram distribuídos 160µL por poço do Revelador. Incubou-se em temperatura ambiente por 30 minutos. Adicionou-se 100µL de Stop Solution (H₂SO₄ 1N) por poço. Fez-se a leitura da placa na leitora SpectraMax Paradigm Software SoftMax® Pro 6 a 450nm. Os resultados foram analisados no Programa GraphPad Prism 6, para posterior aplicação de testes estatísticos.

4.9. Avaliação da produção de MIF, IL-8 e IL-6 nos sobrenadantes das culturas

Previamente, as soluções a serem utilizadas foram preparadas: Solução de Lavagem (0,05% de Tween 20 em PBS 1X), Reagente Diluente (diluir 1g de BSA em 100mL de PBS 1X filtrado, pH 7,2-7,4) e Stop Solution (H₂SO₄). Após o preparo de tais soluções, o AC Capture foi diluído em PBS 1X (1/180). Após, adicionou-se 100µL por poço e a placa ficou *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, a mesma foi lavada 3x na Lavadora Elisa e acrescentou-se 280µL por poço de Solução Diluente, bloqueando-a. Incubou-se a placa de 96 poços por 1h em temperatura ambiente. Lavando-a 3x, após esse período. Em seguida, preparou-se a Curva Padrão em Tampão Diluente (Valores de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 0 pg/mL). Foram distribuídos 100µL das amostras/sobrenadantes e da Curva Padrão. A placa foi incubada por 2h em temperatura ambiente. Lavou-se 3x a mesma, e adicionou-se 100µL de AC de Detecção (1/180). A incubação foi feita por 2h em temperatura ambiente. Após, foi lavada 3x e acrescentou-se 100µL por poço de Estreptavidina-HRP (1/200) no escuro. Ocorreu incubação por 20min em

temperatura ambiente. Lavou-se 3x e adicionou-se 100µL por poço de TMB, também no escuro. Depois, incubou-se por mais cerca de 30min em temperatura ambiente. Acrescentou-se 50µL por poço de Solução de Parada (H₂SO₄), homogeneizando-a suavemente.

Para IL-6: Solução de Lavagem (0,05% de Tween 20 em PBS 1X) e Assay Buffer (BSA 5%, Tween 20 0,5% em PBS 1X). Após o preparo das mesmas, foi realizada a cobertura da placa de 96 poços com 100 µL de AC Coating (100 µg/mL) diluído em PBS 1X (1/200), ficando *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, a mesma foi lavada 1x na lavadora Elisa e acrescentou-se 250µL por poço de Assay Buffer. Em seguida, incubou-se a placa por 2h em temperatura ambiente. Lavando-a 2x, após esse período. Assim, preparou-se a Curva Padrão em Assay Buffer a partir de uma concentração estoque de 200pg/mL (Valores de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,5625 e 0 pg/mL) e o Conjugado-Biotina com Assay Buffer (1/1000). Foram distribuídos 100µL do Assay Buffer nos poços da Curva Padrão e 50µl do mesmo nos outros poços, adicionando-se em seguida, 100µL das concentrações da Curva e 50µL dos sobrenadantes, respectivamente. Em sequência, acrescentou-se 50µL do Conjugado-Biotina em todos os poços. A placa foi incubada por 2h em temperatura ambiente, protegida da luz. Após, lavou-se 4x a mesma, e adicionou-se 100µL por poço de Estreptavidina-HRP diluída em Assay Buffer (1/5000), no escuro. Ocorreu incubação por 1h em temperatura ambiente, protegida da luz. Lavou-se 4x e adicionou-se 100µL por poço da Solução Substrato (TMB), também no escuro. Depois, incubou-se por mais cerca de 10min em temperatura ambiente. Fez-se a leitura no SpectraMax Paradigm Software SoftMax® Pro 6, 620 nm. A reação foi interrompida quando o primeiro ponto da curva (S1) atingiu DO entre 0,9 - 0,95, utilizando-se 200µL de Solução de parada (H₃PO₄). Os resultados de todos os ELISAS foram analisados no Programa GraphPad Prism 6, para posterior aplicação de testes estatísticos.

4.10. Avaliação da viabilidade celular por marcação de proteína celular

4.10.1. Kit para marcação de células mortas fixadas "Live/Dead" (Vivas/mortas) com Marcação Intracelular do Ag Denv

Destacou-se a monocamada celular da placa de cultura com 50µL de Tripsina-EDTA 0,25% (3min a 37°C/5%CO₂), neutralizou-se com 50µL de SFB e 100µL de PBS1X. Com isso, fez-se a transferência do volume para a placa de

citometria (fundo em "U"). Centrifugou-se a 350g/6min/4°C. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram lavadas com 230µL de PBS1X. Centrifugou-se a 350g/6min/4°C. Novamente, lavou-se as células com 230µL de PBS1X. Centrifugou-se nas mesmas condições. Em seguida, foi adicionado o LIVE/DEAD Red (em 1mL de PBS1X, utilizou-se 1µL do LIVE/DEAD para 1 milhão de células. No caso, usou-se 20µL dessa solução por poço). Incubou-se por 30min/4°C. Após esse período, nova lavagem foi realizada com 230µL de PBS1X. Centrifugou-se a 350g/6min/4°C. Posteriormente, as células foram fixadas com 100µL de PFA 2%-PBS por 15min em temperatura ambiente (RT). Centrifugou-se a 350g/6min/RT. Foram adicionados 100µL por poço de Solução de Bloqueio (BSA1% - Plasma humano inativado 5% - PBS1X), por 30min/4°C. Foram adicionados 130µL de PBS1X e, seguiu-se com centrifugação a 350g/6min/RT. Após, foi realizada permeabilização com 230µL de Saponina 0,1% - BSA1% - PBS1X. Incubou-se por 10min/4°C. Centrifugou-se, novamente. As células foram lavadas com 230µL de Saponina 0,1% - BSA1% - PBS1X e, em sequência, centrifugou-se a 350g/6min/RT. Foi feita marcação com 20µL de Dengue Complex + Alexa Fluor 488 seguida de incubação por 60min/4°C. Passado esse tempo, as células foram lavadas com 230µL de Saponina 0,1% - BSA1% - PBS1X. Centrifugou-se a 350g/6min/RT. Consecutivamente, fixaram-se as células com 100µL de PFA 2%-PBS por 15min em RT. Nova centrifugação foi realizada. Por fim, foi feita ressuspensão celular com 150µL de PBS1X e os volumes foram transferidos para os tubos FACS Accuri para leitura.

4.10.2. Kit para detecção de apoptose com Anexina V FITC

Antes do ensaio, foi preparada a solução de Binding Buffer com 1 parte da mesma para 9 partes de água destilada. Realizada diluição, a monocamada celular foi destacada da placa de cultura com 50µL de Tripsina-EDTA 0,25% (3min a 37°C/5%CO₂), neutralizou-se com 50µL de SFB e 100µL de PBS1X, transferindo-a para a placa de citometria. Foi feita centrifugação a 250g/7min/RT. Descartaram-se os sobrenadantes e os poços foram lavados com 200 µL de PBS 1X. Nova centrifugação. Adiante, realizaram-se as marcações com 20µL de PI (1/50) e FITC Annexin V (1/20) em seus respectivos poços ou em concomitância. Incubou-se por 15min/RT/protegido da luz. Finalmente, as células foram ressuspendidas com 150µL de Binding Buffer e lidas em tubos FACS Accuri.

4.11. Avaliação indireta da produção de óxido nítrico (NO)

O Reagente de Griess foi obtido a partir da mistura de N-(1-Naftil)-etilenodiamina e sulfanilamida na proporção de 1:1, sendo o mesmo protegido da luz. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100µL dos sobrenadantes das células Huh-7 infectadas e tratadas com UGC/UGF com mais 100µL do Reagente de Griess. Feitas as homogeneizações dos volumes por poço, seguiu-se incubação por 15min/RT ao abrigo da luz. Decorrido esse tempo, a determinação dos níveis de nitrito (NO₂⁻) foi realizada pelo SpectraMax Paradigm Software SoftMax® Pro 6, 540 nm. Foi utilizada uma curva padrão com valores entre 0 e 160µM.

4.12. Análise estatística

Foram analisados estatisticamente todos os resultados obtidos. Por meio de testes de avaliação da normalidade das amostras (Kolmogorov-Smirnov - KS) empregaram-se os testes estatísticos específicos para determinar a significância das diferenças observadas na cultura submetida a diferentes condições experimentais, no *GraphPad version 6.05* para Windows. Para as amostras que obedeceram a uma distribuição normal, foi utilizado teste paramétrico, como o *teste-t pareado*. Porém, para aquelas que não, foi utilizado teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pares. Ainda, para os ensaios de triagem e/ou com réplicas menores, aplicou-se o *Teste-t múltiplo*, com maior poder de detecção das variabilidades entre os períodos de cinética. Os valores de *Valor *P < 0,05* foram considerados significativos, enquanto os de *Valor **P < 0,01* e **** < 0,001*, muito significativos. Sendo também considerados como efeito *borderline* *Valores de P Δ > 0,05 e < 0,07*.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização do modelo de infecção pelo vírus Dengue usando a linhagem de hepatócitos Huh-7 e produção de mediadores inflamatórios

Para avaliação dos efeitos de possíveis compostos antivirais e imunomoduladores para dengue foi utilizado um modelo de infecção de células de hepatocarcinoma humano infectadas *in vitro*, as células Huh-7. Essas células foram cultivadas em uma concentração de 10^5 por poço, em placas de 96 poços, e infectadas com inóculo viral DENV-2 diluído 1/25; 1/50; 1/100 (título = 5×10^9 TCID₅₀/mL), conforme metodologia descrita no item 4.6. Na análise por citometria de fluxo foi definida a região morfológica (tamanho - *FSC versus SSC* – granulosidade) e, então, a exclusão de "*doublets*" ou células grumadas (FIGURA 9).

Utilizando a marcação por FACS de antígenos virais, pôde-se detectar a suscetibilidade da linhagem celular Huh-7 à infecção pelo DENV-2. Foi observado durante uma cinética que a detecção desses antígenos virais intracelulares foi maior em 24h, decrescendo nos dias seguintes até 72h, em todas as concentrações virais testadas (FIGURA 10a). Esta linhagem mostrou-se, portanto, capaz de se infectar bem por DENV-2. Assim sendo, a diluição de 1/100 foi escolhida para os ensaios de infecção e tratamento.

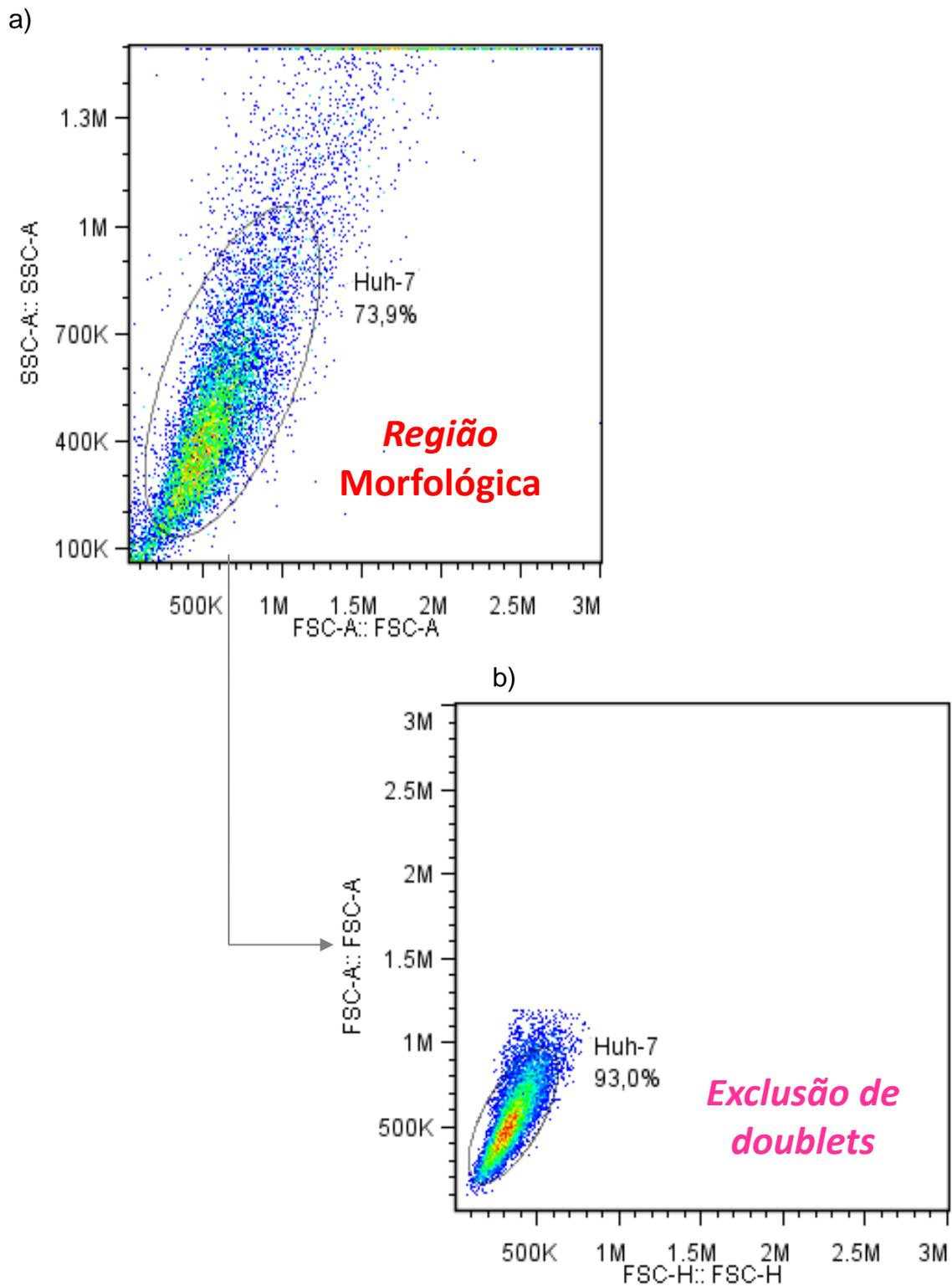
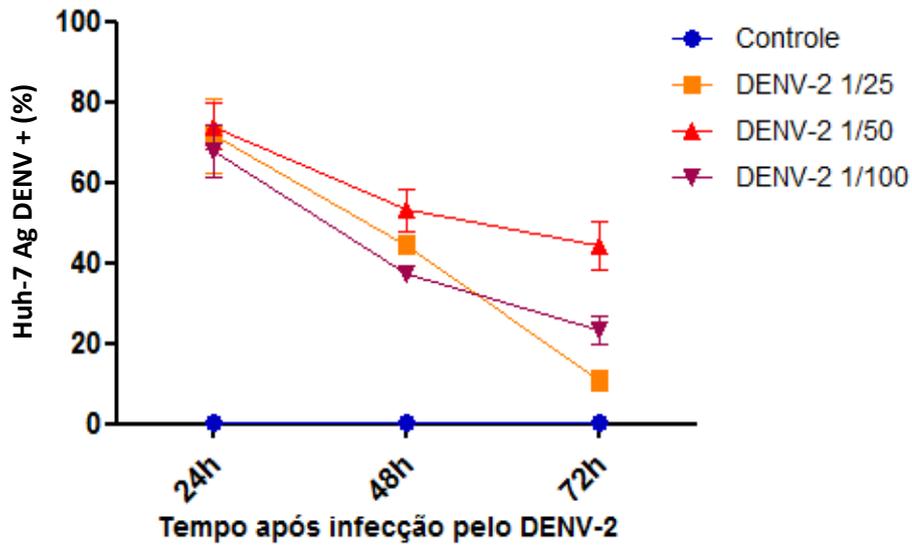


Figura 9: Morfologia celular das Huh-7 na análise por citometria de fluxo. a) Região morfológica das células Huh-7 infectadas com DENV-2 (SSC-A x FSC-A), em 48h. b) Exclusão dos *doublets* celulares de Huh-7 (FSC-A x FSC-H).

a)



b)

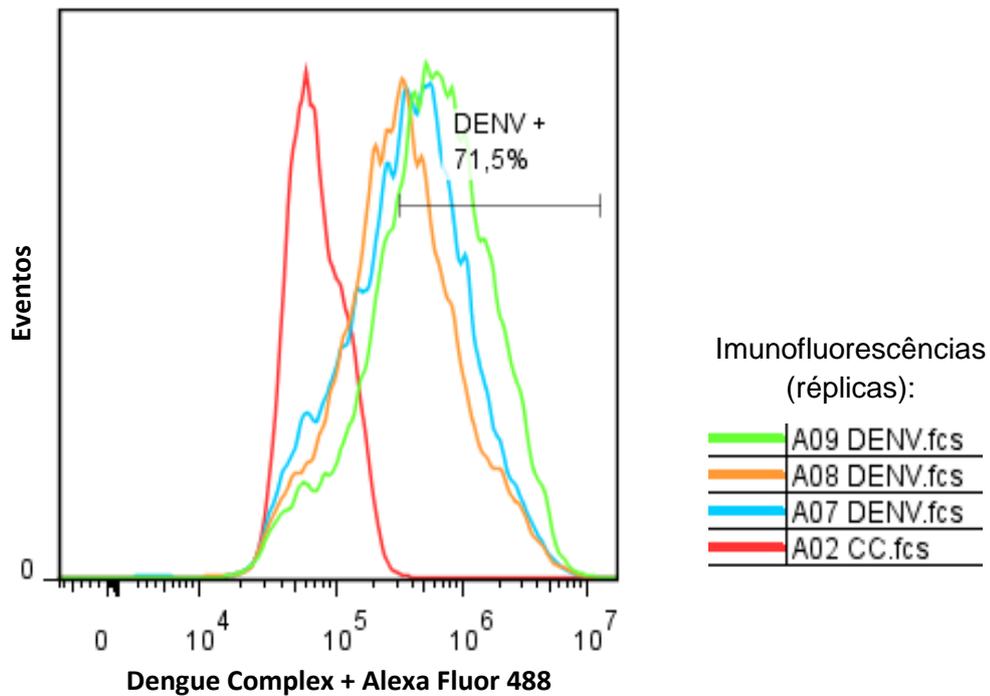


Figura 10: Marcação Intracelular do Antígeno Viral do DENV por imunofluorescência e análise por citometria de fluxo. As células foram infectadas nas diluições 1/25, 1/50 e 1/100 (24h - 72h) / TCID₅₀ = 5x10⁹/mL, em comparação com a cultura controle sem infecção (CC). a) Cinética de detecção do Ag DENV (24h-72h) b) Histograma representando a média e erro de infecção da diluição 1/100 em 24h, comparando-a com o controle (CC). Representativo de 1 experimento, sendo n = 3 experimentos independentes, com 3 réplicas cada.

A NS1 é uma proteína não-estrutural presente no DENV que é secretada pela célula e, também, pode estar relacionada com a lise de células infectadas, mediada pelo sistema complemento (267). A sua detecção comprova a infecção ocasionada pelo DENV na cultura celular. A detecção de NS1 nos sobrenadantes da cultura infectada foi progressiva ao longo dos períodos de incubação e ausente nos sobrenadantes de células controle e células expostas ao vírus inativado (FIGURA 11). Indicando assim, a presença de replicação viral.

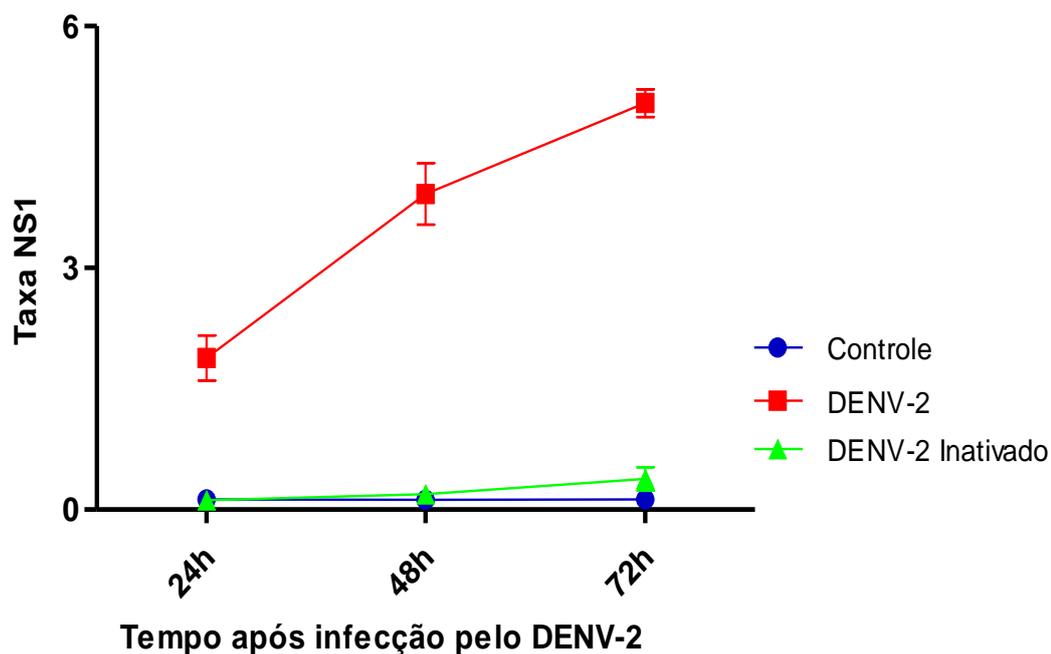


Figura 11: Produção da proteína viral não-estrutural NS1 em células Huh-7 infectadas pelo DENV-2. As células foram infectadas com $TCID_{50} = 5 \times 10^9 / mL$ e a NS1 foi detectada nos sobrenadantes por ELISA, após períodos de incubação (24h-72h). Taxa NS1: foi calculada a razão entre a DO obtida no ELISA de NS1 das amostras e do “Cut-off” (valor médio das DOs das duplicações do calibrador do kit). Os valores foram representados conforme média e desvio padrão. n = 3 experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado.

Neste modelo, observamos que a produção de MIF pela linhagem de hepatócitos, ocorre de maneira gradual tanto na cultura controle quanto na infectada, porém nesta em maior proporção, sendo tal diferença estatisticamente, muito significativa; enquanto que na cultura exposta ao DENV-2 inativado, a produção é equivalente à infectada em 24h, no entanto, decaindo nas próximas 48h e 72h ficando abaixo do controle no último período verificado (FIGURA 12).

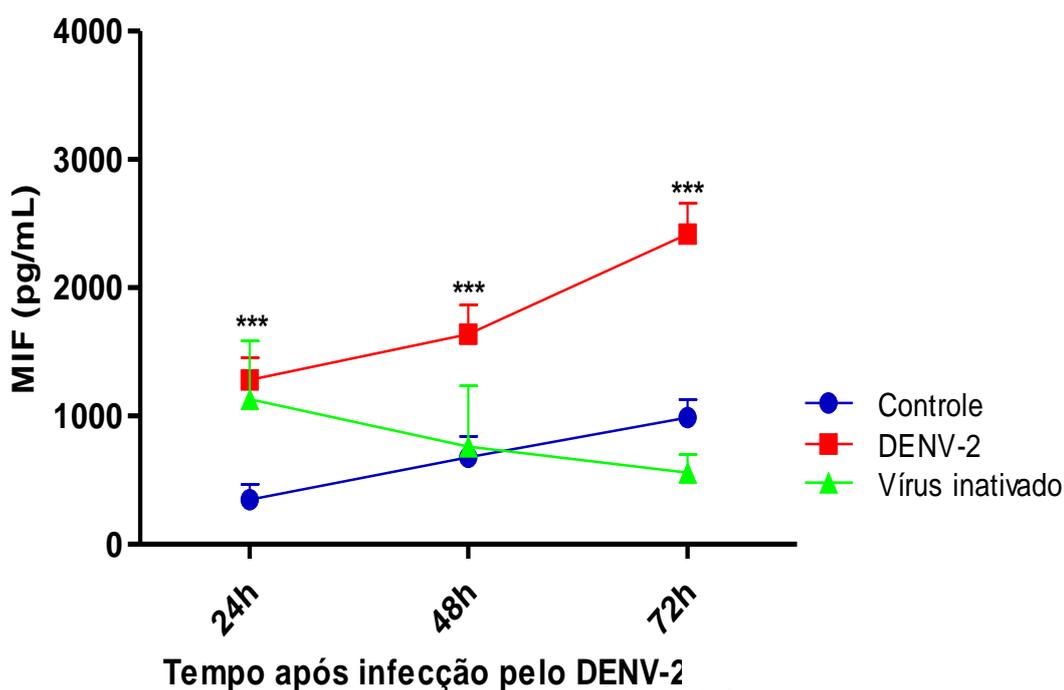


Figura 12: Detecção do mediador inflamatório MIF, no modelo de infecção de Huh-7 pelo DENV-2. As células foram infectadas com $TCID_{50} = 5 \times 10^9 / mL$ e o MIF foi detectado nos sobrenadantes por ELISA, após períodos de incubação (24h-72h). Os valores foram representados conforme média e erro. Para análise estatística, utilizou-se o teste-t múltiplo. Valor de *** $P < 0,001$. $n = 3$ experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado.

A IL-8 foi detectada no sobrenadante celular de células Huh-7 infectadas, sendo sua secreção aumentada no decorrer da infecção de forma mais expressiva que a cultura não infectada ou também exposta ao vírus inativado. Nos períodos de 48h e 72h, a secreção pela cultura infectada foi significativamente maior que a do controle (FIGURA 13).

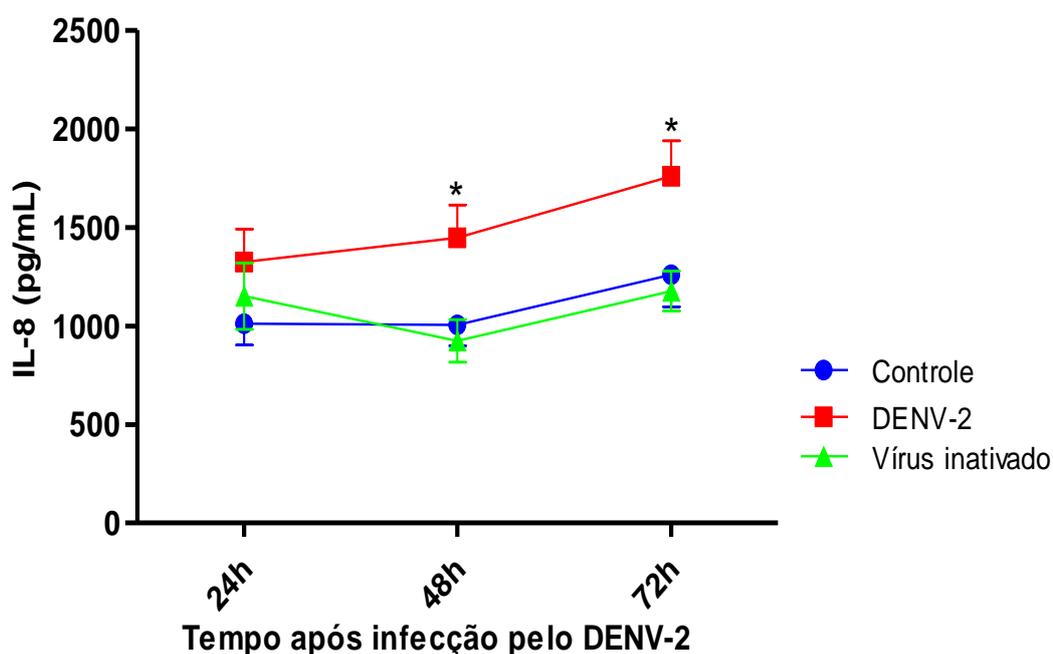


Figura 13: Detecção do mediador inflamatório IL-8, no modelo de infecção de Huh-7 pelo DENV-2. As células foram infectadas com $TCID_{50} = 5 \times 10^9 / \text{mL}$ e a IL-8 foi detectada nos sobrenadantes por ELISA, após períodos de incubação (24h-72h). Os valores foram representados conforme média e erro. Para análise estatística, utilizamos o teste-t múltiplo. Valor de $*P < 0,05$. $n = 3$ experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado.

A produção de IL-6 foi detectada nos sobrenadantes das culturas de Huh-7 infectadas, controle e expostas ao vírus inativado, de forma equivalente, em 24-48h. No entanto, em 72h, foi detectada em maior quantidade na linhagem hepática infectada pelo DENV-2 em comparação com as outras condições (FIGURA 14).

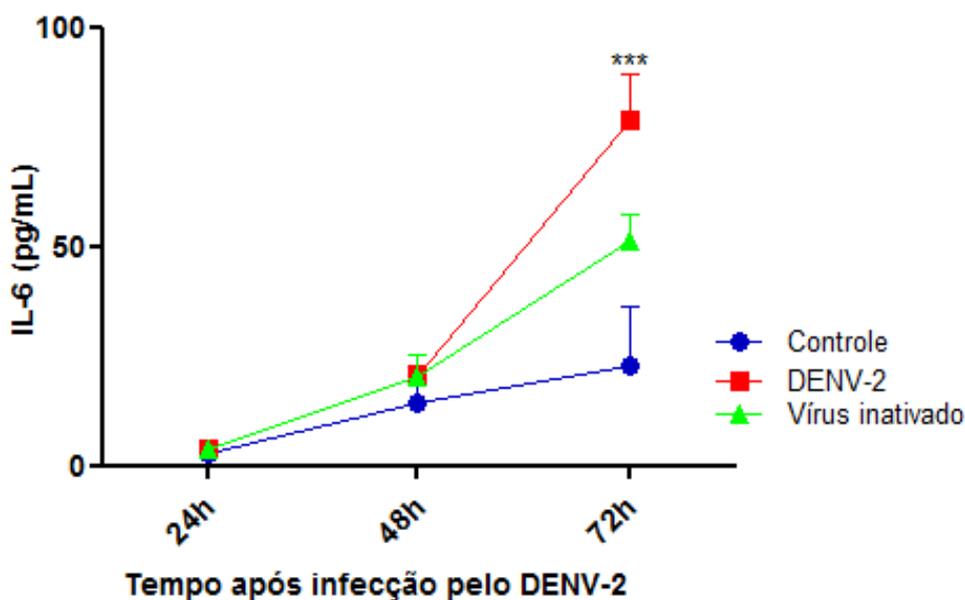


Figura 14: Detecção do mediador inflamatório IL-6, no modelo de infecção de Huh-7 pelo DENV-2. As células foram infectadas com $TCID_{50} = 5 \times 10^9 / mL$ e a IL-6 foi detectada nos sobrenadantes por ELISA, após períodos de incubação (24h-72h). Os valores foram representados conforme média e erro. Para análise estatística, utilizamos o *teste-t múltiplo*. Valor de $***P < 0,001$. n = 3 experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado.

Em nosso modelo, foi detectado o nitrito (NO_2^-) resultante da degradação do NO, como uma ferramenta para quantificar esse fator que é lábil. Observamos maior quantidade de NO_2^- nos sobrenadantes de Huh-7 infectadas no período de 48h em comparação com o controle sem infecção e à cultura exposta ao vírus inativado. Porém, houve decréscimo dessa produção nas 72h decorridas (FIGURA 15).

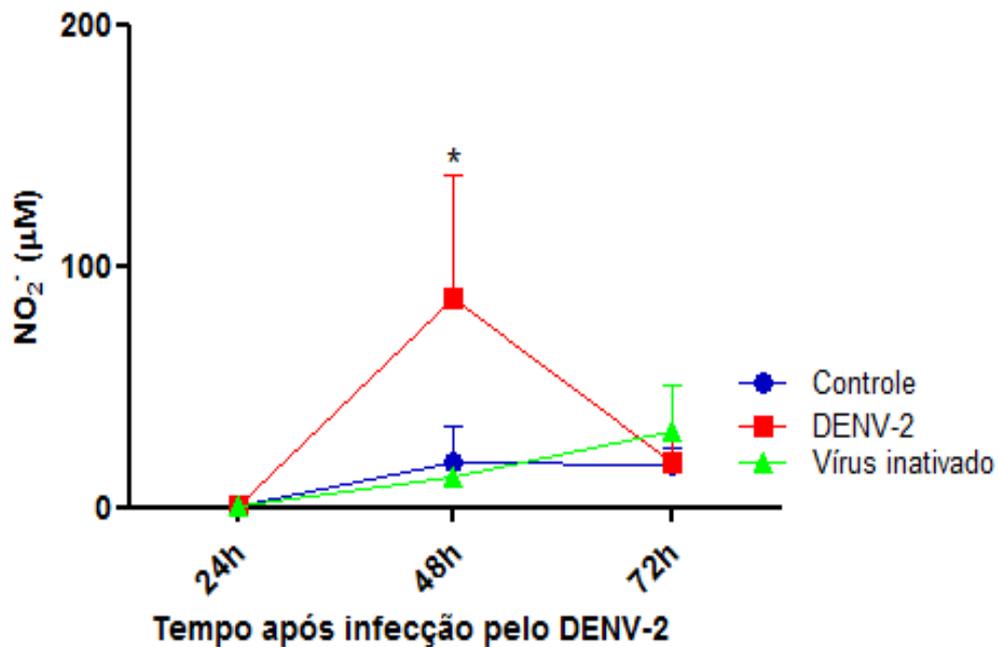


Figura 15: Produção do mediador NO através da detecção indireta de nitrito no modelo de infecção de Huh-7 pelo DENV-2. As células foram infectadas com $\text{TCID}_{50} = 5 \times 10^9/\text{mL}$ e o nitrito foi detectado nos sobrenadantes por Reação de Griess, após períodos de incubação (24h-72h). Os valores foram representados conforme média e erro. Para análise estatística, utilizamos o teste-t múltiplo. Valor de $*P < 0,05$. $n = 3$ experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado.

A detecção de antígenos virais NS1 no sobrenadante das células infectadas, bem como sua marcação, e produção de MIF, IL-8, IL-6 e NO_2^- se mostraram adequadas na utilização do modelo para avaliação de atividades antivirais e imunomodulatórias dos extratos que foram estudados aqui.

5.2. Efeitos citotóxicos dos tratamentos com os extratos UGC e UGF sobre a linhagem contínua de Huh-7, usando ensaio de viabilidade celular (MTT).

No tratamento com o extrato UGC, a concentração de 100µg/mL apresentou-se citotóxica em todos os períodos, enquanto que as demais mantiveram a cultura viável em até 72h, apresentando densidade óptica (DO) (ANEXO A) com taxas maiores que 90% da produção de Formazan de células não tratadas (FIGURA 16; ANEXO B). Em 96h, apenas as concentrações de 10 e 1µg/mL mantiveram a viabilidade.

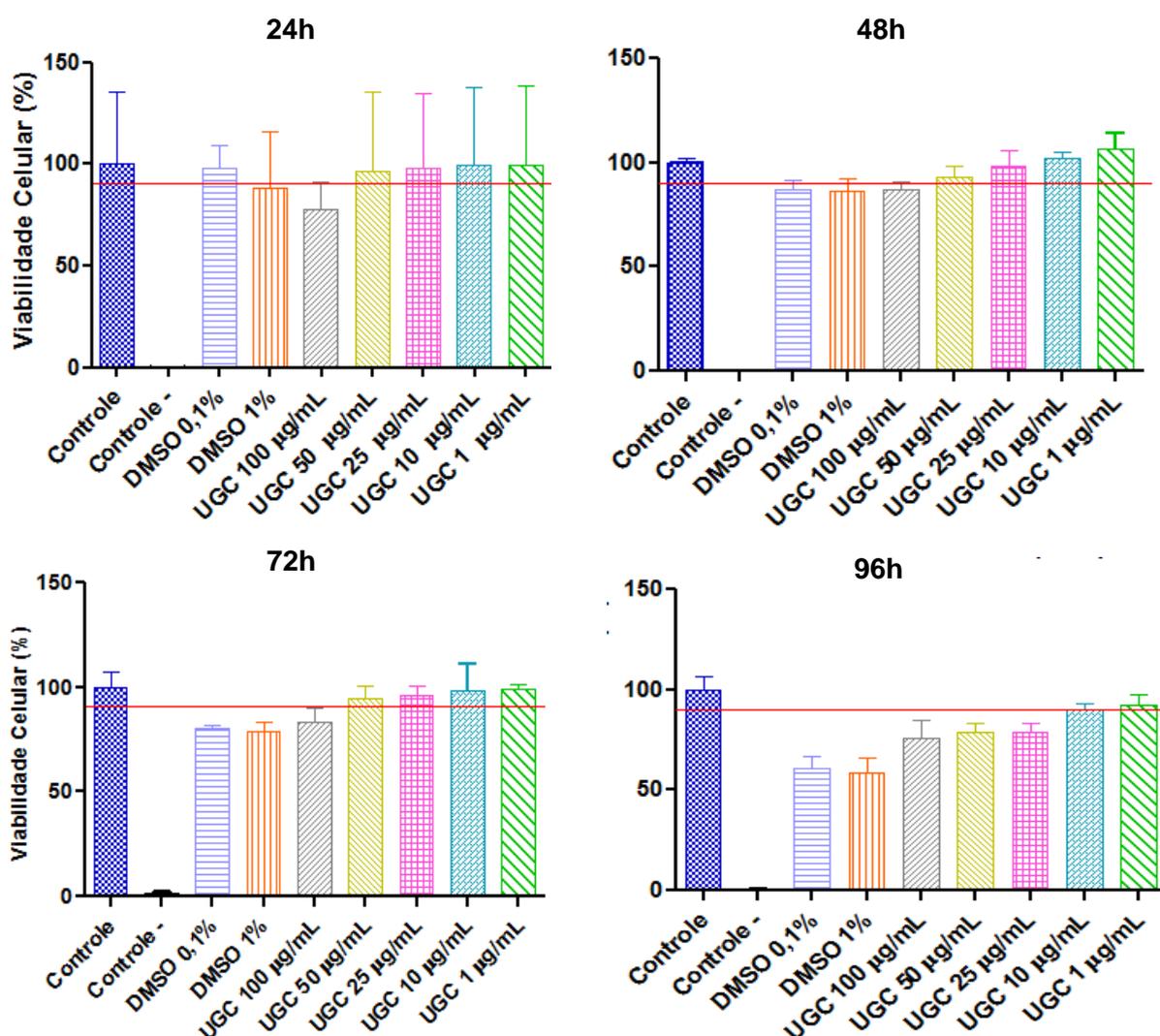


Figura 16: Viabilidade Celular (%) da linhagem de células Huh-7 tratadas com UGC (24h-96h), por MTT. Para cálculo da taxa foi usada a média normalizada das porcentagens dos poços controle (24h-96h, respectivamente). Linha horizontal vermelha indica 90% da produção de formazan. n = 4 experimentos independentes, com no mínimo 3 e no máximo 8 réplicas, por ponto analisado.

No tratamento com o extrato UGF, as concentrações de 100, 50 e 25µg/mL apresentaram-se citotóxicas em todos os períodos, enquanto que somente as de 10µg/mL e 1µg/mL mantiveram a cultura viável em até 72h, apresentando densidade óptica (DO) (ANEXO C) com taxas maiores que 90% da produção de Formazan de células não tratadas (FIGURA 17; ANEXO D). Em 96h, todas as concentrações diminuíram a viabilidade.

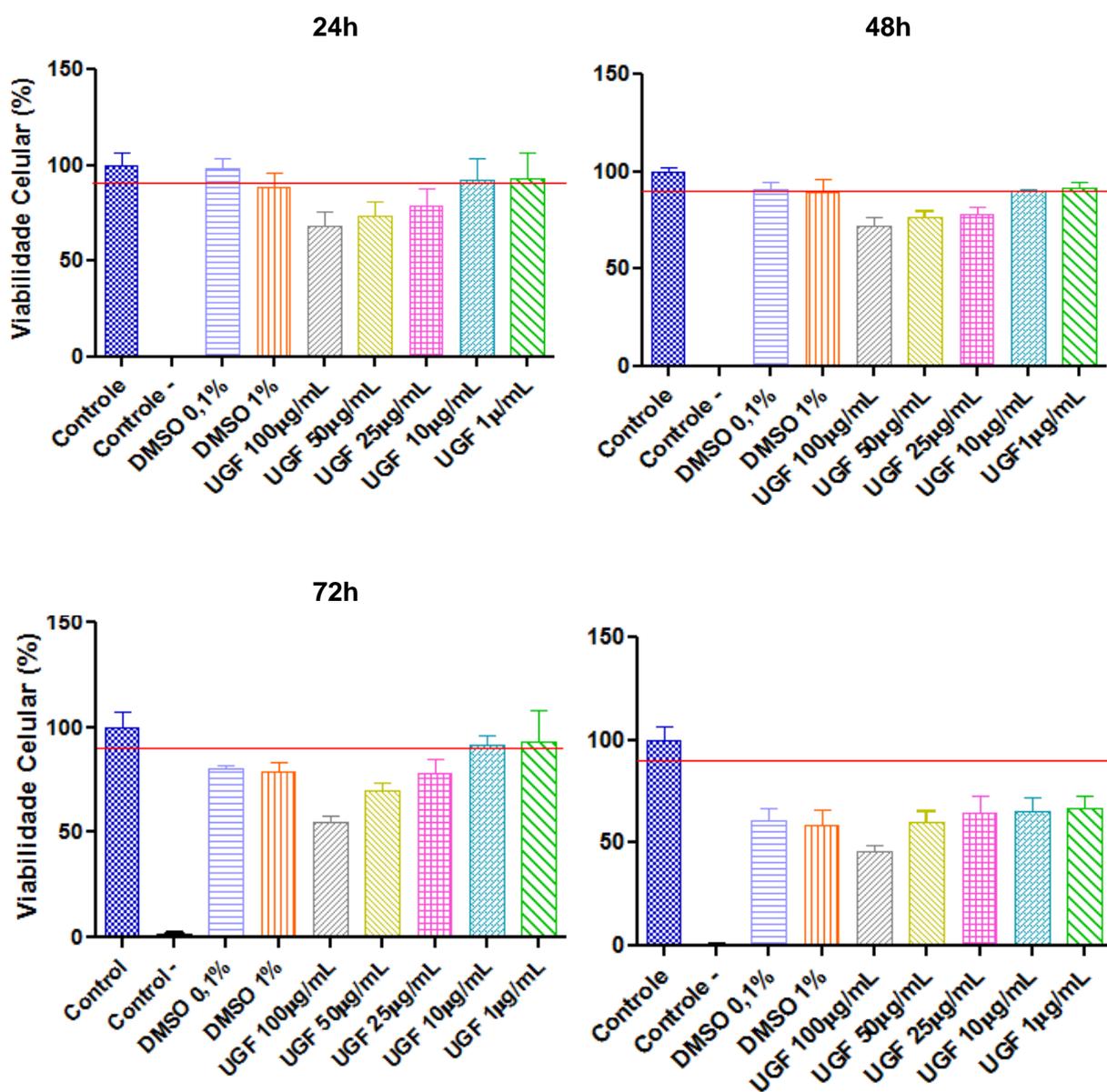


Figura 17: Viabilidade Celular (%) da linhagem de células Huh-7 tratadas com UGF (24h-96h), por MTT. Para cálculo da taxa foi usada a média normalizada das porcentagens dos poços controle (24h-96h, respectivamente). Linha horizontal vermelha indica 90% da produção de formazan. n = 4 experimentos independentes, com no mínimo 3 e no máximo 8 réplicas, por ponto analisado.

Realizados os ensaios para avaliação de uma possível citotoxicidade dos extratos, foram escolhidas as concentrações de 50, 25, 10, 5 e 1µg/mL de UGC; e, as concentrações de 10, 5, 1, 0,5 e 0,1µg/mL de UGF para dar continuidade ao estudo dos efeitos dos tratamentos durante a infecção das Huh-7. Como algumas concentrações não atingiram a média de viabilidade desejada (> 90%), as mesmas não foram mais utilizadas. Em seus lugares, adicionamos valores de concentrações que estão dentro da taxa de viabilidade almejada (>90%). Nesta próxima etapa, verificamos possíveis efeitos antiviral e imunomodulador das concentrações selecionadas, em até 72h de ensaio.

5.3. Avaliação da atividade antiviral dos extratos de UGC e UGF, determinado pela dosagem de NS1 secretada, em linhagem contínua de células Huh-7 infectadas por DENV-2.

Foi observado que em 48h, a concentração de 5µg/mL apresentou atividade antiviral pela redução da detecção da proteína não estrutural NS1 no sobrenadante das células infectadas e tratadas. Ainda, em 48h e 72h, as concentrações de 10 e 25µg/mL, demonstraram atividade com significância considerada *borderline*, respectivamente. A dexametasona usada com o intuito de ser um controle positivo da atividade, não apresentou resultado significativo (FIGURA 18).

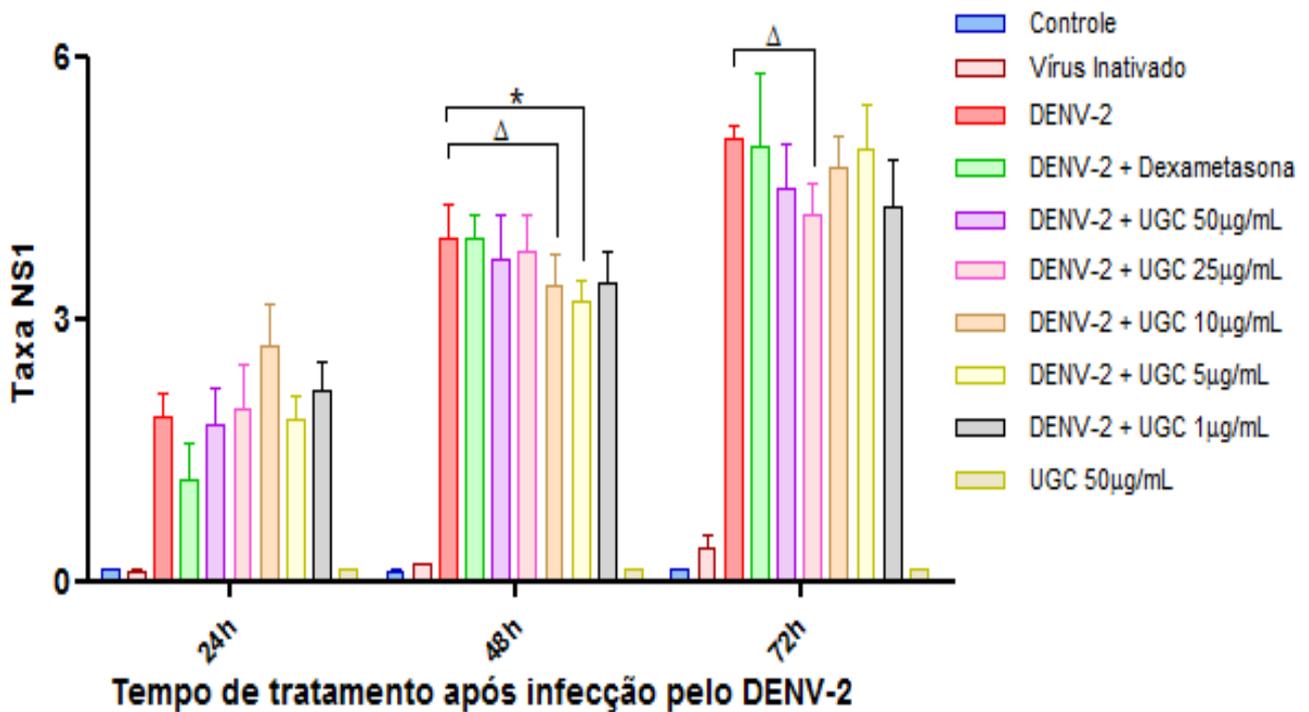


Figura 18: Detecção da proteína não estrutural NS1 após tratamento por UGC. Detecção de NS1 nos sobrenadantes de 24h, 48h e 72h após infecção com DENV-2 ($TCID_{50} = 5 \times 10^9 / mL$) e tratamento com UGC nas Huh-7. Para cálculo da taxa utilizou-se a razão entre a *DO* obtida no ELISA de NS1 poços e do *Cut -off* (valor médio das *DOs* das duplicações do calibrador do kit Plateia). Os valores foram representados conforme média e erro. Para análise estatística, utilizou-se o teste-*t múltiplo*. Valor de $*P < 0,05$ e $0,05 < \Delta < 0,07$. $n = 3$ experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado. Δ = atividade *borderline*.

Da mesma forma, foi utilizado o extrato das folhas de *Uncaria sp.* Nas primeiras 24h, a concentração de 5µg/mL apresentou atividade antiviral estatisticamente significativa para NS1, mas sem efeito significativo em 48h e 72h mostrando apenas uma tendência em algumas concentrações. Da mesma maneira, a dexametasona não apresentou atividade significativa (FIGURA 19).

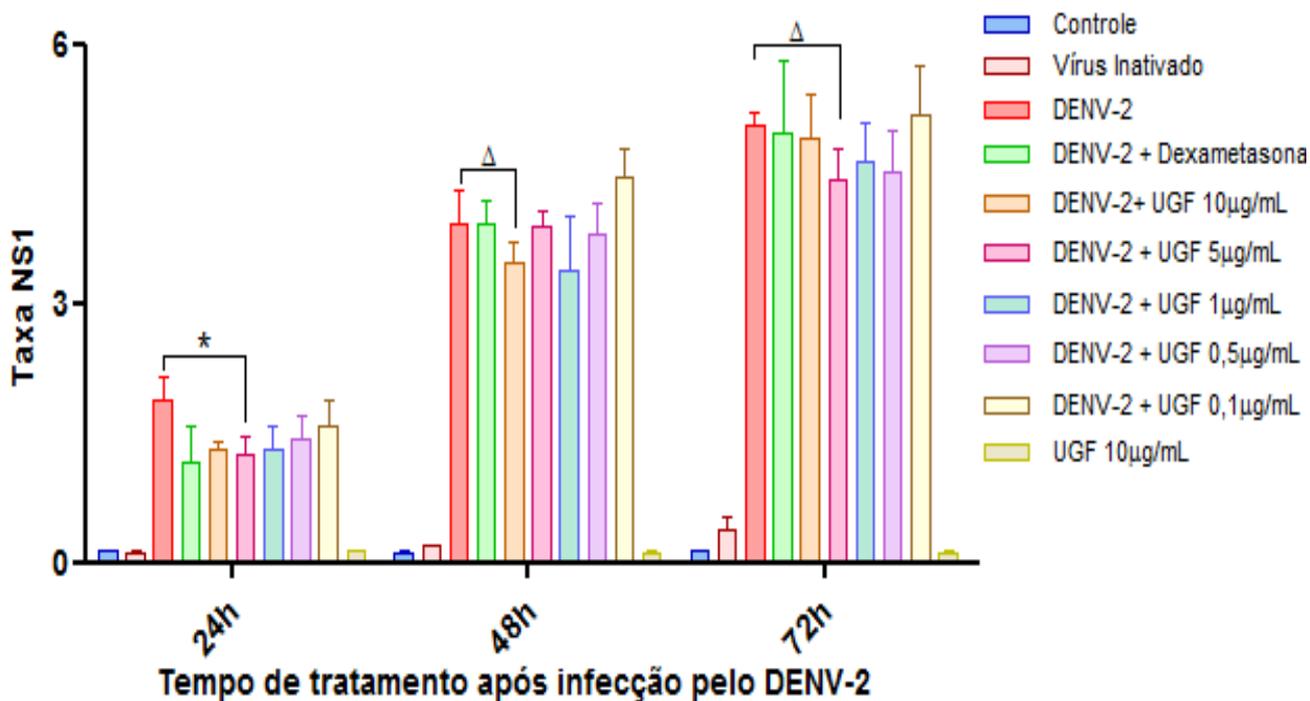


Figura 19: Detecção da proteína não estrutural NS1 após tratamento por UGF. Detecção de NS1 nos sobrenadantes de 24h, 48h e 72h após infecção com DENV-2 ($TCID_{50} = 5 \times 10^9 / mL$) e tratamento com UGF nas Huh-7. Para cálculo da taxa utilizou-se a razão entre a *DO* obtida no ELISA de NS1 poços e do *Cut-off* (valor médio das *DOs* das duplicações do calibrador do kit Plateia). Por meio do teste-*t* múltiplo, foi determinada diferença significativa com valor $*P < 0,05$ e $0,05 < \Delta < 0,07$. $n = 3$ experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro. Δ = atividade *borderline*.

5.3.1. Efeitos dos extratos UGC / UGF na detecção de antígenos virais intracelulares, em linhagem contínua de células Huh-7 infectadas por DENV-2.

Determinado o efeito antiviral pela detecção de NS1 nos sobrenadantes de células Huh-7 infectadas ($TCID_{50} = 5 \times 10^9 / \text{mL}$) e tratadas com UGC / UGF, buscou-se compará-lo com a detecção do Ag viral das células em cultura. Foi detectado efeito antiviral pela redução das porcentagens de células positivas para o Ag DENV, apenas em 72h, sendo de forma significativa para 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e muito significativa para 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; além de uma tendência de diminuição das taxas nas concentrações de 25 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Também neste ensaio, a dexametasona não apresentou efeito significativo (FIGURA 20).

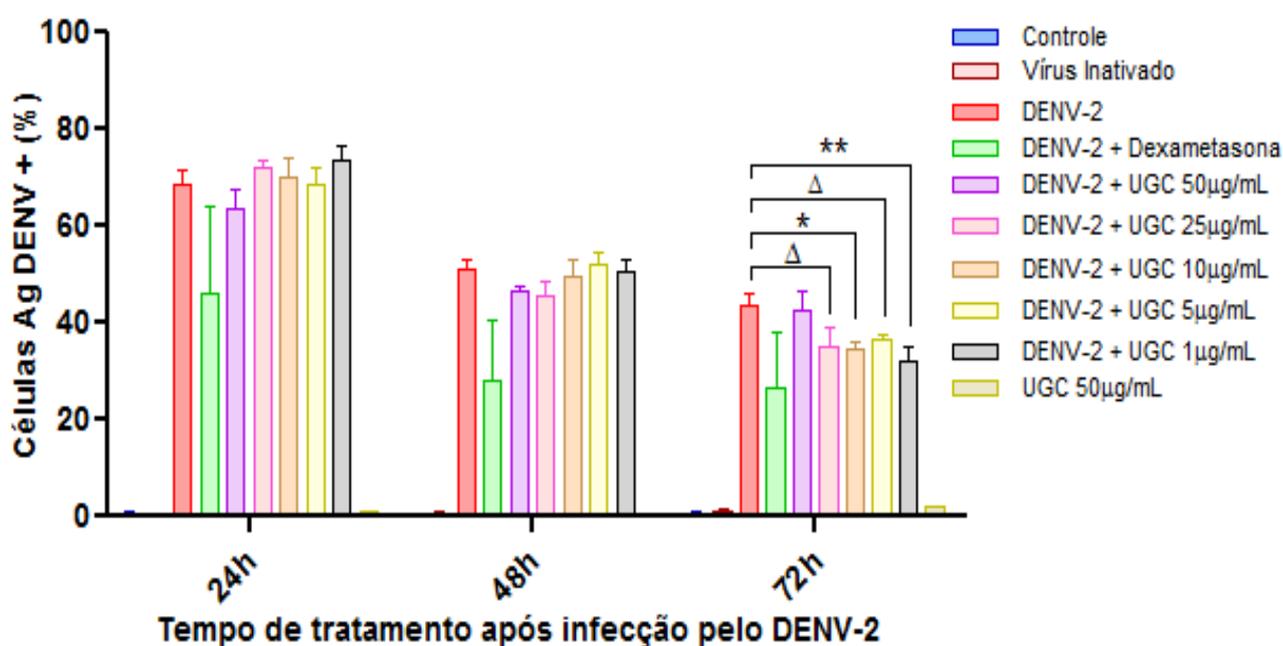


Figura 20: Detecção de antígenos virais intracelulares em células da linhagem Huh-7 infectadas por DENV-2 e tratadas com UGC. Detecção por imunofluorescência intracelular e análise por citometria de fluxo. Aplicando o teste-t múltiplo, Valor $*P < 0,05$ e Valor $**P < 0,01$ e $0,05 < \Delta < 0,07$. $n = 3$ experimentos independentes, com no mínimo 2 e no máximo 4 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro. Δ = atividade *borderline*.

Fazendo uso da marcação por imunofluorescência e análise por citometria de fluxo das células infectadas em cultura e tratadas com diferentes concentrações de UGF, o efeito antiviral foi detectado também, em apenas 72h. Esta ação apresentou-se de forma bastante significativa para 10µg/mL e, mais ainda, para as demais concentrações (FIGURA 21). Em 24h e 48h, o tratamento com Dexametasona apresentou diminuição das taxas de infecção de forma significativa.

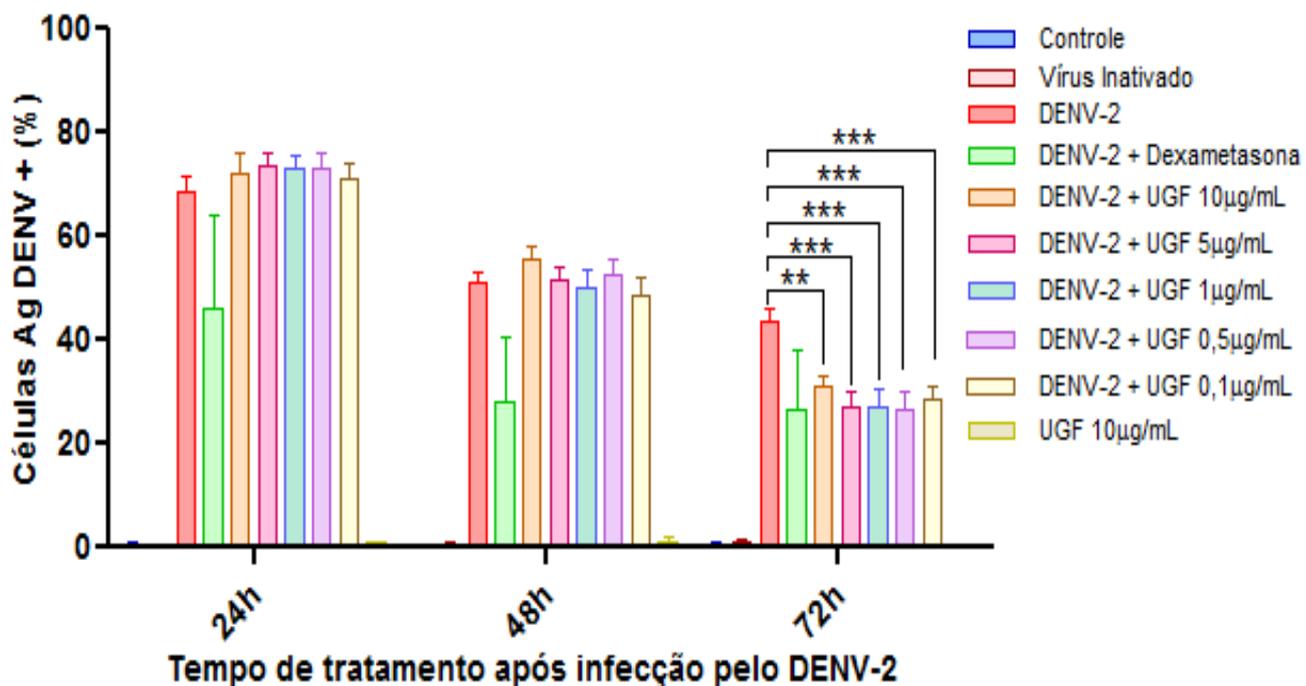


Figura 21: Detecção de antígenos virais intracelulares em células da linhagem Huh-7 infectadas por DENV-2 e tratadas com UGF. Detecção por imunofluorescência intracelular e análise por citometria de fluxo. Aplicando o teste-t múltiplo, Valor $**P < 0,01$ e Valor $***P < 0,001$. n = 3 experimentos independentes, com no mínimo 2 e no máximo 4 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro.

5.4. Avaliação do efeito imunomodulador dos extratos de UGC e UGF.

5.4.1. Produção de MIF nos sobrenadantes das culturas de Huh-7 infectadas por DENV-2 e tratadas com UGC.

Observou-se que, a detecção do fator MIF na linhagem hepática decresceu significativamente com a concentração de 50µg/mL em 24h, bem como de forma bastante significativa em 48h e, tendência em 72h. Além desta, a concentração de 25µg/mL obteve efeito imunomodulatório significativo em 48h e 72h (FIGURA 22).

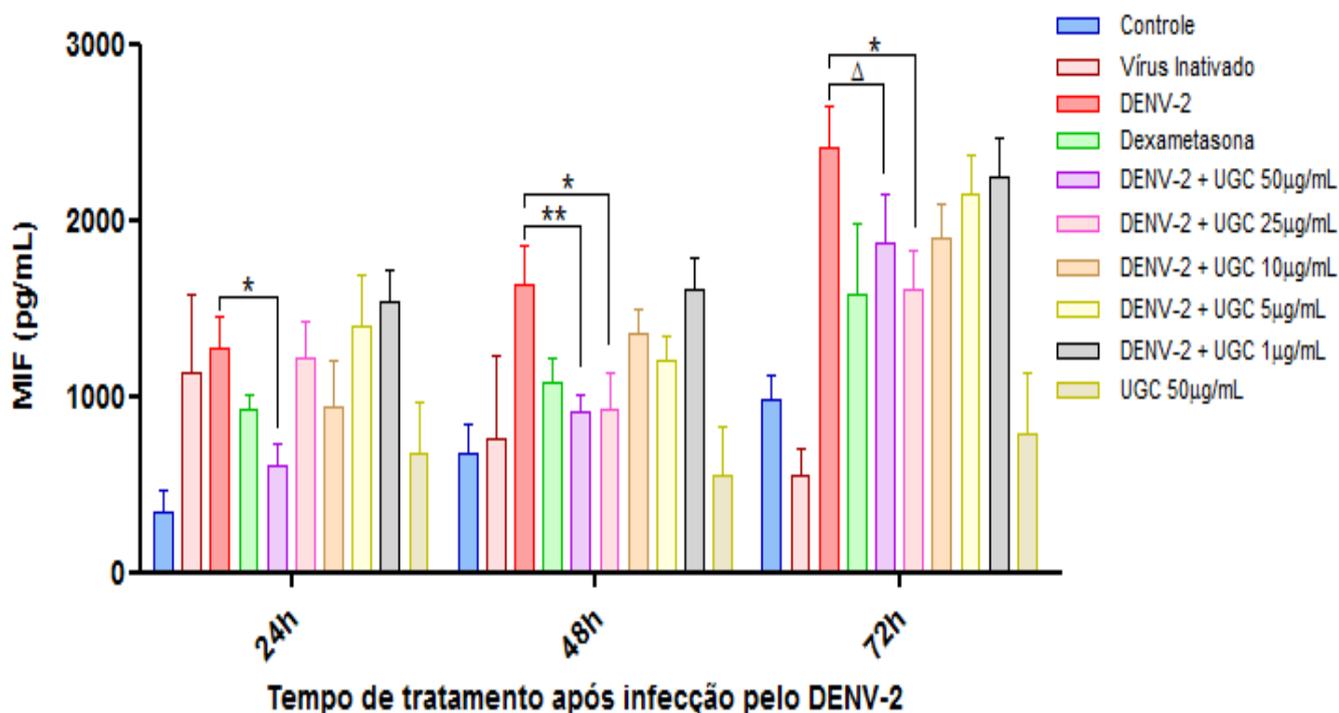


Figura 22: Produção de MIF em sobrenadantes de células Huh-7 infectadas com DENV-2 e tratadas com UGC. Foi detectada por ELISA e, após aplicação do *Teste-t múltiplo*, Valor $*P < 0,05$, Valor $**P < 0,01$ e $0,05 < \Delta < 0,07$. $n = 3$ experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro. $\Delta =$ atividade *borderline*.

Com relação ao efeito imunomodulador das concentrações de UGF, este apresentou-se como tendências em 24h-48h com 0,5µg/mL e, em 72h com 1µg/mL e 0,1µg/mL (FIGURA 23). A dexametasona apresentou efeito inibitório do MIF em 72h, de forma significativa.

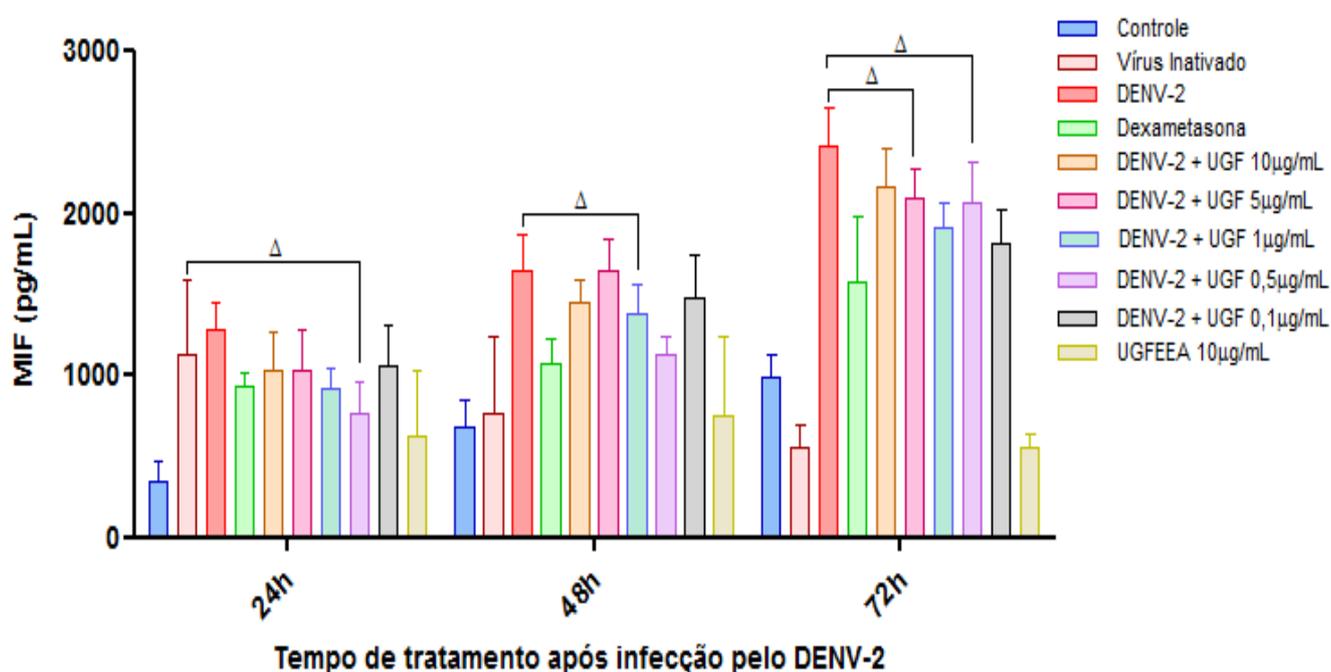


Figura 23: Produção de MIF em sobrenadantes de células Huh-7 infectadas com DENV-2 e tratadas com UGF. Foi detectada por ELISA e, após aplicação do *Teste-t múltiplo*, Valor de P $0,05 < \Delta < 0,07$. $n = 3$ experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro. Δ = atividade *borderline*.

Com a execução da primeira parte deste estudo, selecionamos as concentrações dos compostos UGC e UGF que apresentaram melhores efeitos antiviral e imunomodulador, conjuntamente, para que, assim, pudéssemos identificar outros efeitos de *Uncaria sp.* As concentrações selecionadas foram:

- ✓ **UGC:** 25, 10 e 5µg/mL;
- ✓ **UGF:** 5, 1 e 0,5µg/mL.

5.5. Avaliação da viabilidade das células Huh-7 infectadas com DENV-2 e os efeitos dos extratos nessa viabilidade (uso do kit Live/Dead)

Em 24h e 48h, não houve alterações significativas tanto na viabilidade das células Huh-7 submetidas às variadas condições quanto na atividade antiviral do extrato, nas células *vivas*. Todavia, em 72h, pode-se detectar redução significativa na taxa de viabilidade celular da cultura infectada sem tratamento (DENV-2) com relação às células controle sem infecção (CC). Além disso, no que tange à marcação do antígeno viral, foi observada atividade antiviral significativa das concentrações 10µg/mL e 5µg/mL sem alteração da viabilidade da linhagem e, bastante significativa nas células infectadas tratadas com o doador de NO (SNAP). Considerando as células *mortas*, apenas em 72h, houve aumento significativo da cultura DENV-2 com relação ao CC (FIGURA 24).

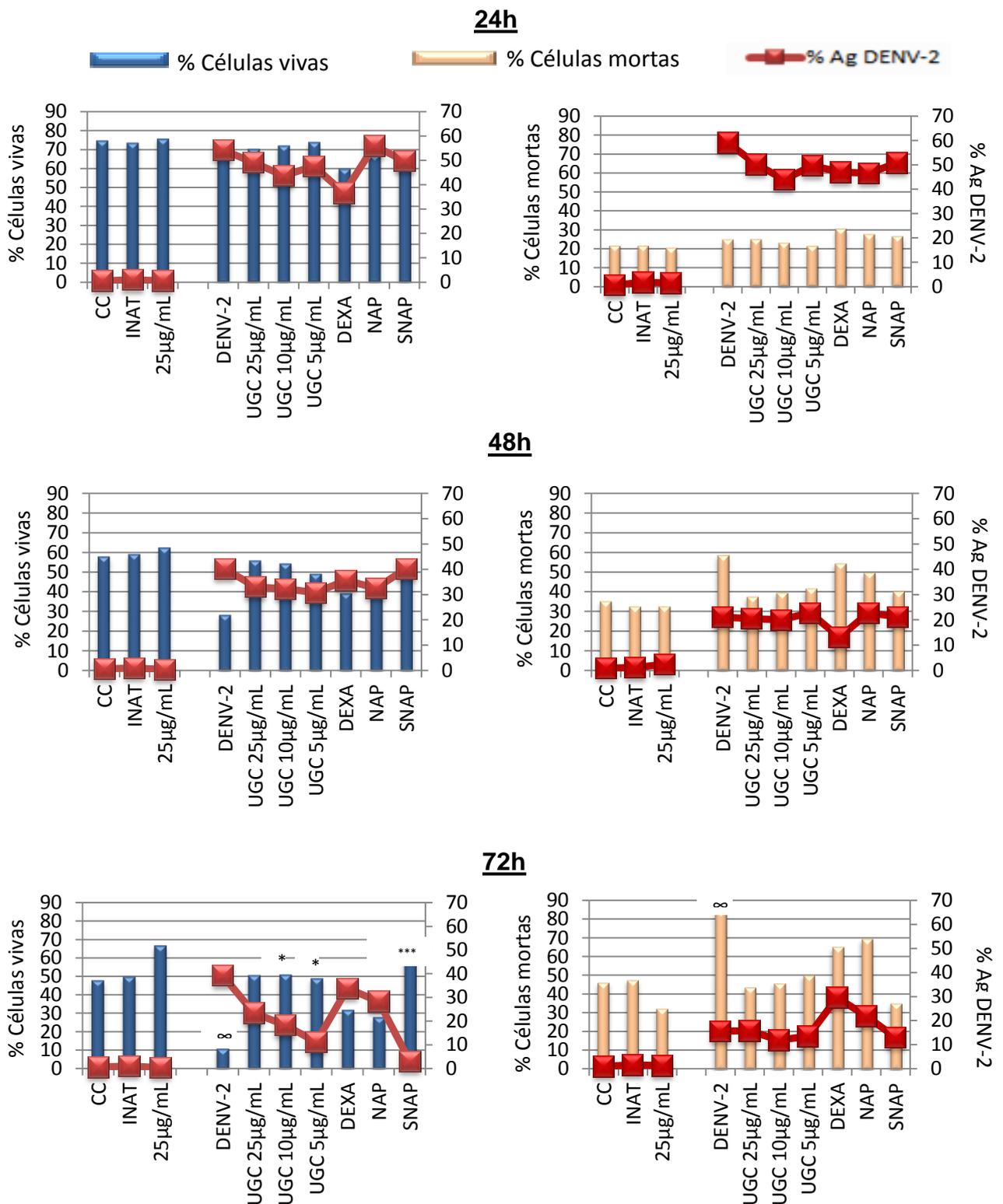


Figura 24: Determinação da viabilidade de células Huh-7 infectadas e tratadas por UGC com kit LIVE/DEAD e detecção do Ag DENV intracelular (24h-72h). Viabilidade celular ($Valor \infty P < 0,05$) com relação ao controle, e, atividade antiviral ($Valor *P < 0,05$ ou $Valor ***P < 0,001$) com relação ao DENV-2. Para análise estatística aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pares. $n = 6$ experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 5 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme as médias.

Da mesma maneira que as concentrações de UGC, nos períodos de 24h e 48h, não houve alterações significativas tanto na viabilidade das células Huh-7 submetidas às variadas condições quanto na atividade antiviral do extrato UGF, nas células *vivas*. No entanto, também em 72h, pode-se detectar redução significativa na taxa de viabilidade celular da cultura infectada sem tratamento (DENV-2) com relação às células controle sem infecção (CC). Com relação ao Ag viral, foi observada atividade antiviral significativa na concentração 0,5µg/mL e muito significativa na de 1µg/mL, bem como nas células infectadas tratadas com o doador de NO (SNAP) (FIGURA 25). Não foi observada diferenças significativas nos poços tratados com dexametasona.

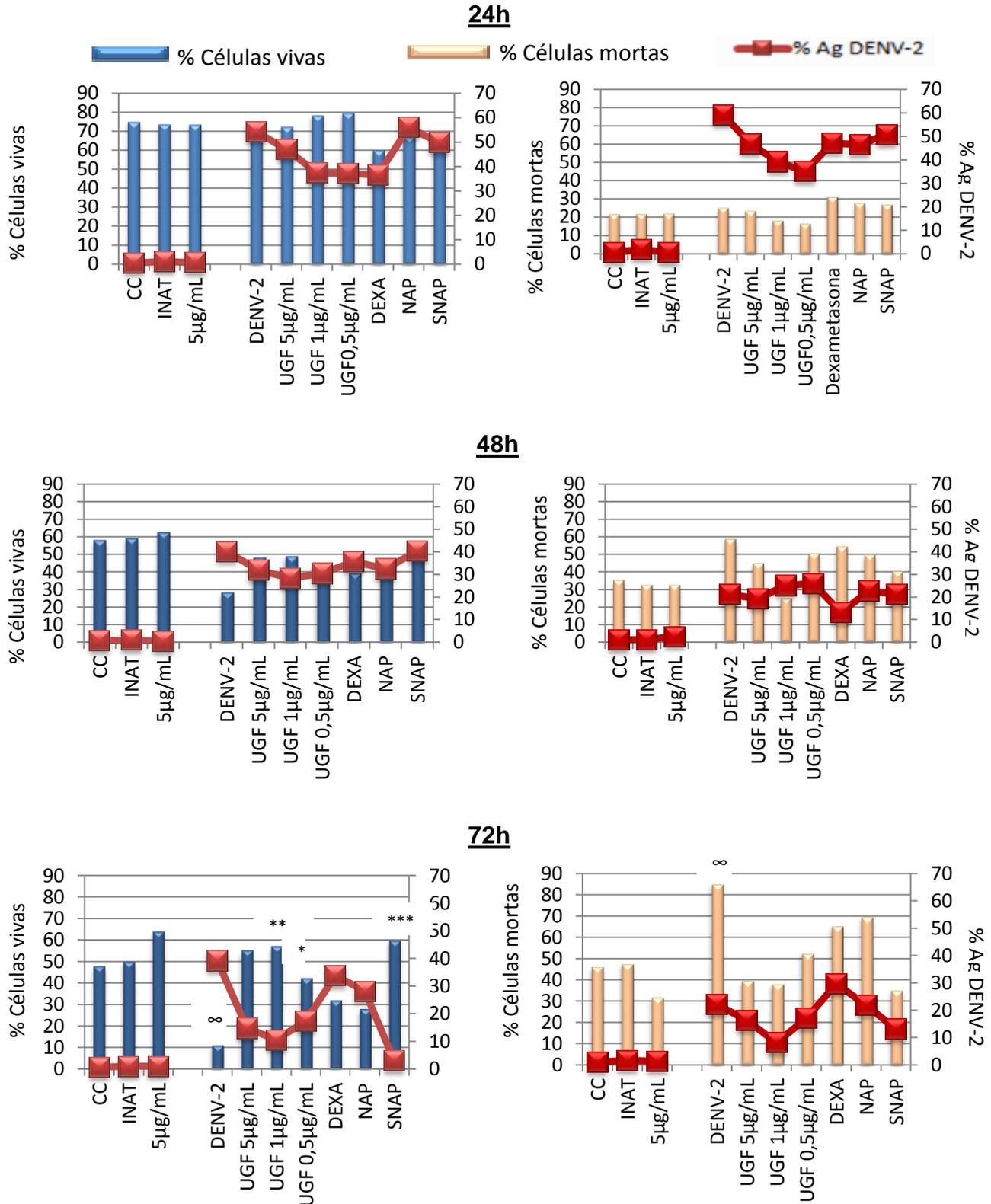


Figura 25: Determinação da viabilidade de células Huh-7 infectadas e tratadas por UGF com kit LIVE/DEAD e detecção do Ag DENV intracelular (24h-72h). Viabilidade celular ($Valor \propto P < 0,05$) com relação ao controle, e, atividade antiviral ($Valor *P < 0,05$ ou $Valor ***P < 0,001$) com relação ao DENV-2. Para análise estatística aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pares. $n = 6$ experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 5 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme as médias.

5.6. Avaliação da apoptose e da viabilidade de células Huh-7 infectadas por DENV e a associação com os efeitos dos extratos (marcação por Anexina V e iodeto de propídio)

Em 24h, não houve mudanças detectáveis nos parâmetros avaliados: viabilidade, apoptose e necrose total, conforme análise por citometria de fluxo. No período de 48h, ocorreu decréscimo muito significativo na *necrose total* da cultura de Huh-7 tratada com 25µg/mL de UGC em comparação com DENV-2. Já em 72h, observou-se uma diminuição significativa na *apoptose* de células tratadas com 5µg/mL e, bastante significativa nas com o doador de NO (SNAP) com relação à cultura DENV-2 (FIGURA 26). Poços controle (ANEXOS E e F).

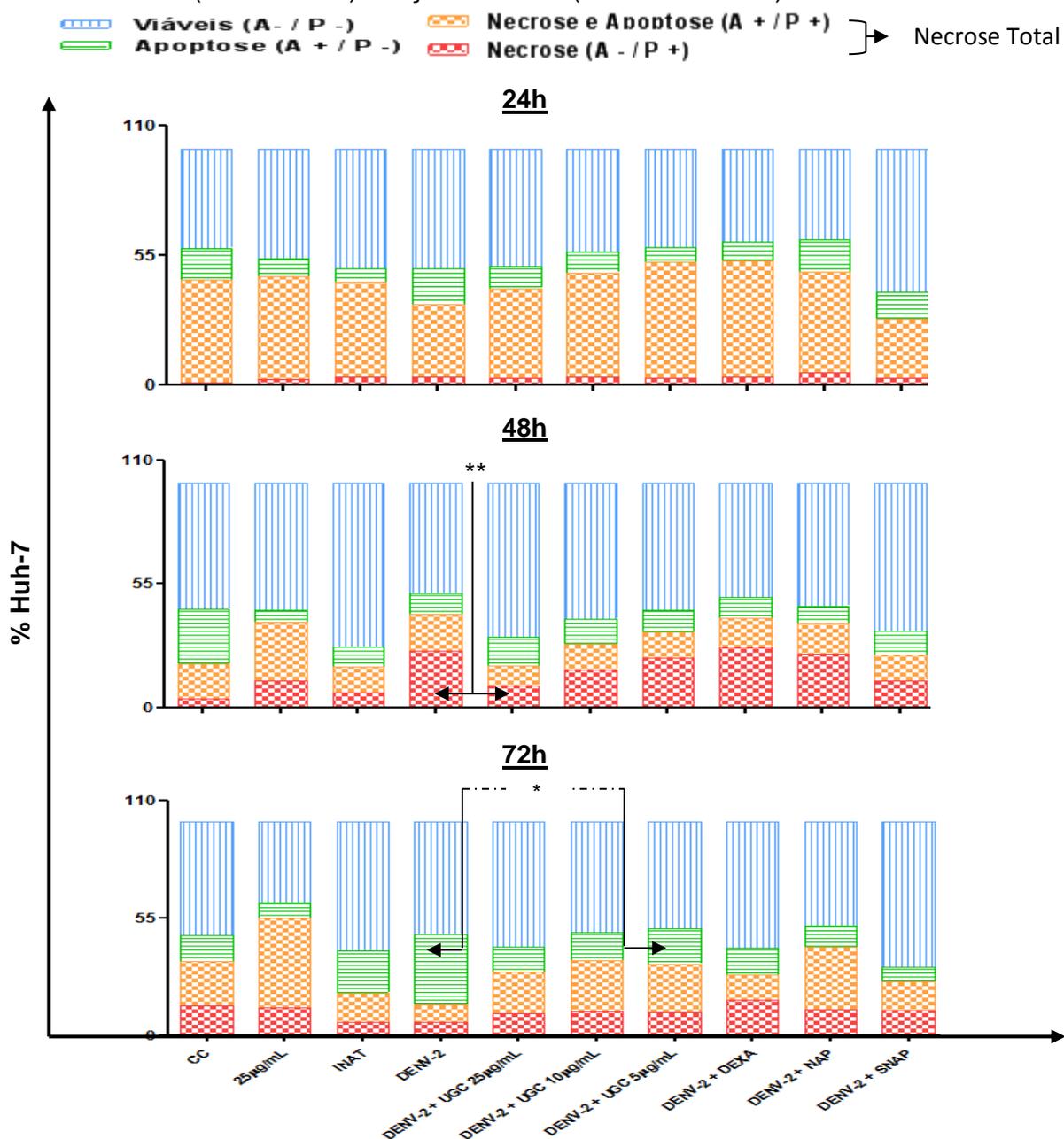


Figura 26: Apoptose e necrose nas células Huh-7 infectadas pelo DENV-2 e efeito do tratamento por UGC determinados por Anexina V e PI. Para análise estatística aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pares, onde Valor * $P < 0,05$ e Valor ** $P < 0,01$. n = 3 experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado.

Apenas em 24h foi detectada diminuição significativa da taxa de *apoptose* em Huh-7 tratada com 1µg/mL com relação à DENV-2 em UGF (FIGURA 27). Tanto em um extrato quanto no outro, não houveram alterações significativas com o tratamento de Dexametasona.

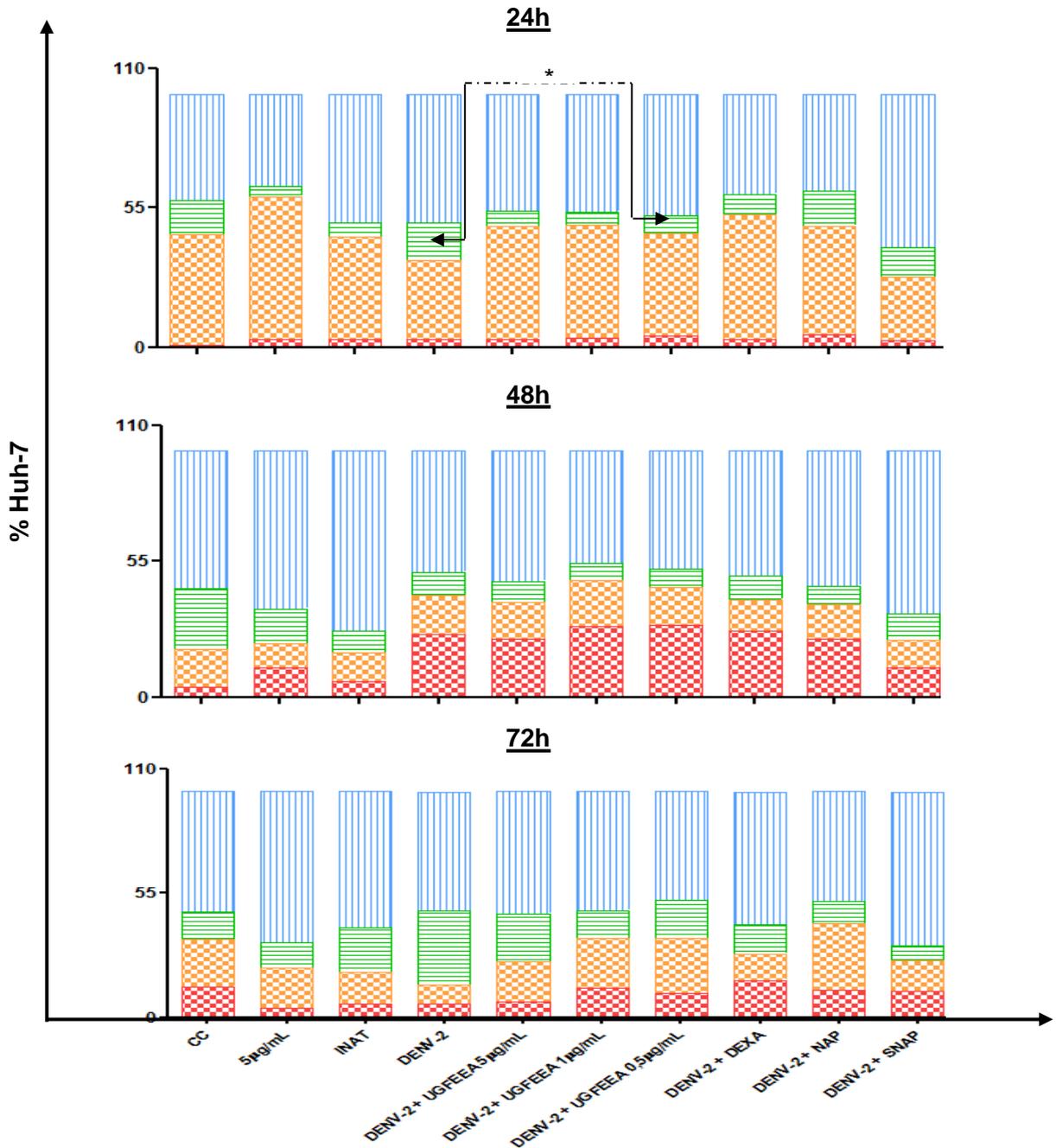


Figura 27: Apoptose e necrose nas células Huh-7 infectadas pelo DENV-2 e efeito do tratamento por UGF determinados por Anexina V e PI. Para análise estatística aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pares, onde *Valor *P* < 0,05. n = 3 experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado.

5.7. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) na linhagem celular Huh-7 infectada e tratada, por UGC e UGF

Em 48h, foi determinado aumento significativo de NO_2^- nos sobrenadantes de células infectadas com relação ao controle sem infecção. No mesmo ponto, observou-se aumento maior ainda e significativo, da detecção de nitrito nos sobrenadantes de cultura infectada e tratada com 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de UGC (FIGURA 28), porém com relação às Huh-7 infectadas (DENV-2). Controles em ANEXO G.

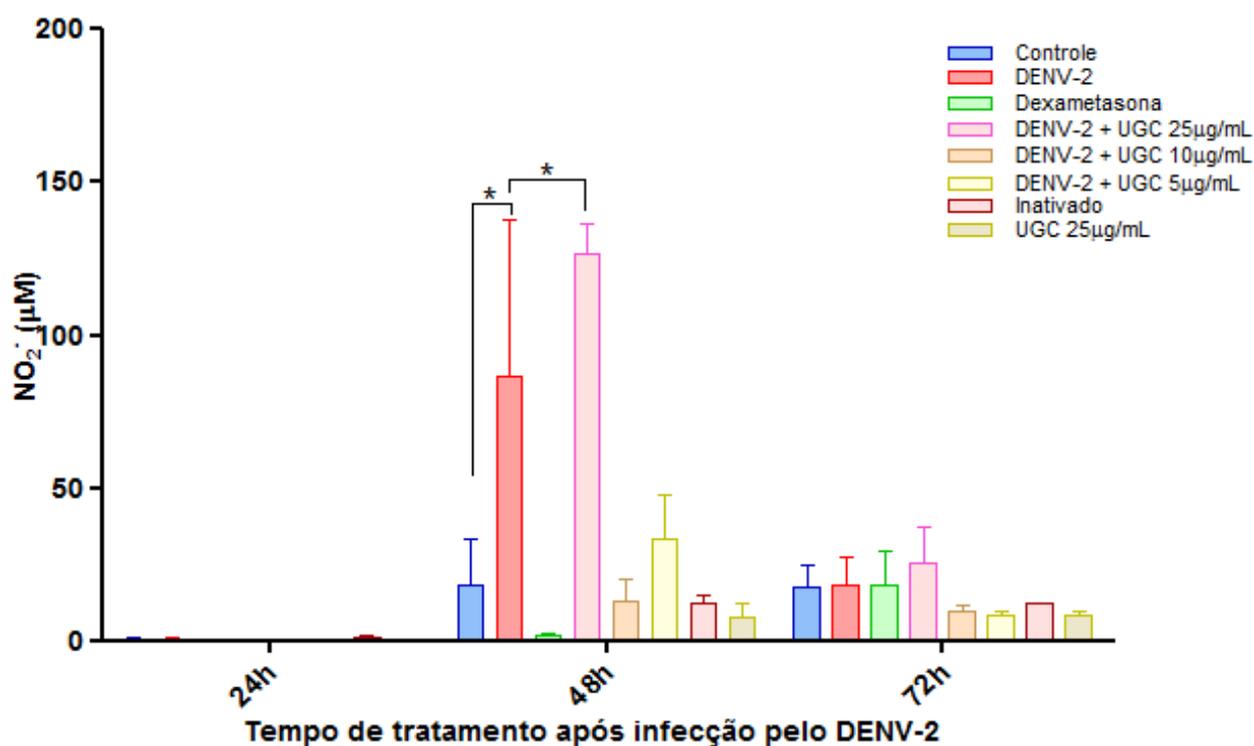


Figura 28: Detecção de nitrito nos sobrenadantes de células Huh-7 infectadas com DENV-2 e tratadas com UGC (24h-72h). Para análise estatística aplicou-se o teste-t múltiplo, onde Valor $*P < 0,05$. Foram realizados 3 experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro.

Foram utilizadas as concentrações de 5,1 e 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato das folhas de *Uncaria sp.* Da mesma maneira, foi detectado aumento significativo na quantidade de nitrito produzido pelas células infectadas com relação ao controle sem infecção, em 48h. No caso dos tratamentos com UGF, também em 48h, verificou-se elevação significativa de NO_2^- nas culturas infectadas e tratadas com as três concentrações do extrato, com relação ao DENV-2 (FIGURA 29). Desta maneira, os dois extratos foram capazes de aumentar, significativamente, a produção de NO – o que não foi observado com a Dexametasona.

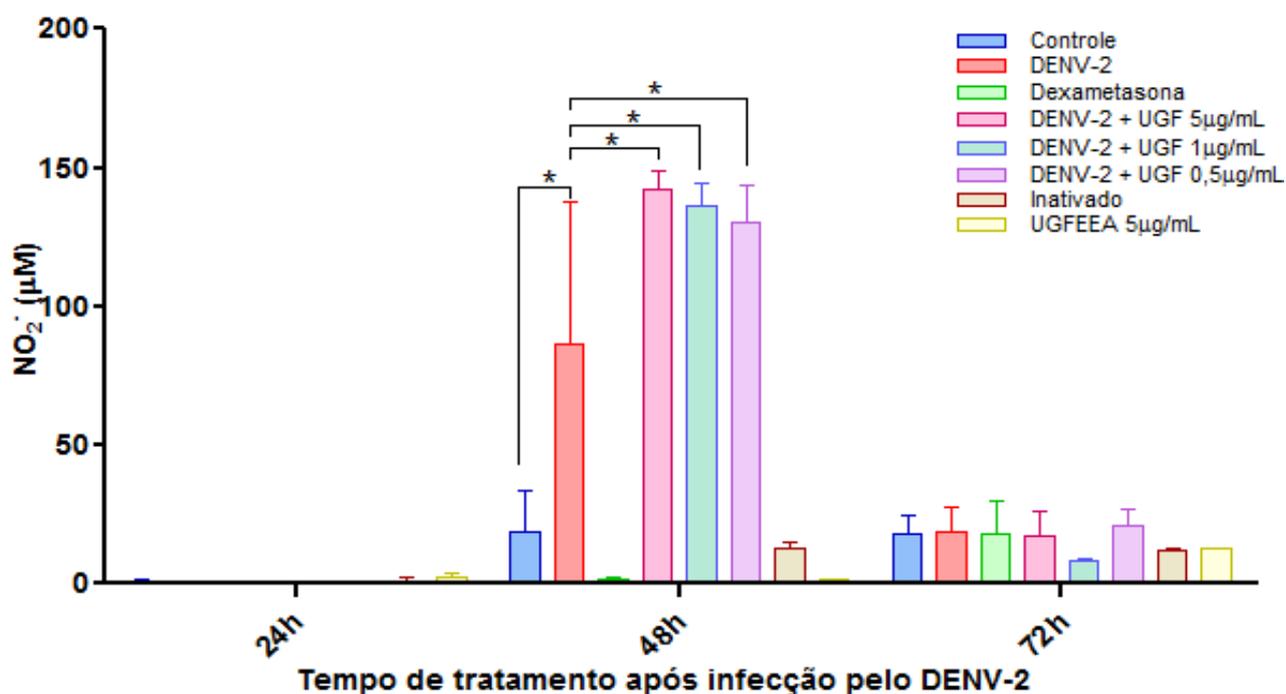


Figura 29: Detecção de nitrito nos sobrenadantes de células Huh-7 infectadas com DENV-2 e tratadas com UGF (24h-72h). Para análise estatística aplicou-se o teste-*t* múltiplo, onde Valor $*P < 0,05$. Foram realizados 3 experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro.

5.8. Relação entre NS1, apoptose, necrose e produção de óxido nítrico, no modelo de Huh-7 infectada por DENV-2.

Células Huh-7 infectadas com DENV-2 e tratadas com os extratos UGC e UGF, foram avaliadas quanto à indução de apoptose, necrose ou a produção de óxido nítrico como já descrito nos itens 5.6. e 5.7. Com o intuito de avaliar uma possível associação entre a modulação desses parâmetros e a produção da proteína NS1 do DENV secretada pela cultura, esta foi determinada nos mesmos sobrenadantes. A dosagem da proteína NS1 foi detectada nas culturas com DENV-2 demonstrando que as células estavam infectadas. No entanto, não foi possível determinar diferenças significativas entre as células infectadas tratadas e não tratadas. A associação direta com os parâmetros em questão, não pôde assim, ser observada (FIGURAS 30 e 31). Em ANEXO H, as médias das taxas de NS1.

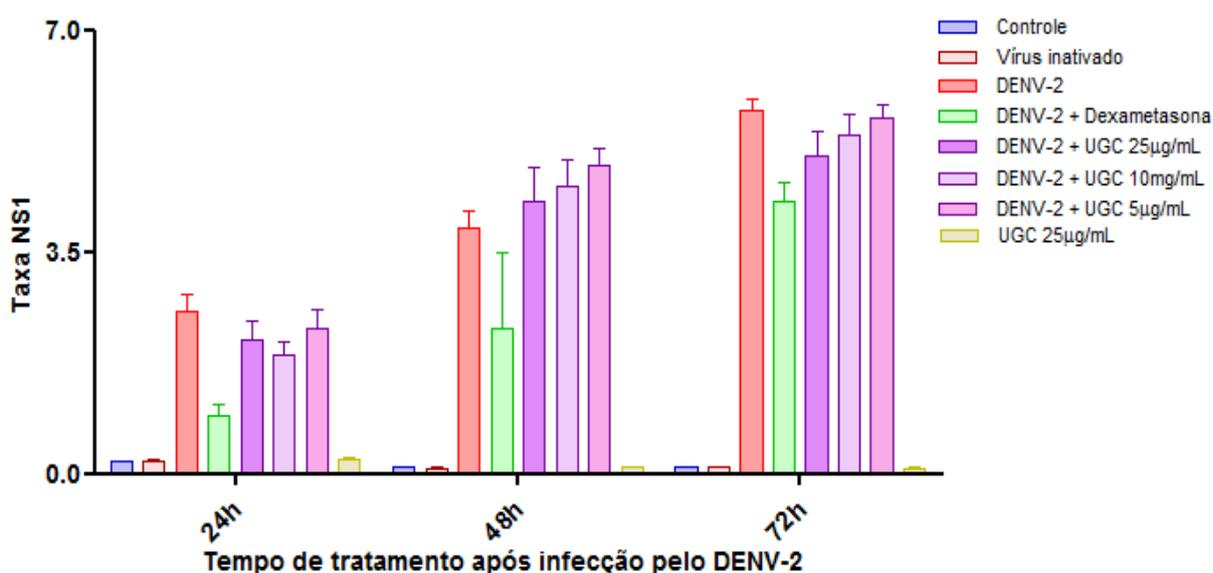


Figura 30: Detecção da proteína viral não estrutural NS1 em células Huh-7 tratadas com UGC. Para cálculo da taxa utilizou-se a razão entre a *DO* obtida no ELISA de NS1 poços e o *Cut-off* (valor médio das *DOs* das duplicações do calibrador do kit). Foi aplicado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pare. $n = 3$ experimentos independentes, com no mínimo 2 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro.

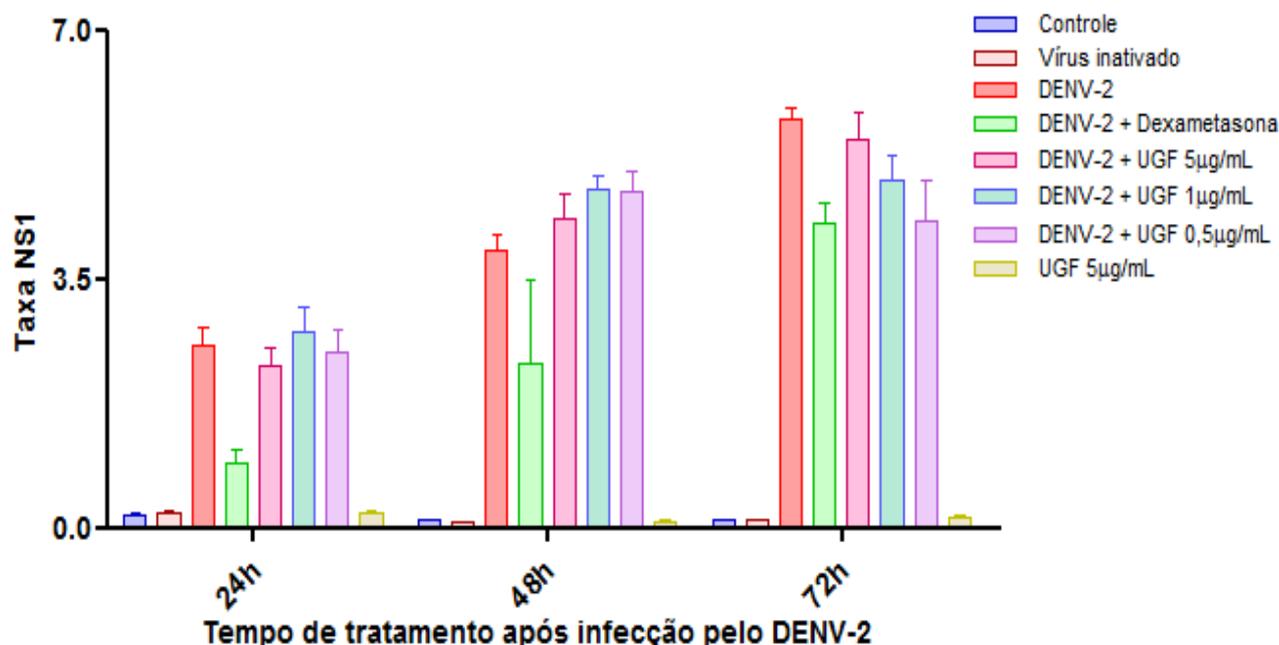


Figura 31: Detecção da proteína viral não estrutural NS1 em células Huh-7 tratadas com UGF. Para cálculo da taxa utilizou-se a razão entre a *DO* obtida no ELISA de NS1 poços e o *Cut-off* (valor médio das *DOs* das duplicações do calibrador do kit). Foi aplicado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pares. $n = 3$ experimentos independentes, com no mínimo 2 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro.

Entretanto, UGC foi capaz de modular NS1 (FIGURA 18), em 48h, na concentração de 5µg/mL (*valor *P*<0,05) e o Ag viral intracelular, em 72h, com 10 e 1µg/mL (FIGURA 20). Também em 48h, foi possível observar a diminuição da necrose (25µg/mL) e, em 72h (5µg/mL), como já descrito no item 5.6. Em 48h, a produção de NO está aumentada (25µg/mL), em relação à cultura infectada não tratada (item 5.7. FIGURA 28).

O extrato UGF foi capaz de modular a NS1 (Fig 19), em 24h, na concentração de 5µg/mL (*valor *P*<0,05) e, em 72h, o Ag viral intracelular com 10, 5, 1, 0,5 e 1µg/mL (FIGURA 21). No mesmo ponto de 24h, foi observada diminuição da apoptose com o tratamento de 0,5µg/mL. Sendo que em 48h, a produção de NO está significativamente aumentada (5, 1 e 0,5 µg/mL), em relação à cultura infectada não tratada (item 5.7, FIGURA 29).

Embora esses resultados não sejam conclusivos com associações diretas, eles são sugestivos de que em condições que ajam atividades antivirais pela modulação de NS1 ou do Ag DENV intracelular possa haver modulação de morte

celular programada – apoptose - e de necrose. A produção de NO aumentada após os tratamentos sugerem um papel dessa molécula no controle da replicação viral.

5.9. Avaliação da atividade imunomoduladora dos extratos UGC e UGF

5.9.1. Efeito imunomodulador de UGC e UGF determinado pela dosagem de IL-8, nos sobrenadantes das células Huh-7 infectadas por DENV-2.

A produção de IL-8 foi determinada em sobrenadantes de Huh-7 infectadas com DENV-2 ($TCID_{50} = 5 \times 10^9/mL$) e tratadas com diferentes concentrações de UGC e UGF em diferentes intervalos de tempo.

Nestes ensaios, observamos que UGC na concentração de 25 $\mu g/mL$ foi capaz de reduzir a secreção IL-8 pela célula no período de 72h, significativamente (FIGURA 32).

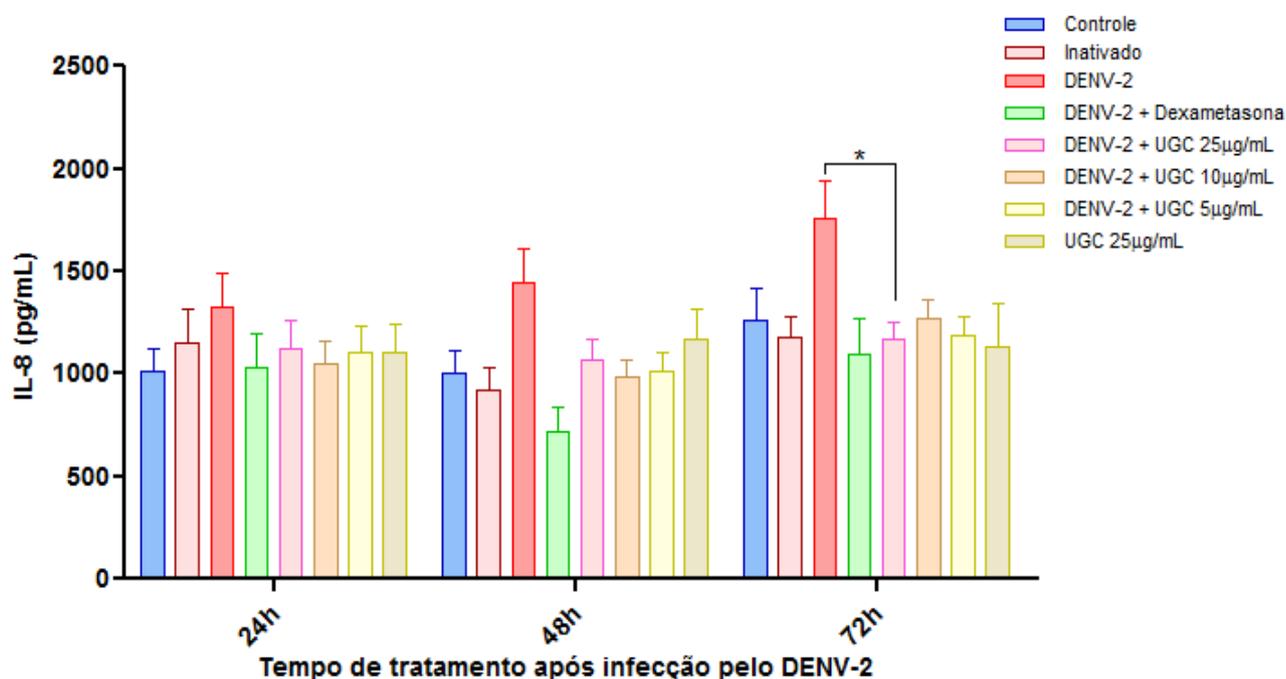


Figura 32: Efeito Imunomodulador de UGC na produção de IL-8 pela linhagem Huh-7 (24h-72h). Aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pares, sendo *Valor *P* < 0,05. n = 6 experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 4 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro.

Em 72h, todas as concentrações de UGF foram capazes de reduzir a detecção de IL-8, de forma significativa (FIGURA 33). No entanto, a Dexametasona não foi.

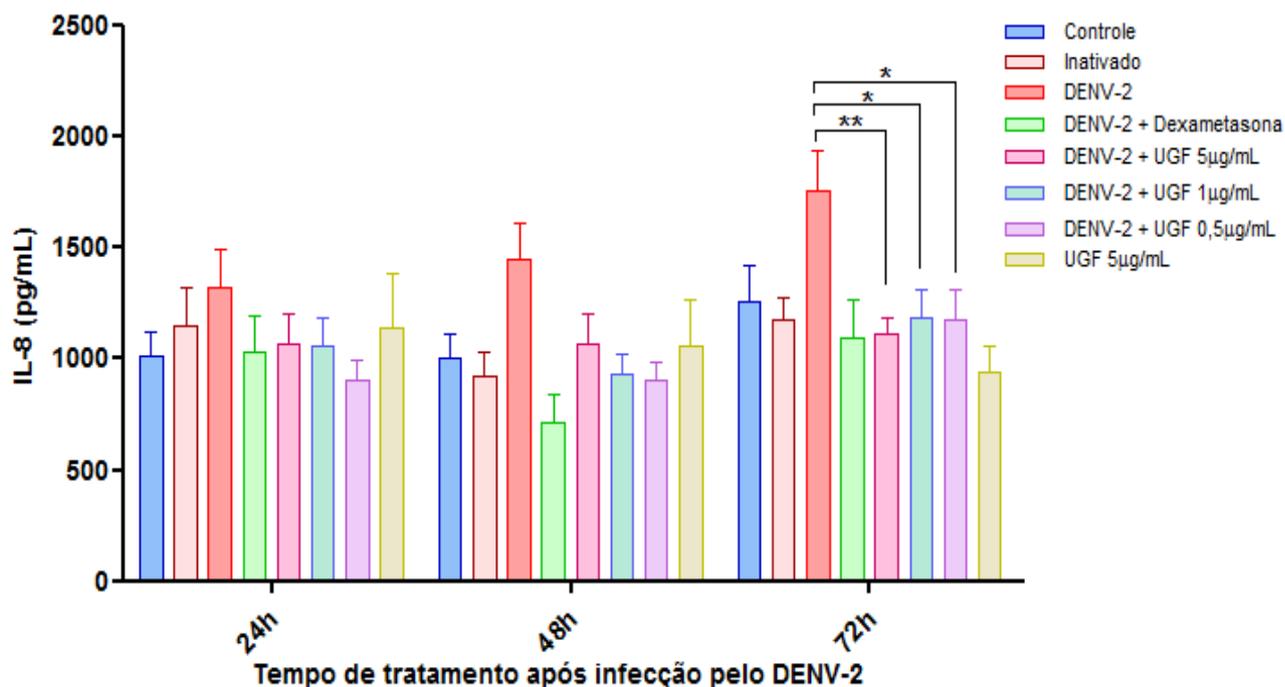


Figura 33: Efeito Imunomodulador de UGF na produção de IL-8 pela linhagem Huh-7 (24h-72h). Aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pares, sendo *Valor *P* < 0,05 e *Valor **P* < 0,01. n = 6 experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 4 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro.

5.9.2. Efeito imunomodulador de UGC e UGF determinado pela dosagem de IL-6, nos sobrenadantes das células Huh-7 infectadas por DENV-2.

Nestes experimentos, em 72h, as três concentrações de UGC: 25, 10 e 5µg/mL diminuíram, significativamente, a dosagem de IL-6 (FIGURA 34).

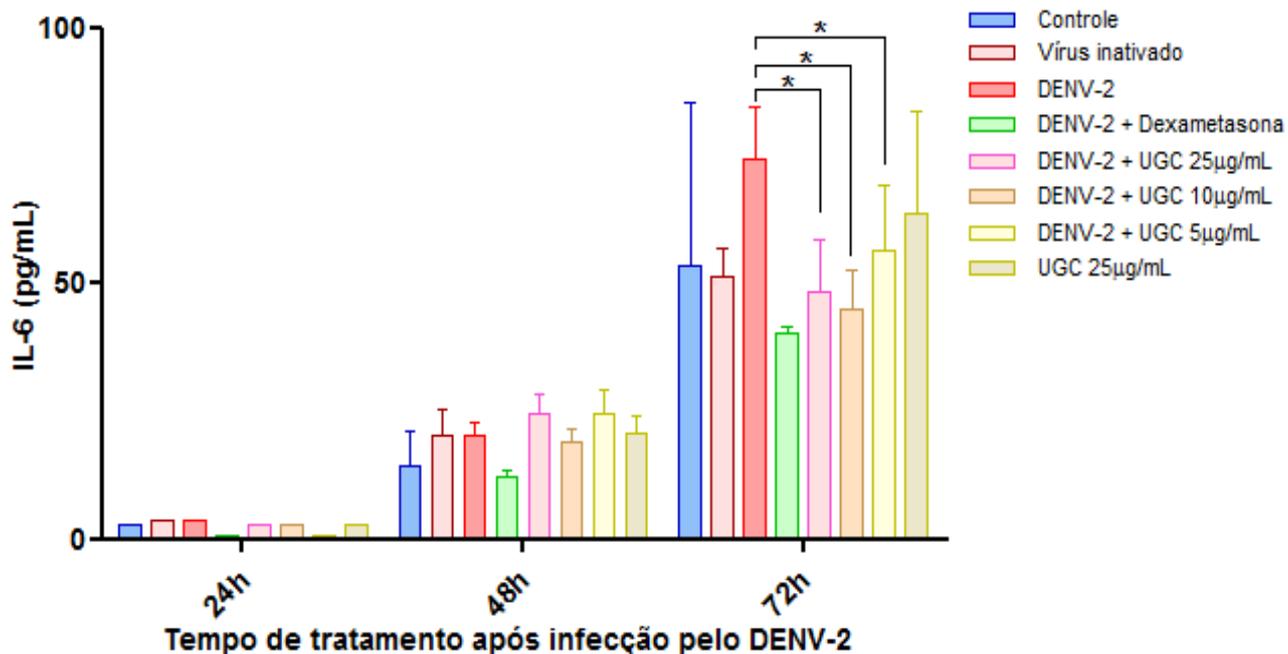


Figura 34: Efeito Imunomodulador de UGC na produção de IL-6 pela linhagem Huh-7 (24h-72h). Aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pares, sendo *Valor *P* < 0,05. n = 3 experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média e erro.

Igualmente, foram detectados os níveis de IL-6 nas culturas de Huh-7 infectadas e tratadas com o extrato UGF nas concentrações de 5, 1 e 0,5µg/mL. Em 72h, com todas elas, houve queda bastante significativa na produção de IL-6 pela cultura (FIGURA 35).

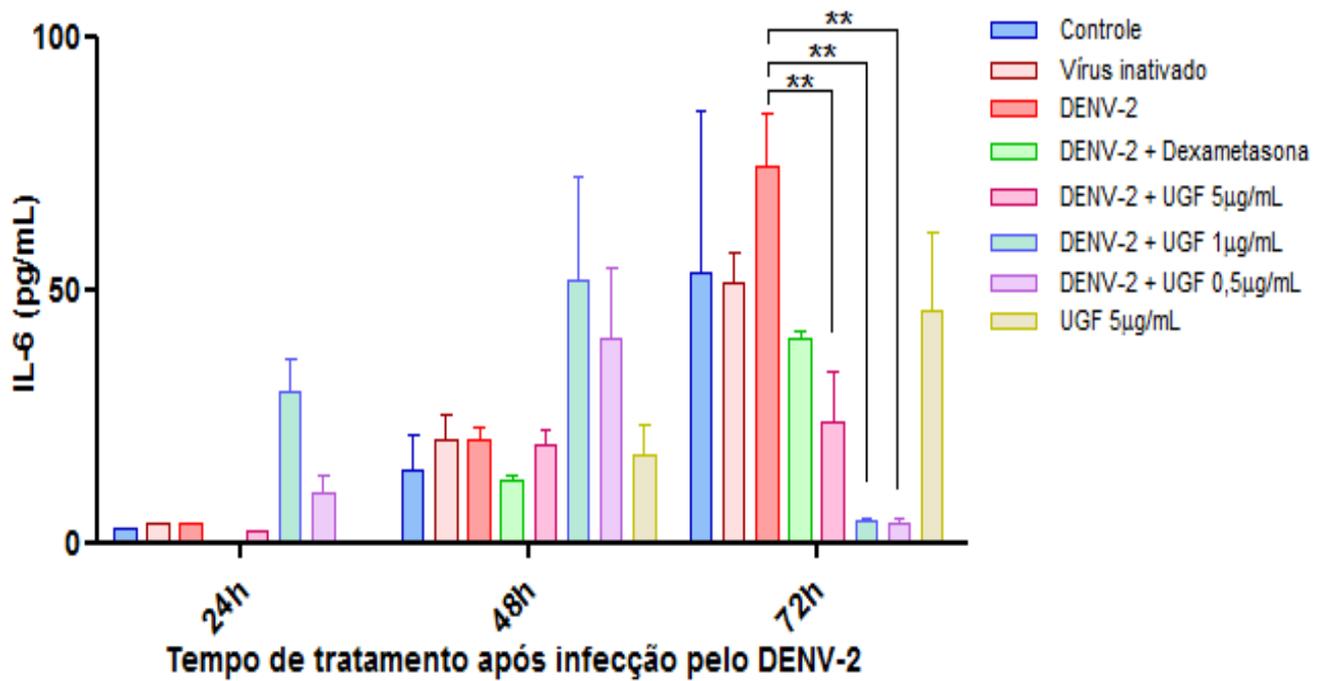


Figura 35: Efeito Imunomodulador de UGF na produção de IL-6 pela linhagem Huh-7 (24h-72h). Aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do *pós teste de Dunn* para análise dos pares, sendo *Valor *P* < 0,01. n = 3 experimentos independentes, com no mínimo 1 e no máximo 3 réplicas, por ponto analisado. Os valores foram representados conforme média com erro.

Todos os resultados obtidos podem ser visualizados em ANEXO I.

6. DISCUSSÃO

O sistema imunológico do hospedeiro parece ser o principal fator na patogênese do DENV. Apesar da limitação atual devido à falta de um modelo animal apropriado (268), o desenvolvimento de tratamentos contra a dengue tem sido foco primário de grupos de investigação por todo o mundo, inclusive do nosso. Visto a importância de uma terapêutica efetiva na infecção pelo DENV e o grande emprego da medicina herbária pelo globo, este projeto foi realizado buscando identificar propriedades antivirais e imunomoduladoras de extratos de uma espécie do gênero *Uncaria*, reconhecida pela etnofarmacologia, como planta medicinal.

As espécies de *Uncaria* são amplamente utilizadas no tratamento de diversas enfermidades devido as suas sortidas propriedades. Usualmente, possuem efeitos antiespasmódicos, analgésicos e sedativos. Ações antiinflamatórias, antibacterianas e antitumorais também foram constatadas. Estas espécies são constituídas por muitos compostos químicos aos quais são atribuídas várias atividades (254, 266, 269-273). Em 2008, nossa equipe identificou atividades antiviral e imunomoduladora de *Uncaria tomentosa* no tratamento de monócitos humanos infectados com DENV-2 (256). Igualmente, em 2013, observamos que a fração alcaloide da mesma espécie foi capaz de reduzir a permeabilidade paracelular e a produção de IL-8 e NS1 da linhagem de células endoteliais da microvasculatura dermal humana (HMEC-1), infectadas com o sorotipo 2 (257).

A utilização crescente de linhagens contínuas (transformadas) em estudos de infecção pelo DENV como o presente deve-se além da mimetização do organismo humano, à apresentação de menores limitações quanto ao número de células a serem utilizadas, por possuírem melhor reprodutibilidade. Ainda, por serem menos variáveis em seus resultados quando relacionadas as células primárias. Fizemos, portanto, uso da linhagem de hepatocarcinoma humano (Huh-7), uma vez que diversos estudos apontam o fígado como um dos principais órgãos acometidos pela infecção viral (106, 177-179, 274, 275) e, demonstram também, a permissividade dessa cultura aos diferentes sorotipos do DENV (77, 188-190, 276-279).

Embora tivéssemos diversificadas evidências da infecção pelo vírus Dengue em variados trabalhos já explicitados, e suas consequências sobre a linhagem de Huh-7, avaliamos as taxas do antígeno viral nas mesmas, bem como a produção da proteína não estrutural (NS1), indicativa de replicação viral. A determinação da produção de fatores imunológicos tais como de citocinas, quimiocinas e NO,

identifica a intenção de não só controlarmos a carga viral, mas também modularmos as respostas imunológicas exacerbadas indesejadas. Essas avaliações foram imprescindíveis para a ratificação da adequação do modelo de infecção para com o nosso objetivo geral. Sendo assim, nossas metodologias e modelo mostraram-se mais adequados para testes de triagem de compostos naturais, avaliando vários parâmetros simultaneamente.

A marcação intracelular do antígeno viral nos levou à escolha da diluição de 1/100 da cepa viral ($TCID_{50} = 5 \times 10^9/mL$) para as infecções da cultura. Nesta $TCID_{50}$, obtivemos uma alta taxa de Huh-7 positivas para o vírus (média de 71,5% em 24h), equivalente as outras diluições, com redução da taxa nas próximas 48h e 72h, o que poderia reproduzir o que ocorre em células primárias (175) e, provavelmente *in vivo*, já que o vírus só é encontrado em circulação e em monócitos por pouco tempo, em até 7-10 dias (280). Em concentrações mais altas de vírus observamos grande perda celular e intensa positividade nas células restantes, eventos que poderiam mascarar a visualização de possíveis efeitos antivirais de UGC e UGF.

Antes de iniciarmos os ensaios de infecção e tratamento, detectamos a viabilidade dos hepatócitos quando tratados com os extratos brutos de *Uncaria sp.*, das cascas (UGC) e das folhas (UGF). A metodologia usada com MTT, que é uma das mais comumente descritas na literatura para se determinar a citotoxicidade de produtos de diversas naturezas sobre células em cultura e que também facilitaria a comparação do nosso trabalho com o de outros. A principal vantagem do ensaio colorimétrico é a rapidez com que as amostras podem ser processadas. Nestes ensaios, o substrato não interfere com a mensuração do produto e podem ser encontradas condições nas quais os componentes do meio não interferem. Isso permite a leitura do experimento sem qualquer remoção ou qualquer passo de lavagem, o que aumenta a velocidade do teste e ajuda a minimizar a variabilidade entre as amostras (281).

As células *in vitro* ficaram submetidas aos tratamentos até 96h, ponto que todas as concentrações de ambos os extratos foram citotóxicas. Por isso, os demais ensaios realizados ao longo da dissertação alcançaram cinéticas de 24h até 72h. A utilização de meio de cultura com 1% e 0,1% de DMSO - concentrações encontradas na solução estoque (1mg/mL) e na maior diluição de cada extrato (100µg/mL) - teve como objetivo estimar a influência deste solvente, mesmo que em proporções pequenas, na cultura tratada com UGC e UGF. As taxas de produção de Formazan ficaram abaixo de 90% nos poços tratados com DMSO 1%, indicando a

toxicidade desse produto nessa concentração. No entanto, como 100µg/mL tanto de UGC quanto de UGF, que apresenta 0,1% de DMSO, apresentou citotoxicidade desde 24h até 96h, podemos deduzir que tal composto não interfere na atividade dos respectivos extratos visto que poços tratados com 0,1% de DMSO demonstraram produção de Formazan acima de 90% até 48h. Sendo assim, a viabilidade/citotoxicidade observadas estão relacionadas, provavelmente, às moléculas encontradas nas diferentes concentrações de UGC e UGF. Todavia, precisamos ressaltar que a concentração de DMSO 0,1% apresentou-se ligeiramente tóxica (viabilidade <90%), a partir de 72h. Não se pode ter certeza que as concentrações de 50µg/mL e menores não tenham efeito sofrido pelo DMSO. Com isso, deve-se testar o efeito deste solvente nas células em concentrações menores do que as que já foram testadas. No futuro, esse ponto deverá ser esclarecido com ensaios de viabilidade usando concentrações menores que 0,1% e testados em 72h.

Por meio de experimentos que visavam à observação de possível efeito antiviral dos extratos brutos sobre a cultura, foi determinado nos sobrenadantes de Huh-7 infectada e tratada que, em 48h, a concentração de 5µg/mL de UGC apresentou atividade antiviral. Ainda, no mesmo período, as outras duas concentrações de UGC sugeriram possuir certo efeito, também. Diferentemente, já em 24h de tratamento com 5µg/mL de UGF, ocorreu efeito antiviral. Em contrapartida, em 72h, os efeitos de ambos os extratos não foram marcantes quando comparados com os das culturas infectadas não tratadas. Uma justificativa seria que os princípios ativos dos mesmos não sejam mais tão eficientes na diminuição da replicação viral, a partir desse período. Da mesma forma, em estudo anterior do Laboratório, células endoteliais infectadas e tratadas com frações de *Uncaria tomentosa*, apresentaram ação antiviral em até 48h (257). Sugerimos assim, que para obtenção de um efeito otimizado, seja necessária a partir desse ponto, a reposição e manutenção dessas concentrações de UGC ou UGF sobre a monocamada de Huh-7, prolongando e intensificando os efeitos obtidos até 48h. Um outro aspecto é que a proteína não estrutural NS1, é uma molécula viral excitada e/ou liberada no sobrenadante, e se acumula com o decorrer do tempo, ficando mais difícil de se observar o efeito antiviral. Desta forma, a detecção do efeito antiviral quando foram realizadas marcações intracelulares por imunofluorescência para detecção do antígeno viral, apresentou-se de forma mais sensível e estatisticamente mais significativa. A concentração de 10µg/mL de UGC demonstrou atividade em

72h, assim como todas as demais de UGF. Esse fato poderia ser explicado, pois no terceiro dia de infecção a carga viral já não é tão acentuada e, supõe-se, que os compostos presentes nos extratos conseguem bloquear novas infecções nas células remanescentes da cultura. Estes resultados são diferentes dos encontrados com outra espécie da planta no trabalho de conclusão de curso com HMEC-1 e na tese de doutorado de Lima-Júnior. Foi demonstrado que, não foi possível detectar redução da taxa de infecção pela metodologia da citometria (257). No entanto, em uma outra dissertação de mestrado de nossa equipe, a detecção da atividade antiviral pela marcação intracelular do antígeno viral, foi bem sucedida. Porém, o mesmo desempenho foi observado somente em ensaios de 48h, também com Huh-7 infectada por DENV-2, contudo com frações e subfrações de uma espécie de *Marcgraviaceae* (282). Especulamos que as substâncias ativas presentes nas três espécies de plantas possam ser diferentes.

Mais equipes vêm demonstrando a capacidade antiviral de produtos naturais sobre diferentes tipos celulares infectados pelo DENV. Diwaker e colaboradores, mostraram que o tratamento com extrato aquoso de *Rhodiola imbricata* - espécie de planta muito utilizada na medicina tradicional - em 48h, foi capaz de reduzir a marcação intracelular do Ag DENV em células THP-1 e PBMCs, além de diminuir o título viral em sobrenadantes de células Vero infectadas (283). Utilizando flavonoides originados de compostos naturais, Muhamad, *et al.*, observaram que estes proporcionaram efeito protetor sobre as células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) infectadas com DENV-2, por meio da diminuição do efeito citopático (CPE) e preservação da monocamada celular (284). Ademais, extratos metanólicos de *Andrographis paniculata* e *Momordica charantia* conseguiram inibir a atividade de DENV-1 em ensaios *in vitro* com células Vero E6, minimizando também, o CPE desta cultura (285). Nossos resultados mostram uma atividade avaliada por diferentes parâmetros, reforçando a importância do modelo aqui estabelecido.

Para uma avaliação mais precisa e refinada da viabilidade celular da linhagem contínua quando a mesma é infectada por DENV-2 e/ou tratada com os compostos de *Uncaria sp.*, adotamos a marcação por “LIVE/DEAD” que distingue células vivas das mortas. Por meio desta, foi possível identificar atividades antivirais de UGC e UGF concomitantemente à melhoria das condições de viabilidade celular após os tratamentos da cultura infectada. Observamos que a viabilidade das Huh-7 foi negativamente afetada quando infectada pelo DENV. Esta discrepância é altamente perceptível no terceiro dia de infecção. Com relação aos tratamentos sem vírus,

todos eles mantiveram a viabilidade celular e não ocasionaram morte das células. Culturas sem infecção tratadas com as maiores concentrações dos extratos demonstraram melhor viabilidade das células do que nos controles positivos, sugerindo, que a planta poderia induzir a proteção ou proliferação celular (embora os resultados não tenham significância estatística). A simultânea marcação intracelular do antígeno viral confirmou a atividade antiviral determinada nos ensaios de triagem iniciais. Observou-se uma diferença dos resultados obtidos na primeira etapa no que se refere as concentrações efetivas, que poderia estar implicada no maior número de réplicas utilizadas nesta etapa e no teste estatístico aplicado, o qual permite maior precisão na detecção de diferenças entre os pares comparados. De qualquer maneira, a atividade antiviral detectada com a manutenção da viabilidade, indica que os efeitos observados devem estar ocorrendo pela (s) ação (ões) do (s) princípio (s) ativo (s) dos extratos e, não, porque as células em cultura estejam morrendo.

Em recente estudo histopatológico de casos fatais de dengue, foram visualizadas alterações nos hepatócitos, tais como degeneração vacuolar do núcleo e a presença de mitocôndrias dilatadas, sugerindo a presença de processo apoptótico (106). Em outras pesquisas, biópsias hepáticas e autópsias, oriundas de crianças ou adultos infectados com DENV, também apresentaram células em apoptose, principalmente hepatócitos e células de Kupffer (286-288). O mesmo quadro apoptótico foi detectado em camundongos infectados por Dengue (31, 289) e o associaram as alterações no equilíbrio de ATP dos hepatócitos com infecção, induzindo a apoptose (290). Realmente, estudos *in vitro* com células de linhagem diferentes, provenientes de tecidos como o fígado, pulmão, rim e células endoteliais vasculares, mostraram que a infecção por Dengue por si só é suficiente para indução da apoptose (291-293), sem que haja o envolvimento de outros fatores do hospedeiro, inclusive dos componentes da resposta imunológica.

Na busca pela capacidade dos compostos presentes em UGC e UGF em atenuar o processo apoptótico acentuado pelo DENV, utilizamos a marcação de Anexina V associada ao iodeto de propídio que distinguem células apoptóticas de necróticas. Em 72h, as taxas de indução de apoptose das células Huh-7 infectadas e tratadas com UGC 5µg/mL e, em 24h, com UGF 1µg/mL, diminuíram significativamente. De forma coincidente, a marcação do antígeno viral também foi menor em 72h com 5µg/mL de UGC, indicando que uma menor taxa de infecção acarreta, possivelmente, uma redução do processo apoptótico nas células. Além disso, constatou-se diminuição da taxa de necrose na linhagem infectada tratada

com 25µg/mL de UGC, em 48h, período que a mesma concentração atenuou a secreção de MIF.

A quantificação de NS1 nos sobrenadantes de células infectadas e tratadas nos mesmos ensaios de detecção de apoptose destas populações abordadas não conseguiu indicar uma ação antiviral dos extratos. Mais uma vez, tal mudança do perfil observado nos experimentos iniciais, deve-se talvez, pelas diferenças de réplicas utilizadas e no teste estatístico aplicado. Embora os tratamentos utilizados neste trabalho tenham apontado condições semelhantes em que houve diminuição de antígenos virais, quer intracelulares quer secretados, a associação da apoptose com a diminuição da carga viral não pôde ser confirmada, deixando ainda essa pergunta sem resposta conclusiva que deverá ser no futuro investigada com mais detalhes.

O NO é um composto orgânico regulador, produzido principalmente por macrófagos ativados. Esta molécula possui enorme importância em processos inflamatórios e na modulação das respostas imunológicas. Por conseguinte, quando em altas concentrações, pode acarretar prejuízos aos tecidos (294). Em hepatites virais, o NO apresenta papel protetor cooperando para o *clearance* viral, conforme demonstrado por nossa equipe (295). Ainda, o NO tem sido descrito como um importante fator antiviral na resposta do organismo hospedeiro contra o vírus Dengue, uma vez que este mediador foi detectado no soro de pacientes com FD e FHD, bem como níveis elevados de nitritos (produtos da reação de NO com o oxigênio). Tal associação da elevação da quantidade de NO₂⁻ com manifestações brandas da doença sugere um papel também protetor do NO nas infecções pelo DENV, *in vivo*. Outro estudo revelou que o NO inibe a replicação de DENV-2 na fase de síntese *de novo* do RNA viral pela polimerase do vírus e, que a adição de SNAP antes da infecção, não resulta em nenhum efeito inibidor da mesma, sugerindo que o NO não afeta a entrada viral ou eventos não revestidos (296). Portanto, o ideal, nas mais variadas doenças infecciosas, é alcançar os níveis de NO suficientes para indução da proteção com prejuízos mínimos ao hospedeiro. Com isso, buscamos avaliar o potencial de UGC/UGF em induzir a produção de NO na linhagem contínua de hepatócitos.

De forma equivalente ao que foi descrito na dissertação de mestrado de Fialho (282), desenvolvida em nosso laboratório, foi observado aumento da produção de NO₂⁻ no período de 48h, nas Huh-7 infectadas em comparação com as células sem infecção, corroborando assim, a indução de mecanismos antivirais na

cultura de células infectadas, como a secreção de óxido nítrico. Para ratificar a ação protetora sugerida para essa molécula orgânica, detectamos aumento da sua secreção no mesmo período de 48h, nos sobrenadantes de hepatócitos infectados e tratados com a concentração de 25µg/mL de UGC, como em todas as de UGF. Relacionamos esses incrementos com a cultura infectada pelo DENV-2 sem tratamento.

Curiosamente, foi possível verificar que os efeitos antivirais observados pela marcação do antígeno viral nos tratamentos com o extrato de folhas, ocorreram em 72h, período seguinte ao da produção de NO (48h). Sugerindo também, que o óxido nítrico após secretado na cultura, é capaz sim, de diminuir a carga viral. Ademais, o doador de NO (SNAP) reduziu, significativamente, as taxas de infecção detectadas por citometria fluxo, além de conter igualmente, o processo apoptótico nas Huh-7 infectadas e tratadas com o mesmo. As duas detecções ocorreram em 72h, demonstrando, de novo, o potencial antiviral desta molécula.

Alguns estudos já relataram as ações de compostos originados de produtos naturais nos tratamentos de variadas enfermidades relacionando-os ao NO. Entre eles, o da equipe de Catarino, onde foram utilizados extratos enriquecidos de flavonoides com propriedades antioxidantes que interferem nos eventos de estresse oxidativo através da redução direta dos níveis de radicais livres intracelulares, entre eles, o NO (297). Relatou-se que extratos etanólicos de diversas plantas medicinais tailandesas possuem atividade anti-inflamatória e podem reduzir a destruição da cartilagem articular pelo efeito inibitório da liberação de NO, no tratamento de osteoartrite pela medicina tradicional (298). Contudo, trabalhos que associem a ação do óxido nítrico tendo sua produção estimulada por compostos naturais, sobretudo na dengue, não são existentes ao nosso conhecimento.

Acredita-se que as citocinas desempenhem um papel direto na imunopatogênese do DENV, devido especialmente aos seus efeitos pró-inflamatórios em células endoteliais vasculares, mesmo que suas produções exacerbadas sejam o resultado independente dos fenômenos de uma resposta imunológica adaptativa cruzada e ineficiente, tal como é proposto pela Teoria do Pecado Original (68). Muitas hipóteses têm sido propostas para explicar a patogênese e o fenômeno do extravasamento vascular na dengue grave, especialmente durante o choque. O extravasamento ocorre quando as células endoteliais estão ativadas ou danificadas, perdendo sua função como barreira. Assim, a permeabilidade vascular é aumentada, resultando na diminuição do volume

do plasma circulante, hemoconcentração e síndrome do choque grave com risco de vida (46, 148). Os danos nessas células podem ser causados pelo vírus Dengue em si ou pela secreção de citocinas a partir de variados tipos celulares, entre estes, os hepatócitos como as Huh-7, além da ativação do complemento (178, 299-302). Essas evidências são assim, suportes para o uso das células Huh-7 como modelo de estudo, não só para detecção de efeitos na carga viral como, também, na modulação de fatores inflamatórios.

O Fator de Necrose Tumoral – α (TNF- α), é a uma das citocinas implicadas na patogênese dos casos de dengue grave. Sua liberação sistêmica pode ser responsável pelo aumento da permeabilidade vascular observada em tais casos (300), já que nos soros de pacientes com infecção aguda pelo DENV, sabidamente contendo níveis elevados de TNF, essa molécula foi capaz de ativar as células endoteliais (303). No entanto, esta potente citocina não é secretada pela cultura de Huh-7 (dados não demonstrados), embora a linhagem possa ser tratada com o fator tumoral (304). Ao contrário, após 14h de infecção pelo DENV-3 em cultura de HepG2, constata-se síntese de RNAm para TNF- α e IL-6 (305). De fato, nem sempre o TNF é associado aos casos graves (306) e outros mediadores inflamatórios podem estar relacionados com a gravidade e o aumento da permeabilidade vascular durante a infecção por DENV, entre eles está o MIF. Pacientes com dengue grave apresentaram uma produção maior deste fator, em contrapartida daqueles com dengue. Além disso, quando indivíduos classificados como grave, sobreviventes ou não, foram comparados, a produção foi mais elevada nos não-sobreviventes, relacionando, dessa maneira, o MIF aos casos de FHD e fatais (191, 305).

Por esse motivo, o MIF foi então selecionado para observação de possível efeito imunomodulador nos ensaios iniciais de triagem, detectando a sua secreção pela linhagem de hepatócitos infectada pelo vírus Dengue. O MIF foi produzido em nossos experimentos de forma crescente com o período de infecção. Esta secreção foi acumulatória e ocorreu pela ação do DENV-2 sobre a cultura, independente da morte celular, conforme demonstrou Assunção-Miranda e colaboradores (305). Nos experimentos de infecção e tratamento, foi observada atividade imunomoduladora sobre o fator, significativa, somente em UGC; tendo as concentrações de UGF ação apenas sugestiva. Supomos que o(s) princípio(s)-ativo(s) presente(s) nas cascas e nas folhas sejam diferentes devido à diferença de atuação imunomodulatória, possuindo melhor efeito o(s) encontrado(s) no extrato bruto das cascas. Em

compensação, o extrato oriundo das folhas, manifestou melhor ação antiviral, corroborando nossa suposição.

Além de reduzir os níveis de MIF produzidos pelas células Huh-7 infectadas, UGC e UGF também apresentaram efeitos imunomodulatórios sobre outras citocinas importantes da patogênese do DENV, tais como a IL-8 e a IL-6. Sendo essas fortes indutoras da permeabilidade vascular (166). Uma característica da dengue grave é a presença de níveis elevados de citocinas e quimiocinas no sangue de pacientes infectados pelo DENV, entre elas a IL-8 (307-309). Já foi sugerido o papel desta quimiocina no extravasamento plasmático, quadro característico na FHD (160, 164). Além disso, a IL-8 pode subverter a resposta imunológica inata e inibir os efeitos antivirais do sistema IFN e, dessa forma, potencializar a disseminação viral (159). Assim sendo, a redução da secreção de IL-8 é um efeito desejável para a aplicação de um determinado tratamento que vise o melhoramento de sintomas, tais como hipotensão e choque. Os extratos de UGC e UGF apresentaram uma ação imunomodulatória, na concentração de 25µg/mL do extrato das cascas e em todas as concentrações do extrato das folhas, em 72h de tratamento. No caso de UGF, a atividade imunomoduladora foi melhor sobre a IL-8 quando comparada ao efeito deste composto sobre a secreção de MIF, enquanto que UGC teve melhor atuação sobre esse.

De igual maneira ao nosso, outros estudos visaram a imunossupressão da IL-8 e, também, fizeram uso de plantas medicinais. Em um recente, Setiawan e colaboradores, utilizando isolados do pericarpo de *Garcinia mangostana* Linn (GML), verificaram a capacidade de xantonas em suprimir a IL-8 em linhagem celular de cancro (SP-C1), em 48h (310). O efeito de um extrato aquoso obtido a partir das folhas de *Ligustrum vulgare* no tratamento de inflamações foi visto por outra equipe, onde ocorreu inibição da metaloproteinase-9 da IL-8 em função de neutrófilos (311). Objetivando comprovar o potencial das plantas medicinais tradicionalmente utilizadas na Áustria, 63 espécies de plantas ou gêneros com propriedades anti-inflamatórias foram extraídas com solventes de polaridades diferentes para avaliação de suas atividades, pela equipe de Vogl. Destas, 30 conseguiram regular negativamente a expressão do gene de IL-8 (312). Esta grande diversidade de estudos demonstram a relevância desta quimiocina nos variados processos infecciosos.

A IL-6 desempenha um papel crucial nas reações inflamatórias agudas, estando relacionada com a geração de edema em processos inflamatórios. Um

estudo com pacientes brasileiros, realizado por nossa equipe durante a epidemia de 1998, correlacionou citocinas, como a IL-6, com a gravidade da doença (153). A qual contribui ainda, para a disfunção endotelial nos casos graves de dengue (313). Todas as concentrações de UGC apresentaram redução significativa de IL-6 e todas as de UGF de forma bastante significativa, no período de 72h, mostrando assim, mais um potencial efeito benéfico dos compostos que estamos testando. Igualmente à interleucina-8, a IL-6 está envolvida em efeitos inflamatórios e a utilização de plantas medicinais para sua imunomodulação já foi requerida. Rasheed e colaboradores, fizeram uso de quatro flavonoides provenientes do extrato da flor de *Butea monosperma* (BM), uma planta muito utilizada na medicina tradicional da Índia. Estes isolados conseguiram regular negativamente citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6, em mastócitos humanos ativados, constituindo assim, nova estratégia para o tratamento de doenças inflamatórias (314) e demonstrando o potencial para a efetividade dos produtos naturais.

Relacionando os fatores inflamatórios aqui descritos, podemos confirmar o efeito imunomodulador tanto para o extrato das cascas quanto para o das folhas. Tal constatação é de inerente importância, visto que os quadros de dengue grave, como extravasamento plasmático e choque, são fortemente influenciados por uma resposta exacerbada do sistema imunológico. Esta exacerbação pode ser caracterizada pela liberação excessiva e/ou descontrolada de citocinas pró-inflamatórias, tais como MIF, IL-8 e IL-6, conhecida por tempestade de citocinas (315). Com relação ao controle da infecção pelo DENV e, conseqüente, retenção dos fatores inflamatórios, os extratos de *Uncaria sp.* desempenharam atividade antiviral tanto na redução da carga viral - de forma mais proeminente -, quanto na diminuição da replicação do vírus. O estudo de produtos mais purificados a partir dos extratos estudados aqui poderão, assim, estabelecer candidatos para o desenvolvimento de um produto terapêutico.

A utilização de plantas medicinais com finalidade terapêutica está fortemente relacionada à própria evolução do homem. Mitos, verdades e tradições salientam o emprego desses espécimes em todos os tempos, nas variadas camadas sociais e em quase toda a humanidade (316). O Brasil é detentor da maior variedade de plantas do planeta com cerca de 55 mil espécies - há relatos de investigação de apenas 0,4% da flora-, distribuídas em diferentes ecossistemas, além de uma extraordinária diversidade cultural, refletindo em múltiplas formas de utilização terapêutica desses recursos naturais (223, 317).

7. CONCLUSÃO

Foi padronizado um modelo *in vitro* de Huh-7 apropriado para avaliação das atividades antiviral e imunomoduladora de extratos de *Uncaria sp.* para a dengue com boa reprodutibilidade dos resultados, nos quais:

- A utilização da linhagem contínua de hepatócitos (Huh-7) demonstrou-se susceptível à infecção e apresentou produção significativa de fatores imunológicos;
- A viabilidade celular de Huh-7 foi mantida com a utilização dos extratos brutos evidenciando viabilidade acima de 90%;
- Foi observada atividade antiviral por análise de citometria de fluxo e constatação da diminuição da proteína não estrutural NS1, em ambos os extratos, por diferentes períodos;
- A manutenção da viabilidade celular em ambos os extratos, pelo ensaio LIVE/DEAD, foi associada à atividade antiviral dos dois extratos;
- Taxas de apoptose e necrose foram reduzidas por UGC e UGF;
- Ocorreu indução da produção de NO_2^- pelos dois extratos;
- Identificou-se efeito imunomodulador, detectado pela inibição da produção de MIF, IL-8 e IL-6, tanto por UGC quanto por UGF.

8. PERSPECTIVAS

Algumas abordagens técnicas podem ser sugeridas para a melhoria dos resultados obtidos:

- ✓ Testar o efeito do solvente DMSO nas células Huh-7 em concentrações menores do que as que já foram testadas, em ensaios viabilidade até 72h;
- ✓ Quantificar o número de células iniciais e finais nos ensaios, visando diferenciar a origem de determinadas moléculas - como, a NS1 viral - nos sobrenadantes utilizados. Estas podem ser oriundas de células viáveis, em processo necrótico ou, ainda, de suas porções desintegradas;
- ✓ Para observação de uma melhor detecção de efeitos antivirais sobre a proteína não estrutural NS1, realizar a reposição e manutenção das concentrações de UGC/UGF sobre a monocamada de Huh-7, prolongando e intensificando os efeitos obtidos até 48h;
- ✓ Aumentar o número de réplicas e experimentos de infecção e tratamento para que se possa fazer a associação da apoptose com a diminuição da carga viral, através da NS1;
- ✓ Realizar marcações com Anexina V e PI em períodos mais precoces para aprimoramento na detecção dos processos de apoptose e necrose;

O modelo aqui apresentado poderá ser utilizado para a triagem e estudo de outros produtos que tenham indicação etnofarmacológica de uso antifebril e/ou anti-inflamatório.

- ✓ Os resultados obtidos com os extratos abrem perspectivas para estudos de frações e compostos purificados a partir dos dois extratos avaliados e, posterior, desenvolvimento de um fitoterápico.
- ✓ Identificar os marcadores biológicos, ou seja, substâncias com atividades antiviral e imunomoduladora, a partir dos extratos quimicamente padronizados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organization World Health (WHO). Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: World Health Organization. 1997;2 ed:84.
2. Abe AHM, Marques SM, Costa PSS. Dengue em crianças: da notificação ao óbito. *Rev Paul Pediatr* 2012;30(2):263-71.
3. Who. Dengue: Guidelines for Diagnosis, treatment, prevention and control. 2009;New edition: 160.
4. WHO WHO-. Dengue and severe dengue. 2014;117.
5. Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. *Science*. 2013;342(6157):415. Epub 2013/10/26.
6. Suaya JA SD, Siqueira JB, Martelli CT, Lum LC, Tan LH et al. Cost of dengue cases in eight countries in the Americas and Asia: a prospective study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2009;80(846-55).
7. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 2012;10:100-3.
8. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging infectious diseases*. 1995;1(2):55-7. Epub 1995/04/01.
9. Vu TT, Holmes EC, Duong V, Nguyen TQ, Tran TH, Quail M, et al. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in viet nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(7):e757. Epub 2010/07/24.
10. Tatem AJ, Huang Z, Das A, Qi Q, Roth J, Qiu Y. Air travel and vector-borne disease movement. *Parasitology*. 2012;139(14):1816-30. Epub 2012/03/27.
11. Cruz I-IO. Dengue: vírus e vetor.
12. Ehrenkranz NJ, Ventura AK, Cuadrado RR, Pond WL, Porter JE. Pandemic dengue in Caribbean countries and the southern United States--past, present and potential problems. *The New England journal of medicine*. 1971;285(26):1460-9. Epub 1971/12/23.
13. Martinez-Torres M. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana: José Martí. 1990:180.
14. Gubler DJ. Aedes aegypti and Aedes aegypti-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. Charles Franklin Craig Lecture. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1989;40(6):571-8. Epub 1989/06/01.
15. Organization PAH. Dengue in the Caribbean. 1979;375:186.
16. Opas. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. 1994;548.
17. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(3):480-96. Epub 1998/07/17.
18. Portal da Saúde MdS, Brasil. Dengue - Histórico.
19. Pinheiro FP. Los programas de erradicacion y de control del Aedes aegypti en las Americas. . OPS/HCP/HCT. 1996;63.
20. Teixeira MdG, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. Informe Epidemiológico do SUS. 1999;8(4):5-33.
21. Kouri G. El dengue, un problema creciente de salud en las Americas. *Rev Panam Salud Publica*. 2006;19(3):143-5.
22. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2003;27(1):1-13. Epub 2003/05/03.
23. Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends in microbiology*. 2014;22(3):138-46. Epub 2014/01/29.
24. Monteiro FA, Shama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic diversity of Brazilian Aedes aegypti: patterns following an eradication program. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(9):e3167. Epub 2014/09/19.

25. Bastos MdS. Perfil soropidemiológico do dengue diagnosticado na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (1998-2001) Universidade Federal do Amazonas - Dissertação de Mestrado. 2004:64.
26. Osanai C, Travassos da Rosa AP, Tang AT, Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1983;25:53-4.
27. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1986;81(2):245-6. Epub 1986/04/01.
28. Teixeira MGea. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Informe Epidemiológico do SUS*. 1999;8(4):5-33.
29. Teixeira MLBMG. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Estudos Avançados - São Paulo*. 2008;22(64).
30. De Simone TS, Nogueira RM, Araujo ES, Guimaraes FR, Santos FB, Schatzmayr HG, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004;98(9):553-62. Epub 2004/07/15.
31. Nogueira RM, Schatzmayr HG, de Filippis AM, dos Santos FB, da Cunha RV, Coelho JO, et al. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerging infectious diseases*. 2005;11(9):1376-81. Epub 2005/10/19.
32. MS SdVeS. DENGUE. Guia de Vigilância Epidemiológica. CID 10: A90;CADERNO 9.
33. (WHO) WHO. DENGUE: GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL. 2009;New edition.
34. Brasil SdVeSMdS. Boletim Epidemiológico dos casos de Dengue e Febre Chikungunya. *Portal da Saúde*. 2014;45(31).
35. Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *Journal of virology*. 1998;72(1):73-83. Epub 1998/01/07.
36. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature medicine*. 2004;10(12 Suppl):S98-109. Epub 2004/12/04.
37. Neyts J LP, De Clercq E. Infecções com *Flaviviridae*. *Verh K Acad Geneeskd Belg*. 1999;61(6):661-97; discussão 97-9.
38. Petersen LR, Marfin AA. Shifting epidemiology of *Flaviviridae*. *Journal of travel medicine*. 2005;12 Suppl 1:S3-11. Epub 2005/10/18.
39. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*. 1990;174(2):479-93. Epub 1990/02/01.
40. Deubel VN, R. M. R.; Drouet, M. T.; Zeller, M.; Reynes, J. & Ma, D. Q. Direct sequencing of genomic cDNA fragment amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue 2 virus. *Archives of virology*. 1992;129:197-210.
41. Lewis JA, Chang GJ, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*. 1993;197(1):216-24. Epub 1993/11/01.
42. Chungue EC, O.; Drouet, M. T.; Guzmán, M. G.; Laille, M.; Rossen, L. & Deubel, V.,. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses. *Journal of General Virology*. 1996;77:565-6.
43. Hwang KP, Chu PY, Tung YC, Wang HL, Yueh YY, Wu YC, et al. Molecular epidemiological study of dengue virus type 1 in Taiwan. *Journal of medical virology*. 2003;70(3):404-9. Epub 2003/05/27.
44. Chungue E, Deubel V, Cassar O, Laille M, Martin PM. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. *The Journal of general virology*. 1993;74 (Pt 12):2765-70. Epub 1993/12/01.
45. Lanciotti RS, Gubler DJ, Trent DW. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *The Journal of general virology*. 1997;78 (Pt 9):2279-84. Epub 1997/09/18.
46. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(8):532-43. Epub 2011/07/16.
47. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(7):946-51. Epub 2004/04/02.

48. Ross TM. Dengue virus. *Clinics in laboratory medicine*. 2010;30(1):149-60. Epub 2010/06/02.
49. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(1):13-22. Epub 2004/12/21.
50. Chang GJIDJGeGKE. *Molecular biology of dengue viruses*. New York: CAB International. 1997:175-95.
51. Fauquet CMM, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball. L.A. *Virus taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press. 2005.
52. Herrero LJ, Zakhary A, Gahan ME, Nelson MA, Herring BL, Hapel AJ, et al. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;137(2):266-82. Epub 2012/10/30.
53. Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *Journal of virology*. 2002;76(11):5480-91. Epub 2002/05/07.
54. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002;108(5):717-25. Epub 2002/03/15.
55. Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*. 2008;319(5871):1830-4. Epub 2008/03/29.
56. Premkumar A, Horan CR, Gage PW. Dengue virus M protein C-terminal peptide (DVM-C) forms ion channels. *The Journal of membrane biology*. 2005;204(1):33-8. Epub 2005/07/12.
57. Catteau A, Kalina O, Wagner MC, Deubel V, Courageot MP, Despres P. Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 10):2781-93. Epub 2003/09/19.
58. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of microbiology*. 1990;44:649-88. Epub 1990/01/01.
59. Lindenbach BD, Rice CM. *Molecular biology of flaviviruses*. *Advances in virus research*. 2003;59:23-61. Epub 2003/12/31.
60. Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *Journal of virology*. 2001;75(9):4268-75. Epub 2001/04/05.
61. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(12):6986-91. Epub 2003/05/22.
62. Crill WD, Chang GJ. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *Journal of virology*. 2004;78(24):13975-86. Epub 2004/11/27.
63. Lisova O, Hardy F, Petit V, Bedouelle H. Mapping to completeness and transplantation of a group-specific, discontinuous, neutralizing epitope in the envelope protein of dengue virus. *The Journal of general virology*. 2007;88(Pt 9):2387-97. Epub 2007/08/19.
64. Lai CY, Tsai WY, Lin SR, Kao CL, Hu HP, King CC, et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. *Journal of virology*. 2008;82(13):6631-43. Epub 2008/05/02.
65. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature reviews Microbiology*. 2007;5(7):518-28. Epub 2007/06/15.
66. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of virology*. 1999;73(6):4738-47. Epub 1999/05/11.
67. Chaturvedi UC, Nagar R, Shrivastava R. Macrophage and dengue virus: friend or foe? *The Indian journal of medical research*. 2006;124(1):23-40. Epub 2006/08/24.
68. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*. 2006;80(23):11418-31. Epub 2006/08/25.

69. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Current opinion in microbiology*. 2008;11(4):369-77. Epub 2008/07/23.
70. Wu CF, Wang SH, Sun CM, Hu ST, Syu WJ. Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *Journal of virological methods*. 2003;114(1):45-54. Epub 2003/11/06.
71. Johansson M, Brooks AJ, Jans DA, Vasudevan SG. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 4):735-45. Epub 2001/03/21.
72. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(3):1053-7. Epub 2000/03/04.
73. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(8):1078-88. Epub 2006/03/18.
74. Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity. *Current topics in microbiology and immunology*. 2010;338:67-82. Epub 2009/10/06.
75. Amorim JH, Alves RP, Boscardin SB, Ferreira LC. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. *Virus research*. 2014;181:53-60. Epub 2014/01/18.
76. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral research*. 2013;98(2):192-208. Epub 2013/03/26.
77. Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CK, Walther P, et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell host & microbe*. 2009;5(4):365-75. Epub 2009/04/22.
78. Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *Journal of virology*. 1999;73(4):2650-7. Epub 1999/03/12.
79. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO reports*. 2003;4(7):723-8. Epub 2003/06/05.
80. Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol*. 2004;149(5):915-27. Epub 2004/04/21.
81. Fang S, Wu Y, Wu N, Zhang J, An J. Recent advances in DENV receptors. *TheScientificWorldJournal*. 2013;2013:684690. Epub 2013/06/06.
82. Rey FA. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(12):6899-901. Epub 2003/06/05.
83. Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews*. 1990;3(4):376-96. Epub 1990/10/01.
84. Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: Its History and Resurgence as a Global Public Health Problem. CAB International. 1997:1-22.
85. Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. *Annual review of entomology*. 2008;53:273-91. Epub 2007/09/07.
86. Passoni VCdSDeLFC. DENGUE: NOVAS MANIFESTAÇÕES DE UMA VELHA DOENÇA – “RELATO DE CASO E ESTUDO COMPARATIVO ENTRE O VÍRUS DO DENGUE SOROTIPO 3 E O DA FEBRE AMARELA”. *Revista Médica*. 2003;37(2).
87. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgraduate medical journal*. 2004;80(948):588-601. Epub 2004/10/07.
88. Monath TPPotF. *The Togaviridae and Flaviviridae*. Plenum Press. 1986:375-424.
89. Rothman AL. Viral pathogenesis of dengue infections. In: D.J. Gubler e G. Kuno (Ed.) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International. 1997:245-70.

90. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Archives of medical research*. 2005;36(5):425-35. Epub 2005/08/16.
91. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature medicine*. 2000;6(7):816-20. Epub 2000/07/11.
92. Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. *Seminars in immunology*. 1992;4(2):121-7. Epub 1992/04/01.
93. Monath TPF. *Virology*. 1996;961-1034.
94. Halstead SB, O'Rourke EJ, Allison AC. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *The Journal of experimental medicine*. 1977;146(1):218-29. Epub 1977/07/01.
95. Scott RM, Nisalak A, Cheamudon U, Seridhoranakul S, Nimmannitya S. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases*. 1980;141(1):1-6. Epub 1980/01/01.
96. Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC infectious diseases*. 2005;5:64. Epub 2005/08/20.
97. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*. 1988;239(4839):476-81. Epub 1988/01/29.
98. Bunyaratvej A, Butthep P, Yoksan S, Bhamarapavati N. Dengue viruses induce cell proliferation and morphological changes of endothelial cells. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1997;28 Suppl 3:32-7. Epub 1997/01/01.
99. Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, Kao CL, Chang DM, Han SW, et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol*. 2001;166(3):1499-506. Epub 2001/02/13.
100. Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *Journal of virology*. 2001;75(8):3501-8. Epub 2001/03/27.
101. Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, et al. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *Journal of virology*. 2002;76(23):12242-9. Epub 2002/11/05.
102. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *The Journal of infectious diseases*. 2004;189(8):1411-8. Epub 2004/04/10.
103. Khakpoor DRSaA. Involvement of the liver in dengue infections. *Dengue Bulletin, Institute of Molecular Biosciences, Thailand*. 2009;33.
104. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clinical neuropathology*. 1997;16(4):204-8. Epub 1997/07/01.
105. Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, et al. Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *The Pediatric infectious disease journal*. 2010;29(3):238-42. Epub 2009/12/25.
106. Pova TF, Alves AM, Oliveira CA, Nuovo GJ, Chagas VL, Paes MV. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: histopathology, ultrastructure and virus replication. *PloS one*. 2014;9(4):e83386. Epub 2014/04/17.
107. Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, et al. Dengue--how best to classify it. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;53(6):563-7. Epub 2011/08/13.
108. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1998;352(9132):971-7. Epub 1998/09/30.
109. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *The Journal of infectious diseases*. 1997;176(2):313-21. Epub 1997/08/01.

110. al. PCe. Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Vietnam. . *Tropical Medicine and International Health*. 2002;7:125-32.
111. Torres EM. Dengue. *Estudos Avançados* 2008;22(64):33-52.
112. Srikiatkachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, Kalayanarooj S, et al. Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonographic study. *The Pediatric infectious disease journal*. 2007;26(4):283-90; discussion 91-2. Epub 2007/04/07.
113. Brasil MdSd. Dengue. *Portal da Saúde*. 2015.
114. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in virus research*. 2003;60:421-67. Epub 2003/12/24.
115. Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, et al. Dengue Virus (DV) enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. *The Journal of infectious diseases*. 2005;192(3):510-9. Epub 2005/07/05.
116. L. R. La pathogénèse de la dengue hemorrhagique: discussion critique des hypothèses Actuelles. *Bulletin Society of Pathology*. 1986;79:342-9.
117. Rosen L. The emperor's new clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic. . *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1977;26(3):337-43.
118. Watts DM PK, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1999;354:1431-4.
119. Oliveira MF, Galvao Araujo JM, Ferreira OC, Jr., Ferreira DF, Lima DB, Santos FB, et al. Two lineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(3):576-8. Epub 2010/03/06.
120. GUZMÁN MGK, G., 2002. Dengue: an update. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002;2:33-42.
121. Guzmán MGK, G.; Bravo, J.; Soler, M.; Vazquez, S. & Morier, L. . Dengue haemorrhagic in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. . *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1990;42:179-84.
122. Organization) PPAH. Dengue fever in Costa Rica and Panamá. *Epidemiological Bulletin*. 1994;15:9-10.
123. Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structures decrease dengue virus output from human monocytes and dendritic cells. *Journal of virology*. 2003;77(7):3929-38. Epub 2003/03/14.
124. Guirakhoo F, Zhang Z, Myers G, Johnson BW, Pugachev K, Nichols R, et al. A single amino acid substitution in the envelope protein of chimeric yellow fever-dengue 1 vaccine virus reduces neurovirulence for suckling mice and viremia/viscerotropism for monkeys. *Journal of virology*. 2004;78(18):9998-10008. Epub 2004/08/28.
125. Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *Journal of virology*. 2006;80(20):10208-17. Epub 2006/09/29.
126. Cologna RA, P.M.; Rico-Hesse, R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *Journal of virology*. 2005;79(2):853-9.
127. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature medicine*. 2003;9(7):921-7. Epub 2003/06/17.
128. Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, et al. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol*. 2006;176(6):3821-9. Epub 2006/03/07.
129. Remy MM. Dengue fever: theories of immunopathogenesis and challenges for vaccination. *Inflammation & allergy drug targets*. 2014;13(4):262-74. Epub 2014/08/29.
130. Bielefeldt-Ohmann H. Measuring virulence without a target. *Trends Microbiol*. 2000;8(6):265-6. Epub 2000/06/06.

131. 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. *The Journal of infectious diseases*. 1994;170(5):1304-7. Epub 1994/11/01.
132. Lin CF, Lei HY, Shiao AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *Journal of medical virology*. 2003;69(1):82-90. Epub 2002/11/19.
133. Alagarasu K, Damle IM, Bachal RV, Mulay AP, Shah PS, Dayaraj C. Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013;17:239-42. Epub 2013/04/30.
134. Alagarasu K, Honap T, Damle IM, Mulay AP, Shah PS, Cecilia D. Polymorphisms in the oligoadenylate synthetase gene cluster and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013;14:390-5. Epub 2013/01/23.
135. Garcia G, del Puerto F, Perez AB, Sierra B, Aguirre E, Kikuchi M, et al. Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. *Human immunology*. 2011;72(10):904-7. Epub 2011/07/19.
136. Wang L, Chen RF, Liu JW, Lee IK, Lee CP, Kuo HC, et al. DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(1):e934. Epub 2011/01/20.
137. Hottz ED, Oliveira MF, Nunes PC, Nogueira RM, Valls-de-Souza R, Da Poian AT, et al. Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013;11(5):951-62. Epub 2013/02/26.
138. Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature*. 2008;453(7195):672-6. Epub 2008/05/23.
139. Xavier-Carvalho C, Gibson G, Brasil P, Ferreira RX, de Souza Santos R, Goncalves Cruz O, et al. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes and dengue severity in children: a case-control, functional and meta-analysis study. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2013;20:197-205. Epub 2013/09/11.
140. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001;65(3):180-3. Epub 2001/09/20.
141. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nature genetics*. 2005;37(5):507-13. Epub 2005/04/20.
142. Pang T. Dengue haemorrhagic fever: virus or host response? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1987;6(3):141-4. Epub 1987/03/01.
143. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 2. An integral analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;81(5):821-3. Epub 1987/01/01.
144. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(1):33-42. Epub 2002/03/15.
145. Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM. Inflammatory and innate immune responses in dengue infection: protection versus disease induction. *The American journal of pathology*. 2013;182(6):1950-61. Epub 2013/04/10.
146. Brasier AR, Ju H, Garcia J, Spratt HM, Victor SS, Forshey BM, et al. A three-component biomarker panel for prediction of dengue hemorrhagic fever. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012;86(2):341-8. Epub 2012/02/04.
147. Kurane I, Innis BL, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Ennis FA. High levels of interferon alpha in the sera of children with dengue virus infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1993;48(2):222-9. Epub 1993/02/01.

148. Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thrombosis and haemostasis*. 2002;87(1):42-6. Epub 2002/02/23.
149. Agarwal R, Elbishbishi EA, Chaturvedi UC, Nagar R, Mustafa AS. Profile of transforming growth factor-beta 1 in patients with dengue haemorrhagic fever. *International journal of experimental pathology*. 1999;80(3):143-9. Epub 1999/09/01.
150. Laur F, Murgue B, Deparis X, Roche C, Cassar O, Chungue E. Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998;92(6):654-6. Epub 1999/05/18.
151. Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar R, Tandon R, et al. Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. *Journal of medical virology*. 1999;59(3):335-40. Epub 1999/09/29.
152. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *The Journal of infectious diseases*. 1999;179(4):755-62. Epub 1999/03/09.
153. Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*. 2001;204(4):494-507.
154. Guidotti LG, Borrow P, Hobbs MV, Matzke B, Gresser I, Oldstone MB, et al. Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(10):4589-94. Epub 1996/05/14.
155. Wati S, Li P, Burrell CJ, Carr JM. Dengue virus (DV) replication in monocyte-derived macrophages is not affected by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), and DV infection induces altered responsiveness to TNF-alpha stimulation. *Journal of virology*. 2007;81(18):10161-71. Epub 2007/07/13.
156. Freeman BDE, P.Q. *Inflammation - basic principles and clinical correlates*. Lippincot Williams & wilkins. 1999.
157. Kubelka CF, Borges PA, VonSydow FF, Lampe E. Analysis of tumor necrosis factor-alpha serum level in Brazilian patients with Dengue-2. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1995;90(6):741-2. Epub 1995/11/01.
158. Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignacio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, et al. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001;96(2):229-32. Epub 2001/04/04.
159. Khabar KS, Al-Zoghaibi F, Al-Ahdal MN, Murayama T, Dhalla M, Mukaida N, et al. The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha. *The Journal of experimental medicine*. 1997;186(7):1077-85. Epub 1997/10/07.
160. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 7):1801-13. Epub 2004/06/26.
161. Medin CL, Rothman AL. Cell type-specific mechanisms of interleukin-8 induction by dengue virus and differential response to drug treatment. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(8):1070-7. Epub 2006/03/18.
162. Raghupathy R, Chaturvedi UC, Al-Sayer H, Elbishbishi EA, Agarwal R, Nagar R, et al. Elevated levels of IL-8 in dengue hemorrhagic fever. *Journal of medical virology*. 1998;56(3):280-5. Epub 1998/10/23.
163. Spain-Santana TA, Marglin S, Ennis FA, Rothman AL. MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. *Journal of medical virology*. 2001;65(2):324-30. Epub 2001/09/06.
164. Hess C, Means TK, Autissier P, Woodberry T, Altfeld M, Addo MM, et al. IL-8 responsiveness defines a subset of CD8 T cells poised to kill. *Blood*. 2004;104(12):3463-71. Epub 2004/08/05.

165. Rachman A, Rinaldi I. Coagulopathy in dengue infection and the role of interleukin-6. *Acta medica Indonesiana*. 2006;38(2):105-8. Epub 2006/06/27.
166. Huang YH, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Liu CC, Yeh TM. Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2000;63(1-2):71-5. Epub 2001/05/19.
167. Pinto LM, Oliveira SA, Braga EL, Nogueira RM, Kubelka CF. Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94(3):387-94. Epub 1999/06/01.
168. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(10):791-800. Epub 2003/09/23.
169. Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;74(1):142-7. Epub 2006/01/13.
170. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology*. 2000;18:275-308. Epub 2000/06/03.
171. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annual review of immunology*. 2001;19:65-91. Epub 2001/03/13.
172. Slifka MK, Whitton JL. Activated and memory CD8+ T cells can be distinguished by their cytokine profiles and phenotypic markers. *J Immunol*. 2000;164(1):208-16. Epub 1999/12/22.
173. Ignarro LJ. Physiological significance of endogenous nitric oxide. *Seminars in perinatology*. 1991;15(1):20-6. Epub 1991/02/01.
174. Charnsilpa W, Takhampunya R, Endy TP, Mammen MP, Jr., Libraty DH, Ubol S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. *Journal of medical virology*. 2005;77(1):89-95. Epub 2005/07/21.
175. Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104(8):1091-9. Epub 2010/02/09.
176. Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *Journal of medical virology*. 2007;79(3):300-7. Epub 2007/01/25.
177. Khakpoor DRSaA. Involvement of the liver in dengue infections. *Dengue Bulletin*. 2009;33.
178. Pagliari C, Quaresma JA, Fernandes ER, Stegun FW, Brasil RA, de Andrade HF, Jr., et al. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever: contribution to the study of human liver lesions. *Journal of medical virology*. 2014;86(7):1193-7. Epub 2013/10/12.
179. Seneviratne SL, Malavige GN, de Silva HJ. Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006;100(7):608-14. Epub 2006/02/18.
180. Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research*. 1982;42(9):3858-63. Epub 1982/09/01.
181. Tran NM, Dufresne M, Helle F, Hoffmann TW, Francois C, Brochot E, et al. Alginate hydrogel protects encapsulated hepatic HuH-7 cells against hepatitis C virus and other viral infections. *PloS one*. 2014;9(10):e109969. Epub 2014/10/14.
182. Zhao X, Wu Y, Duan J, Ma Y, Shen Z, Wei L, et al. Quantitative Proteomic Analysis of Exosome Protein Content Changes Induced by Hepatitis B Virus in Huh-7 Cells Using SILAC Labeling and LC-MS/MS. *Journal of proteome research*. 2014;13(12):5391-402. Epub 2014/09/30.
183. Xia S, Ma J, Bai X, Zhang H, Cheng S, Zhang M, et al. Prostaglandin E2 promotes the cell growth and invasive ability of hepatocellular carcinoma cells by upregulating c-Myc expression via EP4 receptor and the PKA signaling pathway. *Oncology reports*. 2014;32(4):1521-30. Epub 2014/08/12.

184. Lin F, Yan W, Wen T, Wu GY. [Metformin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma Huh-7 cells in vitro and its mechanism]. *Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]*. 2013;35(10):742-6. Epub 2014/01/01.
185. Takagi M, Kojima N, Yoshida T. Analysis of the ammonia metabolism of rat primary hepatocytes and a human hepatocyte cell line Huh 7. *Cytotechnology*. 2000;32(1):9-15. Epub 2008/11/13.
186. Nakamura H, Kambe H, Egawa T, Kimura Y, Ito H, Hayashi E, et al. Partial purification and characterization of human hepatoma-derived growth factor. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1989;183(3):273-84. Epub 1989/08/31.
187. Lin YL, Liu CC, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, Chen RM, et al. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. *Journal of medical virology*. 2000;60(4):425-31. Epub 2000/02/24.
188. Escalera-Cueto M, Medina-Martinez I, Del Angel RM, Berumen-Campos J, Gutierrez-Escolano AL, Yocupicio-Monroy M. Let-7c overexpression inhibits dengue virus replication in human hepatoma Huh-7 cells. *Virus research*. 2014;196C:105-12. Epub 2014/12/03.
189. Ang F, Wong AP, Ng MM, Chu JJ. Small interference RNA profiling reveals the essential role of human membrane trafficking genes in mediating the infectious entry of dengue virus. *Virology journal*. 2010;7:24. Epub 2010/02/04.
190. Puerta-Guardo H, Medina F, De la Cruz Hernandez SI, Rosales VH, Ludert JE, del Angel RM. The 1 α ,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. Epub 2012/03/06.
191. Chuang YC, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Fu TF, Yeh TM. Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. *Cytokine*. 2011;54(2):222-31. Epub 2011/02/16.
192. Chuang YC, Su WH, Lei HY, Lin YS, Liu HS, Chang CP, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces autophagy via reactive oxygen species generation. *PloS one*. 2012;7(5):e37613. Epub 2012/05/26.
193. Edelman R. Dengue vaccines approach the finish line. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;45 Suppl 1:S56-60. Epub 2007/07/14.
194. Guy B, Almond JW. Towards a dengue vaccine: progress to date and remaining challenges. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2008;31(2-3):239-52. Epub 2007/09/25.
195. Hombach J. Vaccines against dengue: a review of current candidate vaccines at advanced development stages. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2007;21(4):254-60. Epub 2007/07/07.
196. Ghosh A, Dar L. Dengue vaccines: Challenges, development, current status and prospects. *Indian journal of medical microbiology*. 2015;33(1):3-15. Epub 2015/01/07.
197. Anderson KB, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Mammen MP, Libraty DH, Rothman AL, et al. Burden of symptomatic dengue infection in children at primary school in Thailand: a prospective study. *Lancet*. 2007;369(9571):1452-9. Epub 2007/05/01.
198. Clark DV, Mammen MP, Jr., Nisalak A, Puthimethee V, Endy TP. Economic impact of dengue fever/dengue hemorrhagic fever in Thailand at the family and population levels. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005;72(6):786-91. Epub 2005/06/21.
199. Halstead SB, Suaya JA, Shepard DS. The burden of dengue infection. *Lancet*. 2007;369(9571):1410-1. Epub 2007/05/01.
200. Shepard DS, Suaya JA, Halstead SB, Nathan MB, Gubler DJ, Mahoney RT, et al. Cost-effectiveness of a pediatric dengue vaccine. *Vaccine*. 2004;22(9-10):1275-80. Epub 2004/03/09.
201. Olsen DB, Eldrup AB, Bartholomew L, Bhat B, Bosserman MR, Ceccacci A, et al. A 7-deaza-adenosine analog is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic properties. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(10):3944-53. Epub 2004/09/25.

202. Goncalvez AP, Engle RE, St Claire M, Purcell RH, Lai CJ. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(22):9422-7. Epub 2007/05/23.
203. Balsitis SJ HE. Animal models of dengue virus infection: applications, insights, and frontiers. In: Hanley KA, Weaver SC, eds. *Frontiers in dengue virus research*. Horizon Scientific Press. 2009.
204. Keller TH, Chen YL, Knox JE, Lim SP, Ma NL, Patel SJ, et al. Finding new medicines for flaviviral targets. *Novartis Foundation symposium*. 2006;277:102-14; discussion 14-9, 251-3. Epub 2007/02/27.
205. Organization WH. REGULATORY SITUATION OF HERBAL MEDICINES. . 1998;Worldwide Review:45.
206. Valdir F. Veiga Junior ACPeMAMM. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? *Quim Nova*. 2005;28:519-28.
207. Gaspar L. Plantas Medicinais. *Pesquisa Escolar on line - Fundação Joaquim Nabuco-Pernambuco*. 2008.
208. Lage CPVeCLS. Uso de Plantas Medicinais. *Revista Arquivos FOG – Saúde, Sociedade, Gestão e Meio Ambiente*. 2008;5:33-41.
209. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports*. 2000;17(3):215-34. Epub 2000/07/11.
210. Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*. 2001;56(3):237-43. Epub 2001/03/13.
211. Cunha AP. ASPECTOS HISTÓRICOS SOBRE PLANTAS MEDICINAIS, SEUS CONSTITUINTES ACTIVOS E FITOTERAPIA. . 2004;1:1-6.
212. J. T. Poder e conhecimento dos médicos antigos. 1991:10-255.
213. B. N. Boletim árabe farmácia na Macedônia. 1961;1:20 - 7.
214. K. TG. Domestic medicinal plants. *Mozaic Book*. 2005:60-1.
215. V. D. Tratamento contemporâneo com plantas medicinais. 1992:5-43.
216. Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(1-2):131-4. Epub 2005/07/12.
217. Simões CMOea. *Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul*. Editora da UFRGS. 1998;1:150.
218. França ISXea. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista brasileira de enfermagem*. 2008;61(2):201-8.
219. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*. 2012;6(11):1-5. Epub 2012/06/02.
220. Garcia ES. *Workshop biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas. Fitoterápicos*. Campinas. 1996.
221. Teixeira AHea. CONHECIMENTO POPULAR SOBRE O USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO MUNICÍPIO DE SOBRAL-CEARÁ, BRASIL. *SANARE*. 2014;V.13(1):23-8.
222. WHO WHO-. *The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges*. Geneva. 2011.
223. (MS). BMdS. *Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica*. Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Atenção Básica. 2012;31:156.
224. al. WdCAFe. CONTEXTO HISTÓRICO, USO POPULAR E CONCEPÇÃO CIENTÍFICA SOBRE PLANTAS MEDICINAIS. *Cad Pesquisa, São Luís*. 2011;18(especial):90-5.
225. Cutler SJC, Horace G.. In: *Stephen J. Biologically active natural products: pharmaceuticals*. 2000.
226. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*. 2007;70(3):461-77. Epub 2007/02/21.
227. Volhardt KPCS, N.E. *Química orgânica: estrutura e função*. USA: Bookman. 2004;1:1112.
228. Zhang MZ, Chen Q, Yang GF. A review on recent developments of indole-containing antiviral agents. *European journal of medicinal chemistry*. 2015;89C:421-41. Epub 2014/12/03.

229. Rocha-Pereira J, Neyts J, Jochmans D. Norovirus: targets and tools in antiviral drug discovery. *Biochemical pharmacology*. 2014;91(1):1-11. Epub 2014/06/04.
230. Zhang F, Wang G. A review of non-nucleoside anti-hepatitis B virus agents. *European journal of medicinal chemistry*. 2014;75:267-81. Epub 2014/02/20.
231. Pu JY, He L, Wu SY, Zhang P, Huang X. [Anti-virus research of triterpenoids in licorice]. *Bing du xue bao = Chinese journal of virology / [bian ji, Bing du xue bao bian ji wei yuan hui]*. 2013;29(6):673-9. Epub 2014/02/14.
232. Son M, Lee M, Sung GH, Lee T, Shin YS, Cho H, et al. Bioactive activities of natural products against herpesvirus infection. *J Microbiol*. 2013;51(5):545-51. Epub 2013/11/01.
233. Teixeira RR, Pereira WL, Oliveira AF, da Silva AM, de Oliveira AS, da Silva ML, et al. Natural products as source of potential dengue antivirals. *Molecules*. 2014;19(6):8151-76. Epub 2014/06/19.
234. Muhamad M, Kee LY, Rahman NA, Yusof R. Antiviral actions of flavanoid-derived compounds on dengue virus type-2. *International journal of biological sciences*. 2010;6(3):294-302. Epub 2010/06/23.
235. Tang LI, Ling AP, Koh RY, Chye SM, Voon KG. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC complementary and alternative medicine*. 2012;12:3. Epub 2012/01/17.
236. Abd Kadir SL, Yaakob H, Mohamed Zulkifli R. Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *Journal of natural medicines*. 2013;67(4):677-89. Epub 2013/04/18.
237. Akram M, Hamid A, Khalil A, Ghaffar A, Tayyaba N, Saeed A, et al. Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2014;27(3):313-9. Epub 2014/10/04.
238. Kimura T. Natural products and biological activity of the pharmacologically active cauliflower mushroom *Sparassis crispa*. *BioMed research international*. 2013;2013:982317. Epub 2013/04/16.
239. Ferreira ABdH. *Mini-aurélio: o dicionário da língua portuguesa*. 2008;7ed.:896.
240. ANVISA ANDVS-. Resolução - RDC n.º 17, de 24 de fevereiro de 2000 ANVISA. 2010.
241. Cronquist A. *An integrated system of flowering plants*. New York: Columbia University Press. 1981:1262.
242. Robbrecht E. *Tropical woody Rubiaceae*. Opera Botanica Bélgica. 1988:1-271.
243. Judd WS, Campbell, C. S. Kellogg, E. A., Stevens, P. F. *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Inc Publishers USA. 2008.
244. Barbosa MR, Zappi, D., Taylor, C., Cabral, E., Jardim, J.G., Pereira, M.S., Calió, M.F., Pessoa, M.C.R., Salas, R., Souza, E.B., Di Maio, F.R. , Macias, L., Anunciação, E.A. da, Germano Filho, P., Oliveira, J.A., Bruniera, C.P. . *Rubiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. . Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012.
245. Souza VCL, H. *Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 2008;2 ed.
246. Lima LFea. *Morfologia de frutos, sementes e plântulas de Guettarda platypoda DC. (Rubiaceae)*. *Biota Neotropica*. 2010;10(1).
247. Barroso GMP, A. L.; Costa, C. G.; Ichaso, C. L. F.; Guimarães, E. F. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Universidade Federal de Viçosa. 1991;3:189-228.
248. Di Stasi LCH-L, C.A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: UNESP. 2002;2 ed:604.
249. Mendoza HB, R.; Ramírez, P.; Jiménez, L.C. . *Rubiaceae de Colômbia: guía ilustrada de géneros*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexandre von Humboldt. 2004:351.
250. Heitzman ME1 NC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. *Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae)*. *Phytochemistry*. January 2005;66(1):5-29.
251. Wang HB, Qi W, Zhang L, Yuan D. *Qualitative and quantitative analyses of alkaloids in Uncaria species by UPLC-ESI-Q-TOF/MS*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2014;62(11):1100-9. Epub 2014/11/05.

252. Sandoval M, Okuhama NN, Zhang XJ, Condezo LA, Lao J, Angeles FM, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2002;9(4):325-37. Epub 2002/07/18.
253. Bieski IGC. UTILIZAÇÃO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS COM ÊNFASE NA *Uncaria tomentosa* (Will) D.C., DISPENSADOS EM FARMÁCIAS DE MANIPULAÇÃO NA GRANDE CUIABÁ Universidade Federal de Lavras- Minas Gerais- Brasil. 2006.
254. Carvalho MV, Penido C, Siani AC, Valente LM, Henriques MG. Investigations on the anti-inflammatory and anti-allergic activities of the leaves of *Uncaria guianensis* (Aublet) J. F. Gmelin. *Inflammopharmacology*. 2006;14(1-2):48-56. Epub 2006/07/13.
255. de Paula LC, Fonseca F, Perazzo F, Cruz FM, Cubero D, Trufelli DC, et al. *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw) Improves Quality of Life in Patients with Advanced Solid Tumors. *J Altern Complement Med*. 2014. Epub 2014/12/17.
256. Reis SR, Valente LM, Sampaio AL, Siani AC, Gandini M, Azeredo EL, et al. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *International immunopharmacology*. 2008;8(3):468-76. Epub 2008/02/19.
257. Lima-Junior RS, Mello Cda S, Siani AC, Valente LM, Kubelka CF. *Uncaria tomentosa* alkaloidal fraction reduces paracellular permeability, IL-8 and NS1 production on human microvascular endothelial cells infected with dengue virus. *Natural product communications*. 2013;8(11):1547-50. Epub 2014/01/17.
258. Lee CC, Houghton P. Cytotoxicity of plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat cancer. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;100(3):237-43. Epub 2005/05/13.
259. Reis SR, Valente LM, Sampaio AL, Siani AC, Gandini M, Azeredo EL, et al. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(3):468-76.
260. Yin Z, Chen YL, Schul W, Wang QY, Gu F, Duraiswamy J, et al. An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(48):20435-9. Epub 2009/11/18.
261. Nair V, Chi G, Shu Q, Julander J, Smee DF. A heterocyclic molecule with significant activity against dengue virus. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2009;19(5):1425-7. Epub 2009/02/03.
262. Halstead SB, Marchette NJ. Biologic properties of dengue viruses following serial passage in primary dog kidney cells: studies at the University of Hawaii. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;69(6 Suppl):5-11. Epub 2004/01/27.
263. Miagostovich MP NR, Cavalcanti SM, Marzochi KB, Schatzmayr HG. . Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil: virological and epidemiological aspects. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1993;35:149-54.
264. Reed LJ MH. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. . *Am J Hyg*. 1938;27:493-7.
265. Schoepp RJ BB. Titration of dengue viruses by immunofluorescence in microtiter plates. . *J Clin Microbiol* 1984;29:1017-9.
266. Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*. 2005;66(1):5-29. Epub 2005/01/15.
267. Barros MCE. Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o Sistema Baculovírus de Expressão Universidade de Brasília. 2007.
268. Plummer EM, Shresta S. Mouse models for dengue vaccines and antivirals. *Journal of immunological methods*. 2014;410:34-8. Epub 2014/01/21.
269. Prieto Rodríguez JA, et al. Estudio fitoquímico de hojas de *Uncaria guianensis* y evaluación de actividad antibacteriana. *Acta Amazonica*. 2011;41(2):303-10.
270. Urdanibia I, Michelangeli F, Ruiz MC, Milano B, Taylor P. Anti-inflammatory and antitumoural effects of *Uncaria guianensis* bark. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;150(3):1154-62. Epub 2013/11/12.

271. Bors M, Michalowicz J, Pilarski R, Sicinska P, Gulewicz K, Bukowska B. Studies of biological properties of *Uncaria tomentosa* extracts on human blood mononuclear cells. *Journal of ethnopharmacology*. 2012;142(3):669-78. Epub 2012/06/12.
272. Zhang YB, Yang WZ, Yao CL, Feng RH, Yang M, Guo DA, et al. New triterpenic acids from *Uncaria rhynchophylla*: chemistry, NO-inhibitory activity, and tandem mass spectrometric analysis. *Fitoterapia*. 2014;96:39-47. Epub 2014/04/15.
273. Jang JY, Choi YW, Kim HN, Kim YR, Hong JW, Bae DW, et al. Neuroprotective effects of a novel single compound 1-methoxyoctadecan-1-ol isolated from *Uncaria sinensis* in primary cortical neurons and a photothrombotic ischemia model. *PloS one*. 2014;9(1):e85322. Epub 2014/01/15.
274. Chawla P, Yadav A, Chawla V. Clinical implications and treatment of dengue. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2014;7(3):169-78. Epub 2014/02/11.
275. Uehara PM, da Cunha RV, Pereira GR, de Oliveira PA. [Liver involvement in patients with dengue hemorrhagic fever: a rare phenomenon?]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006;39(6):544-7. Epub 2007/02/20. Envolvimento hepatico em pacientes com dengue hemorragico: manifestacao rara?
276. Lin YL, Liu CC, Chuang JI, Lei HY, Yeh TM, Lin YS, et al. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology*. 2000;276(1):114-26. Epub 2000/10/07.
277. Cheung YY, Chen KC, Chen H, Seng EK, Chu JJ. Antiviral activity of lanatoside C against dengue virus infection. *Antiviral research*. 2014;111:93-9. Epub 2014/09/25.
278. Lin YL, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Chen SH, Liu HS. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. *Antiviral research*. 2002;56(1):93-6. Epub 2002/09/27.
279. Pando-Robles V, Osés-Prieto JA, Rodríguez-Gandarilla M, Meneses-Romero E, Burlingame AL, Batista CV. Quantitative proteomic analysis of Huh-7 cells infected with Dengue virus by label-free LC-MS. *Journal of proteomics*. 2014;111:16-29. Epub 2014/07/11.
280. de Azeredo EL, Kubelka CF, Alburquerque LM, Barbosa LS, Damasco PV, Avila CA, et al. Tissue factor expression on monocytes from patients with severe dengue fever. *Blood cells, molecules & diseases*. 2010;45(4):334-5. Epub 2010/09/18.
281. Costa CASS, P.P.C. Testes de citotoxicidade em culturas de células. *Estrela C Metodologia Científica - São Paulo*. 2005;2 ed:213-30.
282. Fialho LG. Caracterização dos efeitos imunomodulador e antiviral de uma espécie da família Marcgraviaceae em modelo in vitro de infecção em linhagem de hepatócitos Huh-7 pelo vírus Dengue-2. Instituto Oswaldo Cruz. 2012.
283. Drishya Diwaker KPM, Lilly Ganju, S.B. Singh. *Rhodiola* inhibits dengue virus multiplication by inducing innate immune response genes RIG-1, MDA5 and ISG in human monocytes. Springer-Verlag Wien. 2014.
284. Mudiana Muhamad LYK, Noorsaadah Abd. Rahman and Rohana Yusof. Antiviral actions of flavonoid-derived compounds on dengue virus type-2. *Internacional Journal of Biological Sciences*. 2010;6(3):294-302.
285. Leon IC Tang APL, Rhun Y Koh, Soi M Chye and Kenny GL Voon. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complementary & Alternative Medicine*. 2012;12(3).
286. Couvelard A MP, 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. *Hum Pathol*. 1999;30(9):1106-10.
287. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2001;438(2):107-15. Epub 2001/03/17.
288. Limonta D, Capo V, Torres G, Perez AB, Guzman MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;40(1):50-4. Epub 2007/08/19.
289. Paes MV, Pinhao AT, Barreto DF, Costa SM, Oliveira MP, Nogueira AC, et al. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus. *Virology*. 2005;338(2):236-46. Epub 2005/06/18.

290. Falconar AK, Martinez F. The NS1 glycoprotein can generate dramatic antibody-enhanced dengue viral replication in normal out-bred mice resulting in lethal multi-organ disease. *PLoS one*. 2011;6(6):e21024. Epub 2011/07/07.
291. Nasirudeen AM, Wang L, Liu DX. Induction of p53-dependent and mitochondria-mediated cell death pathway by dengue virus infection of human and animal cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2008;10(10-11):1124-32. Epub 2008/07/09.
292. Vásquez Ochoa M GCJ, Gutiérrez Castañeda B, Santos Argumedo L, Villegas Sepúlveda N, Cedillo Barrón L. A clinical isolate of dengue virus and its proteins induce apoptosis in HMEC-1 cells: a possible implication in pathogenesis. *Arch Virol*. 2009;154 ((6)):919-28.
293. Long X, Li Y, Qi Y, Xu J, Wang Z, Zhang X, et al. XAF1 contributes to dengue virus-induced apoptosis in vascular endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(3):1062-73. Epub 2012/12/05.
294. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral diseases*. 2001;7(1):2-10. Epub 2001/05/17.
295. Pinto MA, Marchevsky RS, Pelajo-Machado M, Santiago MA, Pissurno JW, Franca MS, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in liver and splenic T lymphocyte rise are associated with liver histological damage during experimental hepatitis A virus (HAV) infection in *Callithrix jacchus*. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2000;52(1):3-10. Epub 2000/04/25.
296. Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *The Journal of general virology*. 2006;87(Pt 10):3003-11. Epub 2006/09/12.
297. Catarino MD A-SJ, Pereira OR, Cardoso SM. Antioxidant Capacities of Flavones and Benefits in Oxidative-Stress Related Diseases. *Curr Top Med Chem*. 2014.
298. Anuthakoengkun A IA. Inhibitory effect on nitric oxide production and free radical scavenging activity of Thai medicinal plants in osteoarthritic knee treatment. *J Med Assoc Thai*. 2014;97(8):116-24.
299. Lin CF, Chiu SC, Hsiao YL, Wan SW, Lei HY, Shiau AL, et al. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol*. 2005;174(1):395-403. Epub 2004/12/22.
300. Anderson R, Wang S, Osioy C, Issekutz AC. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *Journal of virology*. 1997;71(6):4226-32. Epub 1997/06/01.
301. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol*. 1998;161(11):6338-46. Epub 1998/12/02.
302. Chen YC, Wang SY. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *Journal of virology*. 2002;76(19):9877-87. Epub 2002/09/05.
303. Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine*. 2005;30(6):359-65. Epub 2005/06/07.
304. Wu F, Fujita J, Murota M, Li JQ, Ishida T, Nishioka M, et al. CYFRA 21-1 is released in TNF-alpha-induced apoptosis in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7. *International journal of oncology*. 2002;21(2):441-5. Epub 2002/07/16.
305. Assuncao-Miranda I, Amaral FA, Bozza FA, Fagundes CT, Sousa LP, Souza DG, et al. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(1):218-28. Epub 2009/09/25.
306. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC infectious diseases*. 2008;8:86. Epub 2008/06/27.

307. Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. Novartis Foundation symposium. 2006;277:3-16; discussion -22, 71-3, 251-3. Epub 2007/02/27.
308. Halstead SB. Dengue. *Lancet*. 2007;370:1644-52.
309. Halstead SB. Pathophysiology. Dengue. Imperial College Press, London, United Kingdom. 2008;5:265-326.
310. Setiawan AS OR, Supriatno, Soewondo W, Sidik, Supratman U. 8-hydroxycudraxanthone G suppresses IL-8 production in SP-C1 tongue cancer cells. *Natural product communications*. 2014;9(1):75-8.
311. Czerwińska ME GS, Kiss AK. Effects of an aqueous extract from leaves of *Ligustrum vulgare* on mediators of inflammation in a human neutrophils model. *Planta medica*. 2013;79(11):924-32.
312. Vogl S PP, Mihaly-Bison J, Fakhrudin N, Atanasov AG, Heiss EH, Wawrosch C, Reznicek G, Dirsch VM, Saukel J, Kopp B. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine--an unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;149(3):750-71
313. Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz AC. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *Journal of virology*. 1997;71(6):4226-32. Epub 1997/06/01.
314. Rasheed Z, Akhtar N, Khan A, Khan KA, Haqqi TM. Butrin, isobutrin, and butein from medicinal plant *Butea monosperma* selectively inhibit nuclear factor-kappaB in activated human mast cells: suppression of tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-6, and IL-8. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2010;333(2):354-63. Epub 2010/02/19.
315. Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2012;76(1):16-32. Epub 2012/03/07.
316. Corazziari E, Bytzer P, Delvaux M, Holtmann G, Malagelada JR, Morris J, et al. Clinical trial guidelines for pharmacological treatment of irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2003;18(6):569-80. Epub 2003/09/13.
317. Lewinsohn TMP, P.I. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. Editora Contexto. 2002:176.

10. ANEXOS

ANEXO A: Densidades ópticas dos tratamentos de UGC sobre Huh-7 - MTT.

24h	Média DO	SD
Controle	1.539	0.5138
Controle -	0.09846	0.02169
DMSO 0,1%	1.51	0.1623
DMSO 1%	1.374	0.3909
UGC 100 µg/mL	1.222	0.1918
UGC 50 µg/mL	1.493	0.5587
UGC 25 µg/mL	1.507	0.5364
UGC 10 µg/mL	1.532	0.5501
UGC 1 µg/mL	1.529	0.562

48h	Média DO	SD
Controle	2.061	0.16
Controle -	0.1123	0.02352
DMSO 0,1%	1.816	0.1636
DMSO 1%	1.795	0.3683
UGC 100 µg/mL	1.805	0.1962
UGC 50 µg/mL	1.855	0.3378
UGC 25 µg/mL	1.826	0.4323
UGC 10 µg/mL	1.831	0.4231
UGC 1 µg/mL	2.09	0.5279

72h	Média DO	SD
Controle	1.613	0.4782
Controle -	0.1333	0.05989
DMSO 0,1%	1.317	0.04391
DMSO 1%	1.3	0.2071
UGC 100 µg/mL	1.451	0.396
GC 50 µg/mL	1.529	0.2991
UGC 25 µg/mL	1.553	0.1971
UGC 10 µg/mL	1.586	0.4372
UGC 1 µg/mL	1.598	0.08196

96h	Média DO	SD
Controle	1.583	0.3891
Controle -	0.1276	0.05062
DMSO 0,1%	1.013	0.1237
DMSO 1%	0.9808	0.3126
UGC 100 µg/mL	1.227	0.3244
UGC 50 µg/mL	1.272	0.1742
UGC 25 µg/mL	1.232	0.1529
UGC 10 µg/mL	1.266	0.2424
UGC 1 µg/mL	1.352	0.2627

Médias das densidades ópticas (24h-96h) de células Huh-7 tratadas com diferentes concentrações de UGC, obtidas pelo ensaio do MTT.

ANEXO B: Taxas do ensaio de viabilidade (MTT) em Huh-7 tratadas com UGC comparadas com o Controle (24h-96h).

	Controle	Controle -	DMSO 0,1%	DMSO 1%	UGC 100µg/mL	UGC 50µg/mL	UGC 25µg/mL	UGC 10µg/mL	UGC 1µg/mL
24h	100	0	98,03	88,54	78,03	96,83	97,81	99,55	99,36
48h	100	0	90,55	89,44	86,88	93,34	98,13	101,84	106,28
72h	100	0	80,27	79,07	83,47	94,41	95,99	98,18	98,98
96h	100	0	60,81	58,63	75,53	78,65	79,04	90,03	92,48

Valores representando as médias das taxas da produção de Formazan, sendo n = 4 experimentos independentes, com no mínimo 3 e no máximo 8 réplicas, por ponto analisado. Em azul, taxas superiores e em vermelho, inferiores a 90% de viabilidade.

ANEXO C: Densidades ópticas dos tratamentos de UGF sobre Huh-7 - MTT.

24h	Média DO	SD
Controle	1.539	0.5138
Controle -	0.09846	0.02169
DMSO 0,1%	1.51	0.1623
DMSO 1%	1.374	0.3909
UGF 100 µg/mL	1.086	0.298
UGF 50 µg/mL	1.156	0.3365
UGF 25 µg/mL	1.238	0.3824
UGF10 µg/mL	1.433	0.4103
UGF1 µg/mL	1.442	0.4587

48h	Média DO	SD
Controle	2.061	0.16
Controle -	0.1123	0.02352
DMSO 0,1%	1.816	0.1636
DMSO 1%	1.795	0.3683
UGF 100 µg/mL	1.462	0.2776
UGF 50 µg/mL	1.553	0.1926
UGF 25 µg/mL	1.58	0.1902
UGF10 µg/mL	1.797	0.03977
UGF1 µg/mL	1.836	0.1138

72h	Média DO	SD
Controle	1.613	0.4782
Controle -	0.1333	0.05989
DMSO 0,1%	1.317	0.04391
DMSO 1%	1.3	0.2071
UGF 100 µg/mL	0.9408	0.1166
UGF 50 µg/mL	1.164	0.1711
UGF 25 µg/mL	1.285	0.3251
UGF10 µg/mL	1.485	0.1602
UGF1 µg/mL	1.513	0.545

96h	Média DO	SD
Controle	1.583	0.3891
Controle -	0.1276	0.05062
DMSO 0,1%	1.013	0.1237
DMSO 1%	0.9808	0.3126
UGF 100 µg/mL	0.7986	0.1086
UGF 50 µg/mL	1.003	0.1795
UGF 25 µg/mL	1.063	0.2944
UGF10 µg/mL	1.082	0.2383
UGF1 µg/mL	1.096	0.2095

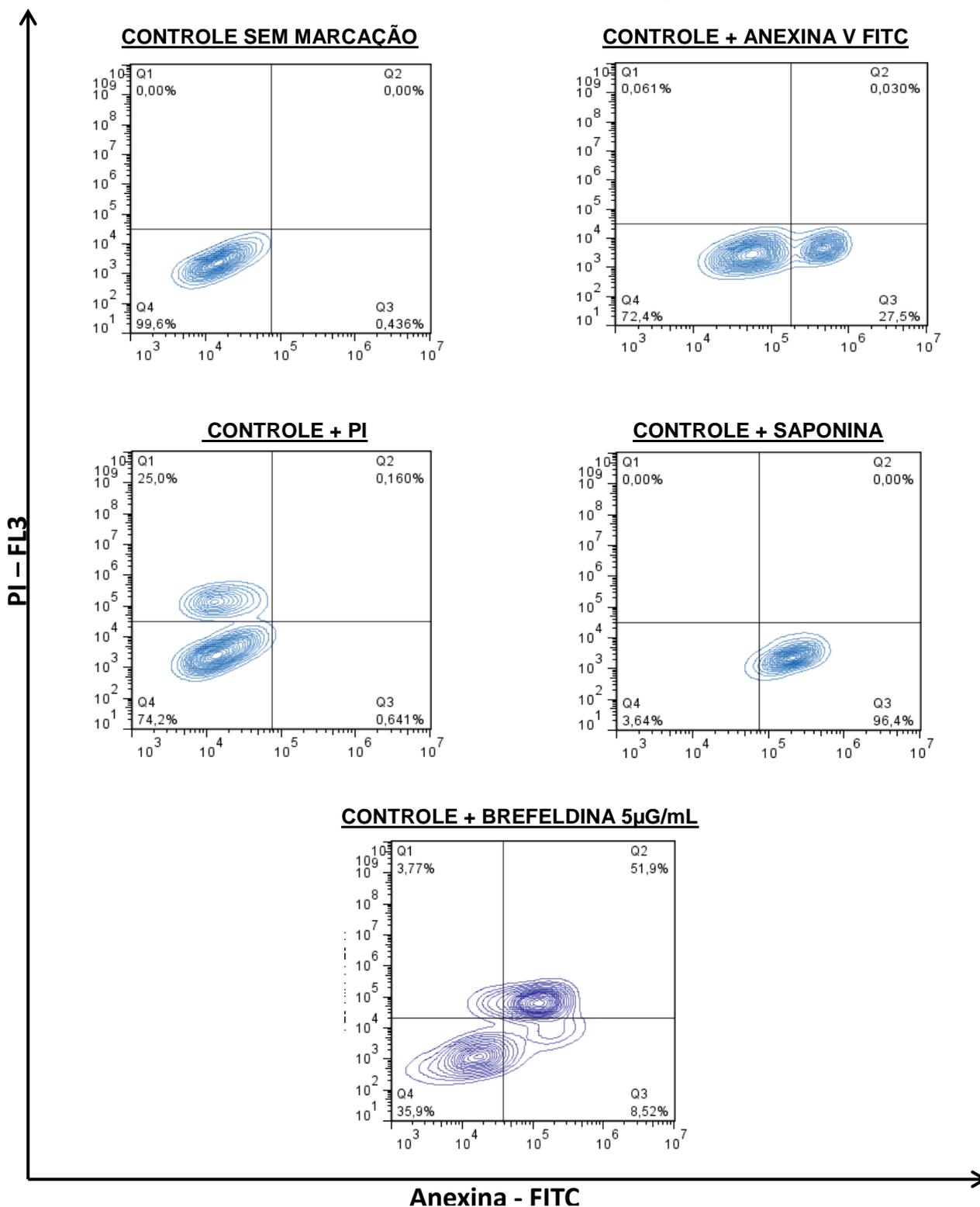
Médias das densidades ópticas (24h-96h) de células Huh-7 tratadas com diferentes concentrações de UGF, obtidas pelo ensaio do MTT.

ANEXO D: Taxas do ensaio de viabilidade (MTT) em Huh-7 tratadas com UGF comparadas com o Controle (24h-96h).

	Controle	Controle -	DMSO 0,1%	DMSO 1%	UGF 100µg/mL	UGF 50µg/mL	UGF 25µg/mL	UGF 10µg/mL	UGF 1µg/mL
24h	100	0	98,03	88,54	68,61	73,47	79,12	92,66	93,27
48h	100	0	90,55	89,44	71,75	76,57	77,99	90,02	91,59
72h	100	0	80,27	79,07	55,11	70,05	78,10	91,45	93,33
96h	100	0	60,81	58,63	46,11	60,18	64,27	65,61	66,54

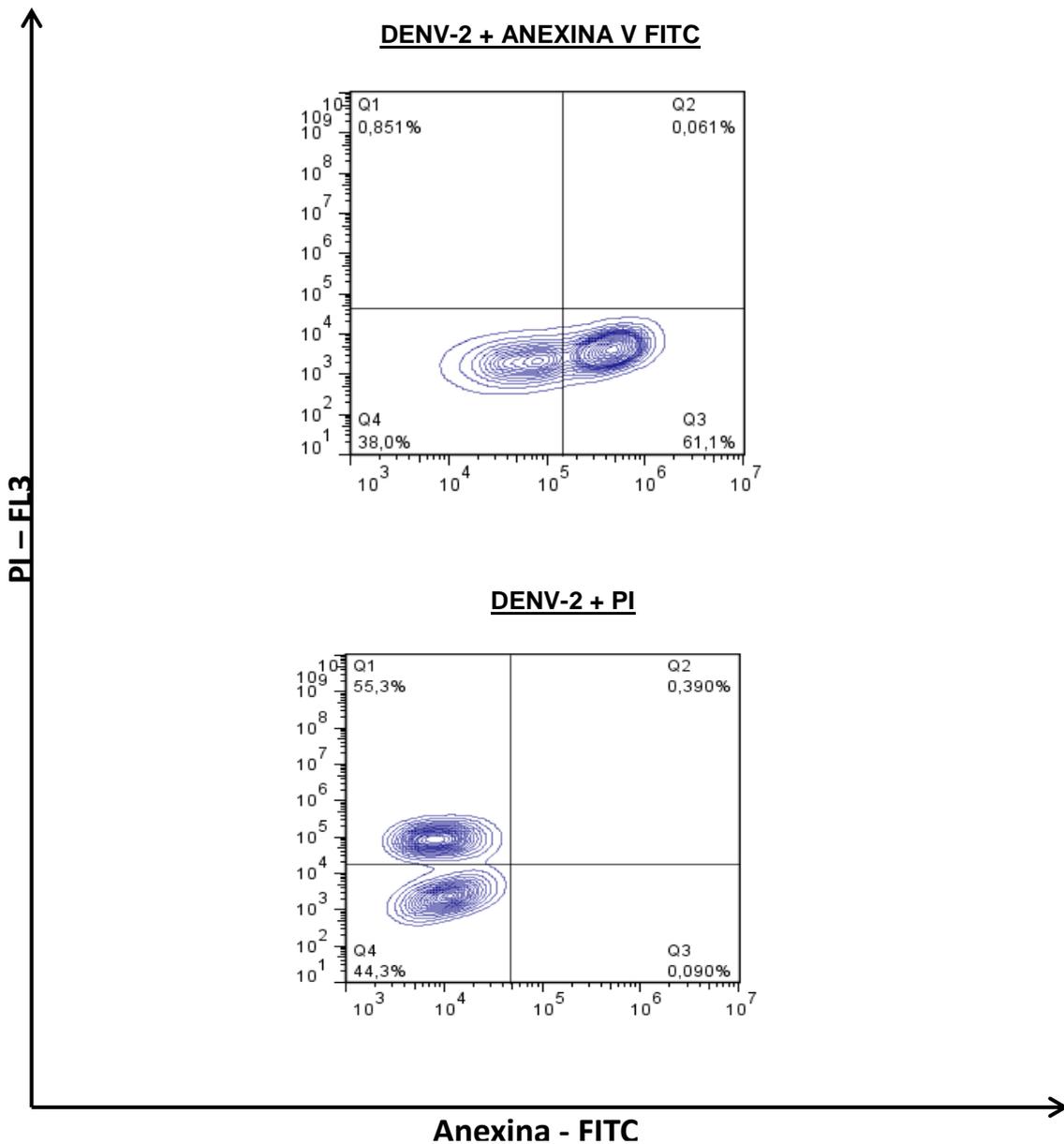
Valores representando as médias das taxas da produção de Formazan, sendo n = 4 experimentos independentes, com no mínimo 3 e no máximo 8 réplicas, por ponto analisado. Em azul, taxas superiores e em vermelho, inferiores a 90% de viabilidade.

ANEXO E : ANEXINA V FITC / PI - Controles sem Infecção.



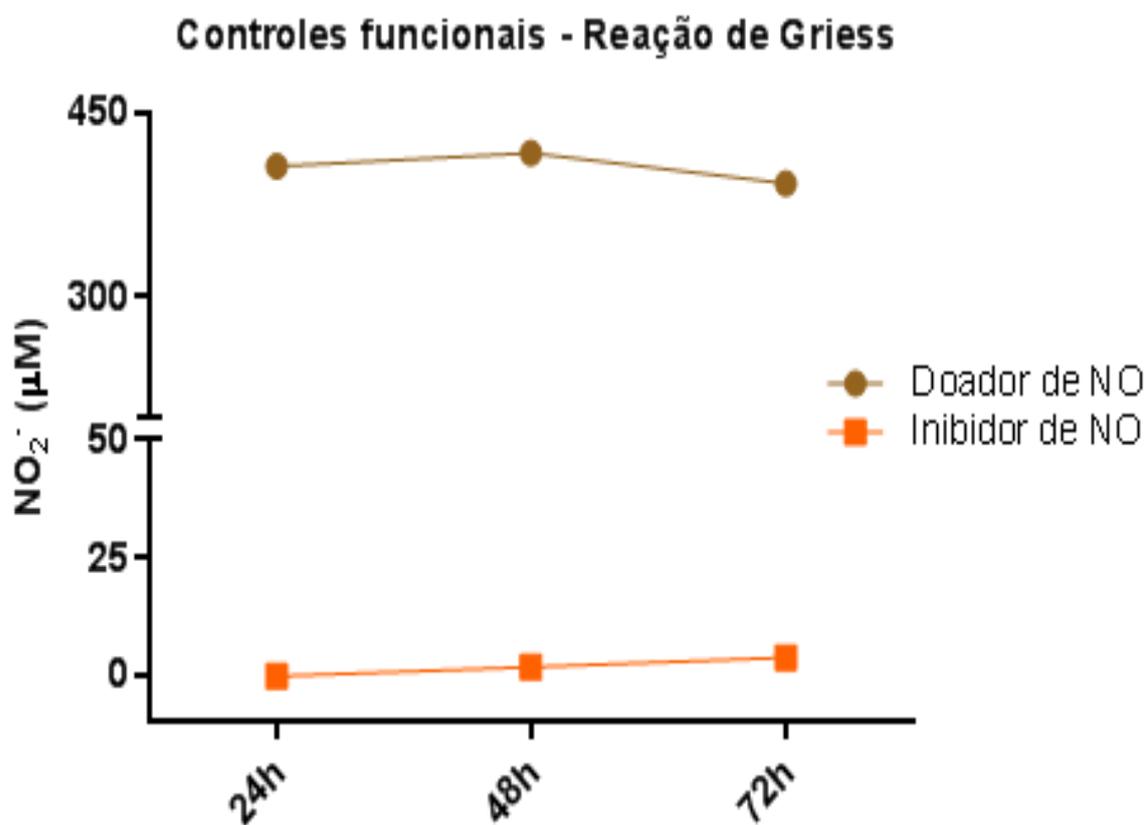
Controles funcionais utilizados nos ensaios de marcação com Anexina-FITC e PI para avaliação de apoptose e necrose em culturas de Huh-7 sem infecção.

ANEXO F : ANEXINA V FITC / PI - Controles infectados com DENV-2.



Controles funcionais utilizados nos ensaios de marcação com Anexina-FITC e PI para avaliação de apoptose e necrose em culturas de Huh-7 infectadas por DENV-2.

ANEXO G: Reação de Griess - Controles



Controles funcionais do ensaio da Reação de Griess para detecção de nitrito nos sobrenadantes de Huh-7 infectadas por DENV-2 e tratadas com Doador de NO e Inibidor de NO.

ANEXO H: Médias das Taxas de NS1.

	Médias das Taxas de NS1 (DO/CO) - Anexina V/PI		
	24h	48h	72h
CC	0,18	0,10	0,11
INAT	0,18	0,09	0,11
DENV-2	2,36	4,12	5,64
UGC CC	0,19	0,10	0,10
UGC 25µg/mL	1,95	4,16	5,59
UGC 10µg/mL	1,90	4,78	5,53
UGC 5µg/mL	2,12	4,69	5,69
UGF CC	0,17	0,09	0,13
UGF 5µg/mL	2,25	4,26	5,64
UGF 1µg/mL	2,86	4,66	5,27
UGF 0,5µg/mL	2,12	5,08	4,79
DEXA	0,95	2,28	4,11

Médias das taxas de NS1 detectadas nos sobrenadantes de células Huh-7 infectadas e tratadas, relacionando-as aos processos de apoptose e necrose verificados pelo ensaio de AnexinaV/PI.

Anexo I. Resumo dos resultados de Huh-7 DENV+ tratadas com UGC e UGF

Ensaio:		Concentração (µg/mL)													
		UGC 100	UGC 50	UGC 25	UGC 10	UGC 5	UGC 1	UGF 100	UGF 50	UGF 25	UGF 10	UGF 5	UGF 1	UGF 0,5	UGF 0,1
NS1	24h	DEL	-	-	-	-	-	DEL	DEL	DEL	-	+	-	-	-
	48h	DEL	-	BL	BL	+	-	DEL	DEL	DEL	BL	-	-	-	-
	72h	DEL	-	-	-	-	-	DEL	DEL	DEL	-	BL	-	-	-
% Ag DENV+	24h	DEL	-	-	-	-	-	DEL	DEL	DEL	-	-	-	-	-
	48h	DEL	-	-	-	-	-	DEL	DEL	DEL	-	-	-	-	-
	72h	DEL	-	BL	+	BL	+	DEL	DEL	DEL	+	+	+	+	+
MIF	24h	DEL	+	-	-	-	-	DEL	DEL	DEL	-	-	-	BL	-
	48h	DEL	+	+	-	-	-	DEL	DEL	DEL	-	-	-	BL	-
	72h	DEL	BL	+	-	-	-	DEL	DEL	DEL	-	-	BL		BL
LIVE/DEAD	24h	DEL	DEL	Live	Live	Live	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	Live	Live	Live	DEL
	48h	DEL	DEL	Live	Live	Live	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	Live	Live	Live	DEL
	72h	DEL	DEL	Live	Live	Live	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	Live	Live	Live	DEL
%Ag L/D	24h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
	48h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
	72h	DEL	DEL	-	+	+	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	+	+	DEL
Apoptose	24h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	+	-	DEL
	48h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
	72h	DEL	DEL	-	-	+	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
Necrose	24h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
	48h	DEL	DEL	+	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
	72h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
NS1 A/N	24h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
	48h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
	72h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
NO	24h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
	48h	DEL	DEL	+	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	+	+	+	DEL
	72h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
IL-8	24h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
	48h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	-	-	-	DEL
	72h	DEL	DEL	+	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	+	+	+	DEL
IL-6	24h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL				DEL
	48h	DEL	DEL	-	-	-	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL				DEL
	72h	DEL	DEL	+	+	+	DEL	DEL	DEL	DEL	DEL	+	+	+	DEL

Todos os dados apresentados na tabela são oriundos dos ensaios realizados, sendo: % Ag DENV+, atividade antiviral por citometria de fluxo. %Ag L/D, atividade antiviral por citometria de fluxo relacionado ao Live/Dead. NS1 A/N, atividade antiviral pela detecção de NS1 relacionada ao processo de apoptose e necrose. + representa significância estatística. - não houve significância. BL, tendência significativa. DEL, replicata deletada.