



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE COMPOSTOS
DERIVADOS DO ADAMANTANO PARA *Dengue virus***

Mateus Vitorino Guimarães

Belo Horizonte

2020

Mateus Vitorino Guimarães

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE COMPOSTOS
DERIVADOS DO ADAMANTANO PARA *Dengue virus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia. Versão corrigida.

Orientadora: Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Co-orientadores: Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Dra. Danielle Soares de O. Daian e Silva

Belo Horizonte

2020

043

Guimarães, Mateus Vitorino.

Avaliação do potencial antiviral de compostos derivados do Adamantano para *Dengue virus* [manuscrito] / Mateus Vitorino Guimarães. – 2020.

110 f. : il. ; 29,5 cm..

Orientadora: Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli. Co-orientadores: Dr. Flávio Guimarães da Fonseca; Dra. Danielle Soares de O. Daian e Silva.

Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Vírus da Dengue. 3. Antivirais. 3. Amantadina. 4. Adamantano. I. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. II. Fonseca, Flávio Guimarães da. III. Silva, Danielle Soares de O. Daian e. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mateus Vitorino Guimarães
Nº REGISTRO: 2018685095

Às 13:30h horas do dia 02 de Março de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Prof. Dr. Ângelo de Fátima, Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Profa. Dra. Danielle Soares de O. Daian e Silva (Coorientadora), Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Coorientador) e a Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli - Orientadora, para julgar o trabalho final "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE COMPOSTOS DERIVADOS DO ADAMANTANO PARA *Dengue virus*", do aluno **Mateus Vitorino Guimarães**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Prof. Dr. Ângelo de Fátima

Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli [Orientadora]

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca [Coorientador]

Profa. Dra. Danielle Soares de O. Daian e Silva [Coorientadora]

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do PPGM/UFMG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha dupla, a Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli. Agradeço por todo o carinho, paciência, atenção e discussões que sempre foram muito ricas e sempre me acrescentou como pessoa e como cientista. Foram anos de muito aprendizado e amadurecimento para minha vida. Dentre uma das maiores lições, aprendi a ser uma pessoa mais resiliente. Portanto, sempre serei grato por ter a oportunidade de aprender e trabalhar ao seu lado. Me sinto decoroso de fazer parte do time LVBA, e isso tudo não seria possível se você não acreditasse em mim, portanto te agradeço de coração;

Agradeço a MARAVILHOSA Dra. Danielle Daian! Por tudo que ela me ensinou no cultivo celular, no biotério e no laboratório. Pelas discussões, pela atenção e pelo suporte. Serei sempre grato por toda sua ajuda, carinho e atenção;

Ao prof. Dr. Ângelo pela síntese dos compostos e colaboração com o projeto;

Em especial à Dra. Gabriela Franco que me ensino muito desde o período da Especialização em Microbiologia e me ajudou a participar do time LVBA;

À Dra. Raissa Prado, por me ensinar tudo sobre Dengue. E por toda a sua atenção durante o período do meu Mestrado;

À Dra. Angela Serufo, pela atenção e pelos ensinamentos e discussões;

Aos Prof. Dr. Flávio da Fonseca e a Profa. Dra. Jordana dos Reis pelas discussões e pela perspectiva diferente que eles proporcionaram durante as reuniões do laboratório;

Agradeço a equipe do LVBA: Tânia, Sabryna, Cid, Karine, Thiago, Adriana, Laura, Thais, Silvinha, Eduarda e Victor;

À querida minha esposa Kenya, pela paciência e pelo apoio nos momentos mais difíceis que enfrentamos juntos;

Aos meus pais, pela vida, pelo seu amor, pela sua força e por estarem sempre presentes em minha vida. Agradeço pelo suporte financeiro e pelo carinho. Principalmente, agradeço ao meu pai Nilton pelos momentos de conversa, reflexão e sabedoria. Você sempre será meu maior conselheiro, meu mentor, meu modelo de vida! A minha mãe, não tenho palavras para agradecer todo o amor e carinho que você me deu. Obrigado por tudo queridos pais;

E agradeço a todos os meus familiares pelo suporte; em especial minha irmã pelo carinho e pelas conversas. Pelo gordinho e pela Lulu;

A minha sogra Vovó Cida e a meu cunhado Bruno, pelo carinho e atenção proporcionados aos meus filhos, nos momentos em que eu estive ausente e na cansativa rotina escolar;

Aos professores do Departamento de Microbiologia da UFMG pelas maravilhosas aulas;

Ao programa de Pós-Graduação de Microbiologia da UFMG, e aos secretários Thiago e Debora pela atenção;

Às agências de fomento FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro;

Agradeço e a todos que contribuíram de forma direta e indireta a este trabalho.

RESUMO

Os vírus encontram-se entre as principais causas de adoecimento no mundo, destacando-se o *Dengue virus* (DENV) que infecta anualmente cerca de 390 milhões de pessoas, das quais 96 milhões desenvolvem sintomas aparentes. Estima-se que 40% da população mundial encontra-se em áreas de risco para dengue. A dispersão da doença tem aumentado durante os últimos anos e atualmente o vírus encontra-se presente em 128 países. No Brasil, graves epidemias ocorreram nos últimos anos, causando um grande impacto econômico para o país e desfechos importantes nos indivíduos acometidos. Atualmente, não existe tratamento específico e eficaz para as infecções causadas pelo *Dengue virus*, sendo o cuidado médico essencial para um melhor desfecho da infecção. A busca por antivirais específicos é estratégica. Neste contexto, devido às suas propriedades farmacológicas únicas, os derivados do Adamantano aparecem como uma possibilidade, tendo demonstrado atividade antiviral comprovada para os vírus *Influenza A*, *Human immunodeficiency virus 1* e *Hepatitis C virus*. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar *in vitro* a eficácia de três compostos inéditos (ADA1, ADA2 e ADA5) derivados da Amantadina, que consiste em um grupamento funcional de NH₂ no carbono 5 do adamantano, contra o *Dengue virus 4* (DENV-4). Os ensaios *in vitro* realizados com as técnicas de MTT e AlamarBlue demonstraram que os três compostos não apresentaram citotoxicidade em células BHK-21 para as concentrações de 200 µM (com exceção de ADA5), até 0.0002 µM. Os ensaios de atividade antiviral, realizados com o ensaio de redução de placas em células BHK-21, demonstraram que os compostos ADA1 e ADA2, na concentração de 200µM, reduziram em 4 (100%) e 2 log (50%), respectivamente, os títulos virais de DENV-4. Foi observada também uma redução de cerca de 1 log (25%) no título viral de DENV-4 para os três compostos nas concentrações de 20 µM e 2 µM. Em conclusão, os compostos ADA1 e ADA2 na concentração de 200 µM apresentam potencial antiviral para o modelo estudado, DENV-4, e de acordo com os resultados preliminares esta atividade estende-se aos sorotipos DENV-1, 2 e 3.

Palavras-Chave: *Dengue virus*, Antiviral, Amantadina, Adamantano.

ABSTRACT

Viruses are among the leading causes of illness around the world, including Dengue virus (DENV), which infects approximately 390 million people every year, of which 96 million develop apparent symptoms and it is estimated that 40% of the world population are living in areas at risk of contracting Dengue. Its dispersion has increased over the last few years, and the virus is now present in 128 countries. In Brazil serious epidemics have occurred in recent years, causing a great economic impact to the country and important outcomes in the affected individuals. Currently there is no specific and effective treatment for infections caused by *Dengue virus*, and medical care is essential for a better outcome of the infection. The search for specific antivirals is strategic. Due to their unique pharmacological properties, adamantane derivatives demonstrate proven antiviral activity for *Influenza A*, *Human immunodeficiency virus 1* and *Hepatitis C virus*. Therefore, the aim of the present study is to determine *in vitro* the effectiveness of three new compounds (ADA1, ADA2 and ADA5) derived from Amantadine, which consists of a functional group of NH₂ on carbon 5 of adamantane, against *Dengue virus 4* (DENV-4). The assays performed with MTT and AlamarBlue techniques demonstrated that the three compounds did not show cytotoxicity in BHK-21 cells at concentrations of 200 μM (with the exception of ADA5) up to 0.0002 μM. The antiviral activity assay carried out by titration in BHK-21 cells (plaque reduction assay), demonstrated that the compounds ADA1 and ADA2, at a concentration of 200 μM, reduced by 4 (100%) and 2 log (50%), respectively, the titers of DENV-4. A reduction of about 1 log (25%) in the viral titer of DENV-4 was also observed for the three compounds at concentrations of 20 μM and 2 μM. In conclusion, the compounds ADA1 and ADA2 at a concentration of 200 μM present antiviral potential for DENV-4 and according to preliminary results this potential extends to the other serotypes DENV-1, 2 and 3.

Keywords: *Dengue virus*, Antiviral, Amantadine, Adamantane.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Partícula de um <i>Flavivirus</i>	22
Figura 2: Estrutura da proteína E em dímero.....	23
Figura 3: Genoma RNA de <i>Dengue virus</i>	26
Figura 4: Mecanismo de fusão de membranas da família <i>Flaviviridae</i>	28
Figura 5: Ciclo de multiplicação do DENV.....	30
Figura 6: Conceito <i>Iceberg</i> da infecção por <i>Dengue virus</i>	32
Figura 7: Cadeia de transmissão do <i>Dengue virus</i> em populações silvestres e urbanas.	36
Figura 8: Vacinação contra DENV e indicação para os respectivos grupos de risco... 41	
Figura 9: Estrutura tridimensional da molécula de Adamantano.	45
Figura 10: Estrutura química 2D da Amantadina.....	46
Figura 11: Padronização do inóculo celular para os ensaios em placas de 12 poços. 59	
Figura 12: Ensaio de citotoxicidade por MTT dos derivados da Amantadina em células BHK-21.....	60
Figura 13: Ensaio de citotoxicidade por alamarBlue dos derivados da Amantadina em células BHK-21.....	62
Figura 14: Concentração citotóxica mínima (CC ₅₀) dos compostos avaliados pelos métodos de MTT e AlamarBlue.	64
Figura 15: Curva de ciclo múltiplo para DENV-4 na MOI de 0,1.....	65
Figura 16: Ensaio de titulação viral do sobrenadante de células tratadas com ADA1 e infectadas com DENV-4 na MOI 0,1.	67
Figura 17: Ensaio de titulação viral do sobrenadante de células tratadas com ADA2 e infectadas com DENV-4 na MOI 0,1.	68
Figura 18: Ensaio de titulação viral do sobrenadante de células tratadas com ADA5 e infectadas com DENV-4 na MOI 0,1.....	70

Figura 19: Gráfico comparativo dos títulos obtidos no ensaio de titulação viral do sobrenadante de células infectadas com DENV-4 e tratadas com os compostos ADA1, ADA2 e ADA5..... 71

Figura 20: Efeito antiviral de ADA 1 e ADA 2 na concentração de 200 μ M para o DENV-4. 72

Figura 21: Ensaio de titulação viral do sobrenadante de células tratadas com ADA1 e ADA2 na concentração de 200 μ M e infectadas com DENV-1/2 ou 3 na MOI 0,1..... 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais funções das proteínas não-estruturais.	24
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- % - Porcentagem
- μL- Microlitro
- μM – Micromolar
- A. aegypti* - *Aedes aegypti*
- A. albopictus* - *Aedes albopictus*
- a.C. - Antes de Cristo
- ADA - Amantadina
- ADE - Intensificação dependente de anticorpo (do inglês, *Antibody-dependent enhancement*)
- CC₅₀ - Concentração citotóxica
- DENV - *Dengue virus*
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico
- EBOV - *Ebola virus*
- EEE - *Eastern equine encephalitis virus*
- FDA - (do inglês, *Food and Drug Administration*)
- HAV - *Hepaciviruc A*
- HCV – *Hepaciviruc C* (Vírus da Hepatite C)
- HTLV-1 – *Human T-lymphotropic virus 1*
- IgG - Imunoglobulina G
- IgM - Imunoglobulina M
- INF - Interferon
- JEV- *Japanese encephalitis virus* (Vírus da Encefalite Japonesa)
- Kb - Kilo base
- kDa - Kilo Dalton
- LIV - *Louping ill virus* (Vírus da Doença de Louping)
- m - Metros
- MAC - Complexo de ataque a membrana (do inglês, *membrane attack complex*)
- MARV - *Marburg virus*
- mL- Mililitro
- MOI - multiplicidade de infecção (do inglês, *multiplicity of infection*)
- MTT - [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio]
- NK - Células *Natural killer*

NS - Proteínas não estruturais

sNS1 - Proteína não estrutural 1 secretada

°C - Grau Celsius

OHFV - *Omsk hemorrhagic fever virus*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBL - Leucócitos de sangue periférico

pH - Potencial hidrogeniônico

POWV - *Powassan virus*

PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, *Pattern recognition receptors*)

R\$ - Reais

RE - Retículo endoplasmático

RIG-1 – Gene do ácido retinóico (*Retinoic-acid inducible gene 1*)

RNA - Ácido Ribonucleico

RpRd - RNA polimerase RNA dependente

RTPase - Trifosfatase

Spp - Espécies

TBEV - *Tick-borne encephalitis virus*

WNV - *West Nile virus*

YFV - *Yellow fever virus*

ZIKV - *Zika virus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Os Flavivírus	18
2.1.1 Família <i>Flaviviridae</i>	18
2.1.2 Gênero <i>Flavivirus</i>	19
2.2 O Dengue virus	20
2.2.1 Origem.....	20
2.2.2 Partícula Viral	21
2.2.2.1 Proteínas Estruturais.....	21
2.2.2.2 Proteínas Não-Estruturais	24
2.2.2.3 Genoma.....	26
2.2.3 Multiplicação Viral	27
2.3 A Dengue	30
2.3.1 Características Gerais da Doença.....	30
2.3.2 Epidemiologia.....	31
2.3.3 Vetores e Transmissão.....	34
2.3.4 Patogênese	37
2.3.5 Diagnóstico.....	39
2.3.6 Prevenção	40
2.3.7 Tratamento.....	42
2.4 Novas Possibilidades em Terapia Antiviral.....	44
2.4.1 O Adamantano	44
2.4.2 A Amantadina.....	45
2.4.3 A Amantadina e a Dengue	47
2.5 Os Impactos Econômicos da Dengue no Brasil	48
2 JUSTIFICATIVA	50
3 OBJETIVO	52
3.1 Objetivo Geral	52
3.2 Objetivos Específicos	52
4 METODOLOGIA	53
4.1 Produção e Manutenção das Células.....	53
4.1.1 Cultivo de Células BHK-21 e C6/36	53

4.2	Produção dos Estoques Virais	54
4.2.1	<i>Expansão de DENV-4</i>	54
4.2.2	<i>Titulação dos Estoques Virais</i>	54
4.3	Ensaio de Citotoxicidade	55
4.3.1	<i>Ensaio Colorimétrico Utilizando MTT</i>	55
4.3.2	<i>Ensaio Fluorimétrico Utilizando AlamarBlue</i>	56
4.4	<i>Ensaio de Curva de Ciclo Múltiplo</i>	57
4.5	<i>Ensaio de Atividade Antiviral</i>	57
4.5.1	<i>Análise da Produção de Partículas Infecciosas em Células Infectadas por DENV-4 e tratadas com os diferentes compostos</i>	57
5	RESULTADOS	59
5.1	Padronização do Inóculo Celular para os Ensaio em Placa	59
5.2	Avaliação da Citotoxicidade dos Derivados da Amantadina em Células BHK-21	60
5.3	Análise do Pico de Produção de Progênie Viral de DENV-4 em Células BHK-21 por Curva de Ciclo Múltiplo	64
5.4	Avaliação da Atividade Antiviral dos Derivados da Amantadina em Células BHK-21 Infectadas por DENV-4	66
5.4.1	<i>Análise da Produção de Partículas Infecciosas por Ensaio de Titulação Viral</i>	66
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÃO	81
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	82
9	ANEXOS	83
9.1	Produção científica.....	83
9.2	Organização de eventos, congressos, exposições e feiras.....	83
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma das principais arboviroses de regiões tropicais e subtropicais do mundo. É uma doença viral transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* que acomete cerca de 390 milhões de pessoas todos os anos, estimativa obtida por meio de estudos de modelagem epidemiológica. Dentre estas, 96 milhões de pessoas apresentam a sintomatologia e cerca de 20.000 casos são fatais. Desde o primeiro isolamento ocorrido em 1943 até a presente data, circulam quatro sorotipos filogeneticamente e antigenicamente distintos, *Dengue virus* sorotipos 1, 2, 3 e 4 (JOHN & RATHORE, 2019; BHATT *et al.*, 2013).

A incidência da dengue nos últimos anos tem aumentado consideravelmente e recentemente estudos demonstram que a doença está se espalhando para regiões e países da Europa, Estados Unidos, América Latina e Ásia, onde até então não se havia relato da mesma (GUZMAN, 2016).

De suma relevância também se destaca o grande impacto social e econômico em países acometidos pela epidemia, onde os pacientes requerem hospitalização e atenção médica, causando assim impactos diretos e indiretos nos sistemas de saúde pública. A dengue grave é uma das principais causas de morte entre crianças e idosos em alguns países da América Latina e Ásia. No Brasil, a doença contribui para considerável perda de produtividade laboral onde só em 2019 (semana epidemiológica 1 a 44) cerca de 1,5 milhões de casos prováveis foram notificados, ocasionando assim, algum grau de incapacidade física durante a infecção sintomática. E durante os dois primeiros meses do ano de 2020, da semana 1 até a 7 semana epidemiológica, já foram notificados 181.670, apresentando um aumento cerca de 58% em relação ao mesmo período do ano de 2019 (TREMBLAY *et al.*, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Até o momento não existe um tratamento específico para a doença, sendo o cuidado paliativo a melhor escolha e o controle vetorial a estratégia de prevenção mais consolidada. Porém, a falta de medicamentos antivirais específicos possibilita a progressão dos casos de dengue para as formas mais graves da doença devido a complexa interação entre o sistema imune e o vírus. Assim, o desenvolvimento de um antiviral capaz de bloquear o vírus em algum

momento do ciclo de multiplicação se faz urgente, necessário e de extrema importância no contexto epidemiológico atual (TREMBLAY *et al.*, 2019).

Neste âmbito, a Amantadina ou Aminoadamantano faz parte de um grupo de fármacos já aprovados pela *Food and Drug Administration* há mais de meio século e com atividade antiviral comprovada para alguns vírus como o HIV e HCV (WANKA & IQBAL & SCHREINER, 2013). Recentemente, o nosso grupo comprovou que moléculas derivadas do Adamantano possuem potencial imunomodulador para o retrovírus HTLV-1 (*Human T-lymphotropic virus 1*). Apresentando indução positiva e negativa de componentes da resposta imune inata (FRANCO, 2015). Destaca-se que a Amantadina tem importante atividade antiviral para o vírus *Influenza A* inibindo canais de prótons M^2 viral e consequente bloqueando o desnudamento e multiplicação viral. Mais especificamente, a Amantadina bloqueia a entrada de íons H^+ , para o interior do envelope viral, resultando na inibição do estímulo necessário para que o vírus modifique as proteínas do envelope e realize o desnudamento (FIELDS & KNIPE & HOWLEY, 2013). A família *Flaviviridae* possui mecanismos biológicos de penetração viral assemelhados aos do *Influenza*, e, portanto, a atividade viral da Amantadina foi testada com bons resultados para esta família na década de 80 em estudos *in vitro* e *ex-vivo* (células de seres humanos e primatas não humanos) (Koff *et al.*, 1980). Durante um surto de Dengue em Taiwan com mais de 10.000 pessoas acometidas, testou-se o uso da Amantadina, dentre outras drogas, tendo sido somente observada a melhoria dos pacientes com o fármaco destacado, embora sem protocolo científico. Em 2016, a Amantadina foi testada não somente para *Dengue virus* como também para o *West Nile virus* demonstrando redução na carga viral (BLÁZQUEZ & MARTÍN-ACEBES & SAIZ, 2016).

Diante destes resultados reportados e do impacto das arboviroses na saúde pública em todo o mundo e especialmente em nosso país, é importante dar seguimento aos resultados iniciais de nosso grupo de pesquisa, mudando agora o foco para o *Dengue virus*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os Flavivírus

2.1.1 Família *Flaviviridae*

Os vírus de RNA que utilizam uma RNA polimerase RNA dependente (RpRd) para a sua replicação foram agrupados pelo ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) em um único reino denominado *Riboviria*. Neste reino se enquadra a família *Flaviviridae* que abriga vírus que se caracterizam por serem causadores de doenças emergentes de grande importância econômica e epidemiológica para os seres humanos, dentre eles o *Dengue virus* (DENV) (HOLMES & TWIDDY, 2003; ICTV, 2019).

Segundo o ICTV (2019), o nome *Flaviviridae* foi proposto em 1984 e compreende um grupo de vírus envelopados de genoma RNA fita simples, não segmentado e de senso positivo. As partículas virais da família apresentam entre 40 – 60 nm (nanômetros) e o genoma entre 9.0 – 13 kb (quilobases). O nome da família é derivado do latim, onde *Flavus* significa amarelo e se refere ao protótipo (espécie-tipo) da família, o vírus da febre amarela (*Yellow fever virus* - YFV).

Com base em propriedades biológicas e filogenéticas, dentro da família distinguimos 4 gêneros, sendo eles: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*, apresentando 53, 14, 11 e 11 espécies de vírus, respectivamente. Os gêneros da família abrigam vírus de grande importância para os seres humanos, com destaque para o *Hepacivirus C* (HCV), causador de doenças crônicas no fígado, atingindo cerca de 71 milhões de pessoas pelo mundo (OMS, 2017b). Em contraste com a doença crônica causada pelo HCV, os principais vírus do gênero *Flavivirus*, em especial o DENV, YFV e *Zika virus* (ZIKV) causam doenças agudas com sintomas similares entre si (STANAWAY *et al.*, 2016).

2.1.2 Gênero *Flavivirus*

Sendo o maior gênero da família, apresentando 53 espécies de vírus já caracterizados, atualmente cerca de 50% das espécies do gênero causam doenças em seres humanos e recebem atenção dos sistemas públicos de saúde por serem emergentes e/ ou re-emergentes (ICTV, 2019a). Ainda no gênero, cerca de 50% dos vírus são transmitidos por mosquitos, 28% são transmitidos através de carrapatos e os demais não apresentam seu ciclo e vetores descritos. Outras espécies de vírus do gênero *Flavivirus* são conhecidas por causarem doenças em seres humanos sem a necessidade de um vetor artrópode, estas são transmitidas através de ratos e morcegos (ICTV, 2019a).

Os *Flavivirus* anteriormente eram classificados de acordo com a reatividade sorológica da proteína do envelope (E), a principal indutora de resposta imune humoral. Contudo, outras proteínas podem também induzir uma resposta imune mediada por anticorpos, como: as proteínas prM (pré-membrana) e a proteína não estrutural-1 (NS1). Desta forma, uma vez que todos os vírus do gênero são relacionados sorologicamente, pode-se obter resultados não-específicos em ensaios de ELISA e inibição da hemaglutinação (FIELDS & KNIPE & HOWLEY, 2013).

Para a definição e classificação das espécies, atualmente são levados em conta 7 critérios em uma abordagem politética. Segundo o ICTV (2019), são eles: características antigênicas, associação geográfica, relação de seus genomas e genes, associação vetor, associação hospedeiro, associação doença e características ecológicas. Como exemplo, o *Dengue virus* possui 4 sorotipos e é classificado como uma única espécie, apesar dos distintos sorotipos serem diferentes em relação à sua estrutura molecular. Porém, de acordo com a classificação, trata-se de vírus que circulam simultaneamente em uma mesma região geográfica, habitat ecológico e apresentam vetores e ciclo de transmissão similares, provocando a mesma sintomatologia / doença, sendo assim classificados como uma única espécie (ICTV, 2019).

Os *Flavivirus* podem ser encontrados em quase todas as partes do mundo e argumentos distintos sobre a origem e diversificação do gênero tem sido discutidos. Embora hipóteses preconizem o surgimento dos *Flavivirus* por volta de 10.000 anos atrás, Pettersson & Fiz-Palacios (2014) realizaram análises

bayesianas utilizando modelos de relógios moleculares relaxados e estimaram esta origem por volta de 85.000 ou 120.000 anos atrás. Estes autores discutem o fato de que o *Powassan virus*, transmitido por carrapatos e isolado em seres humanos, foi provavelmente introduzido na América do Norte durante a abertura e o fechamento da "ponte terrestre de Bering" entre 15.000 a 11.000 anos atrás, indicando uma origem mais antiga que o preconizado para os *Flavivirus*. As análises bayesianas realizadas pelos mesmos foram calibradas por data, baseando-se no evento biogeográfico da ponte terrestre de Bering e utilizando como nó de calibração interna sequências do *Powassan virus*. Estes resultados demonstraram que a disseminação dos *Flavivirus* é muito mais antiga do que se pensava, coincidindo com o surgimento do homem moderno na África, hipotetizando assim, que a grande disseminação e dispersão pelo mundo tenha se dado através da colonização do continente americano pelos asiáticos.

2.2 O Dengue virus

2.2.1 Origem

Acredita-se que o nome "Dengue" tenha sido cunhado na língua Suaíli originada da África, onde "*ki-dinga pepo*" significa "dores parecidas com câibras, produzidas pela ação de um espírito maligno", com base na observação dos sintomas apresentados (CHRISTIE, 1872; TIAN *et al.*, 2018).

Estudos filogenéticos de Holmes e colaboradores (2003), demonstraram que os 4 sorotipos de DENV compartilham uma história evolutiva recente de cerca de 1.000 anos atrás e que somente a cerca de poucas centenas de anos a transmissão endêmica passou a ocorrer em seres humanos. Existem registros na literatura de um médico chinês datados de 992 a.C. que sugerem sintomas similares aos de dengue, onde a doença foi denominada "veneno de água", pois estava relacionada a insetos voadores e a água, porém, correlação ainda muito incerta. Outros registros sugerem o surgimento de epidemias no final do século XVII, nas Américas e na Ásia (GUBLER, 1998; HOLMES & TWIDDY, 2003). Um evento marcante ocorreu durante a Segunda Guerra Mundial, em que o movimento de tropas, desmatamento e o grande número de soldados em áreas

geográficas isoladas proporcionou uma maior circulação do DENV em países Asiáticos (HALSTEAD, 1980).

O isolamento viral ocorreu pela primeira vez em 1943 por Ren Kimura e Susumu Hotta (HENCHAL & PUTNAK, 1990) e hoje se conhece 4 sorotipos filogeneticamente e antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (MESSINA *et al.*, 2014). Segundo Mustafa e colaboradores (2015), uma variante dos 4 sorotipos decorrentes, denominado de DENV-5, teria sido isolada em 2013 na Malásia, a partir do soro de uma mulher de 37 anos proveniente da área rural. Os autores destacam que o mesmo provavelmente estaria vinculado ao ciclo silvestre do DENV e que o surgimento estaria associado a pressões seletivas, recombinações genéticas e seleção natural do sorotipo DENV-2. Contudo, até a presente data nenhuma sequência foi depositada em banco mundial de dados gênicos, embora os autores tenham relatado o sequenciamento do vírus em seu trabalho.

As linhagens infectantes de seres humanos e as linhagens silvestres (circulantes em primatas não-humanos) demonstram uma grande variação genética. Porém, esta divergência não constitui uma barreira interespecie, uma vez que estes vírus apresentam reservatórios e pontes entre florestas e cidades, causando pequenos surtos (ROSSI *et al.*, 2012).

2.2.2 Partícula Viral

2.2.2.1 Proteínas Estruturais

A partícula viral madura (**Figura 1**) é composta por três (3) proteínas estruturais denominadas: proteína do envelope (E), proteína da membrana (M) e a proteína do capsídeo (C). Na camada mais externa do vírus, estão as proteínas E e M que compõem o envelope e estão ancoradas na bicamada lipídica. Abaixo da bicamada lipídica está localizado o capsídeo composto pela proteína C, protegendo assim todo o material genético. Em relação à partícula imatura, a diferença está presente na proteína pré-membrana (prM) que apresenta um peptídeo que envolve a porção de fusão da partícula viral,

impedindo que após a liberação da partícula viral esta infecte novamente a mesma célula (KUHN *et al.*, 2002).

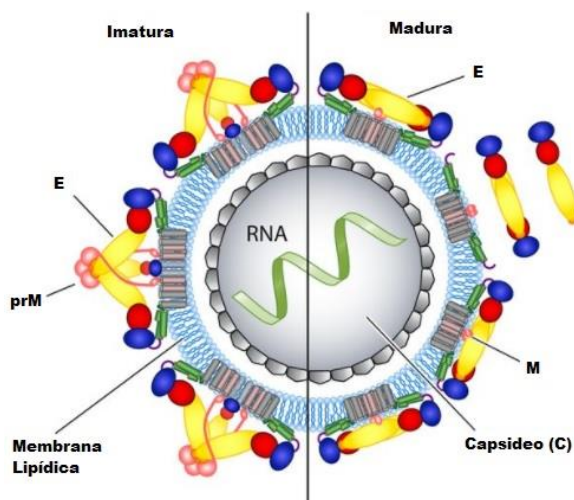


Figura 1: Partícula de um *Flavivirus*. Estrutura da partícula viral madura (à direita) e imatura (à esquerda), demonstrando a diferença entre a conformação espacial da proteína E. **Fonte:** Adaptado de VRATSKIKH *et al.*, 2013.

Sendo a principal estrutura antigênica do DENV e possuindo cerca de (~53 kDa), a glicoproteína E está envolvida no processo de adsorção e penetração do DENV que requer o reconhecimento do receptor celular, e principalmente, a fusão das membranas após a formação do endossomo. É a principal proteína reconhecida pelos anticorpos neutralizantes, possuindo 180 cópias na superfície do vírus distribuídas em 90 homodímeros de arranjos antiparalelos. Classificada como proteína de fusão classe II, apresenta três 3 subdomínios denominados I (DI), II (DII) e III (DIII). O DI está localizado na porção C-terminal da proteína E e possui a função de estabilizar a orientação geral da proteína. O DII está associado a mudanças conformacionais no momento do desnudamento e acidificação do pH do endossoma. E o DIII é o responsável pela ligação antígeno-anticorpo, apresentando epítomos importantes para utilização em ensaios sorológicos, diagnósticos e vacinas, além de ser responsável pela ligação vírus-célula (REY, *et al.*, 1995; KUHN *et al.*, 2002; MODIS *et al.*, 2003; BRESSANELLI *et al.*, 2004; CHÁVEZ *et al.*, 2010; GUZMAN *et al.*).

Os três domínios da proteína E são conservados, podendo-se observar algumas variações nos resíduos de aminoácidos e assim variações entre família

e gênero. Como exemplo, o sítio Asn-153 (**Figura 2**) é um resíduo de aminoácido comum aos *Flavivirus* e o resíduo Asn-67 é específico para *Dengue virus*, ambos estão localizados no interdomínio e apresentam papel fundamental na fusão de membranas. Uma outra função relacionada a estes sítios de glicosilação está relacionada a infectividade do vírus, por exemplo, a falta da Asn-153 originará partículas de baixa infectividade para seres humanos (MONDOTTE *et al.*, 2007; REY, FELIX A, 2003).

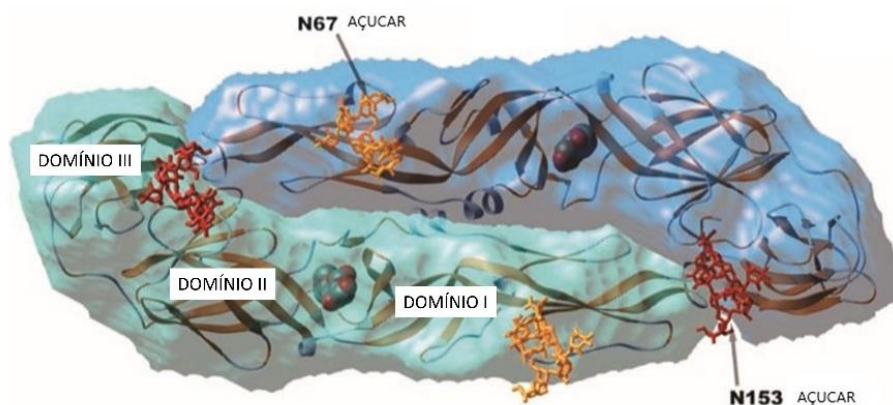


Figura 2: Estrutura da proteína E em dímero. Os três domínios da proteína E e os resíduos de aminoácidos N67 (Asn-67) e N153 (Asn-153), característicos do gênero *Flavivirus*. **Fonte:** Adaptado de REY, FELIX A, 2003.

A ancoragem da proteína E na membrana viral é realizada pelo domínio transmembrana que consiste em duas porções antiparalelas TM1 e TM2. Sua função está relacionada a fusão de membranas endossoma-viral durante e trimerização da proteína E e ao processamento da poliproteína (FRITZ *et al.*, 2011).

A proteína do capsídeo (C) é a primeira proteína sintetizada na sequência para a geração da poliproteína. Possui peso de 12 kilo Daltons (kDa) e forma homodímeros em solução, além de possuir afinidade com o ácido nucleico e lipídios da membrana (JONES *et al.*, 2003). O processo de maturação da proteína ocorre no lúmen da membrana do retículo endoplasmático, mediada pela proteína não-estrutural 3 (NS3) (BYK & GAMARNIK, 2016).

A proteína pré-membrana (prM) possui 166 aminoácidos sendo dividida em duas porções “pr” e “M”. Sua função é proporcionar a liberação da partícula viral sem que o vírus volte a infectar a mesma célula (CHAMBERS & MCCOURT

& RICE, 1990; LI *et al.*, 2008; NEMÉSIO & VILLALÁIN, 2014; OLIVEIRA & DE ALENCASTRO & HORTA, 2017).

A proteína M possui peso molecular de cerca de 7~9 kDa e possui uma cadeia de 40 aminoácidos. Está localizada abaixo da proteína E do envelope e possui propriedade transmembrana. Apresenta papel importante na indução de apoptose celular induzida pelos *Flavivirus* durante a infecção (CHAMBERS & MCCOURT & RICE, 1990; CATTEAU *et al.*, 2003).

2.2.2.2 Proteínas Não-Estruturais

As proteínas não estruturais (NS) exercem funções variadas que vão desde a montagem, clivagem e replicação até a tradução de proteínas da partícula viral. Com o auxílio de proteínas do hospedeiro, as proteínas NS modelam a organização interna da maquinaria celular, proporcionando a evasão do vírus do sistema imune. Na **Tabela 1** encontra-se o resumo das principais funções das proteínas NS (LINDENBACH & RICE, 1999).

Tabela 1: Principais funções das proteínas não-estruturais. Fonte: Adaptado de GUZMAN *et al.*, 2016.

Proteína	Tamanho	Características	Principais funções
NS1	46 kDa	Pode ser ancorada no Retículo Endoplasmático, membrana-associada ou secretada (sNS1).	NS1 intracelular está envolvida na replicação precoce do RNA. sNS1 ativa o sistema imune e está envolvida no extravasamento vascular.
NS2A	22 kDa	Proteína hidrofóbica integral da membrana.	Envolvida na replicação do RNA.
NS2B	14 kDa	Pequena proteína hidrofóbica.	Cofator para NS3.
NS3	69 kDa	Proteína multifuncional, com muitos domínios catalíticos.	Envolvida nas funções da Nucleosídeo-Trifosfatase de nucleotídeos e protease / helicase durante a síntese de RNA.
NS4A	16 kDa	Proteína hidrofóbica integral da membrana.	Necessária para a formação de vesículas de replicação.
NS4B	30 kDa	Pequena proteína hidrofóbica.	Suprime a sinalização de IFN- β e IFN- γ .
NS5	105 kDa	A maior e mais conservada dentre as proteínas do <i>Dengue virus</i> .	Envolvida na síntese de RNA. Envolvida no bloqueio do sistema IFN.

A proteína não estrutural 1 (NS1) é uma glicoproteína multifuncional que possui homologia entre os *Flavivirus* (MULLER & YOUNG, 2013) e contém 2 sítios de glicosilação, Asn-130 e Asn-207. Este último sítio se demonstra importante para a replicação viral do DENV, pois como sugere Fan e colaboradores (2014) a alteração do aminoácido reduz significativamente o tamanho da placa de lise e provoca a redução dos efeitos citopáticos do vírus.

Além disso, a NS1 demonstra um papel importante na maturação e secreção da partícula e sua atividade está relacionada a evasão do sistema imune (WATTERSON & MODHIRAN & YOUNG, 2016). Atualmente, pesquisas de biomarcadores para diagnóstico tem utilizado a NS1 como alvo por ser uma proteína altamente imunogênica, estimuladora de resposta imune, sendo encontrada no plasma sanguíneo durante e após o período de viremia (FAN & LIU & YUAN, 2014).

A proteína NS2A é o principal constituinte do complexo de replicação viral no momento da montagem. Caracteriza-se por antagonizar a resposta imune do hospedeiro, inibindo a sinalização de interferon tipo I (INF) (CHAMBERS & MCCOURT & RICE, 1990; FALGOUT *et al.*, 1991; FIELDS & KNIPE & HOWLEY, 2013).

A proteína NS3 possui dois domínios na porção N-terminal e C-terminal, protease e helicase, respectivamente. Está envolvida em várias atividades enzimáticas essenciais para a replicação do RNA genômico viral, onde realizará clivagens proteolíticas da poliproteína, produto da síntese do genoma senso positivo. NS3 demonstra ainda atividade de RNA trifosfatase (RTPase) que sintetiza a estrutura CAP-5' (BENARROCH *et al.*, 2004; SHANNON *et al.*, 2016).

Uma característica do complexo de proteínas NS2B-NS3 é dispor de porções alvos para antivirais. Como exemplo, o Boceprevir apresenta atividade proteásica capaz de inibir e bloquear a atividade da proteína NS3 em HCV (CABARCAS-MONTALVO *et al.*, 2016; FOOTE & SPOONER & BELLIVEAU, 2011). Um outro fármaco usado para o tratamento de HCV, Sofosbuvir foi testado contra o DENV e o YFV e demonstrou atividade antiviral, bloqueando a atividade da polimerase NS5, inibindo assim a replicação do virus em experimentos *in vitro* e *in vivo* (FREITAS *et al.*, 2019).

NS4A e NS4B são proteínas que desempenham um papel importante no complexo de replicação. NS4A regula o complexo de replicação através de

comunicações moleculares com o genoma. NS4B interage com o domínio helicase de NS3 para a dissociação de NS3 da fita simples após o desdobramento da dupla fita de RNA. Assim como NS2A, a NS4B possui atividade antagonista bloqueando sinais de INF do tipo I (MILLER, S. *et al.*, 2007; TEO & CHU, 2014; ZOU *et al.*, 2015).

A proteína NS5 é altamente conservada em *Flavivirus*, sendo a maior proteína codificada pelo DENV. A porção C-terminal de NS5 possui atividade RpRd, enquanto que a porção N-terminal, assim como a NS3, atua na formação do CAP 5' de RNA, possuindo propriedades 2'-O metiltransferase (MTase) (EGLOFF *et al.*, 2002; MALET *et al.*, 2007).

2.2.2.3 Genoma

O genoma (**Figura 3**) apresenta aproximadamente 11 kb de extensão, contém uma única fase de leitura aberta (ORF – *Open Reading Frame*), é flanqueado por extremidades 3' e 5' não traduzidas (UTR – *Untranslated Regions*) e funciona como mRNA. A região 5' possui uma estrutura CAP tipo 1 (m^7GpppN^m -RNA) e serve para o reconhecimento do sítio de entrada do ribossomo protegendo-o de exonucleases. A adição de CAP 5' irá assegurar que o vírus produza a poliproteína usando a maquinaria do hospedeiro. Diferente de outras estruturas genômicas, a região 3' não possui uma cauda poliadenilada. Estas duas regiões formam estruturas tridimensionais que são importantes no processo de replicação e tradução. O genoma codifica uma poliproteína contendo 3.000 aminoácidos que posteriormente sofre clivagens pós-traducionais (MANZANO *et al.*, 2011; THURNER *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2015).

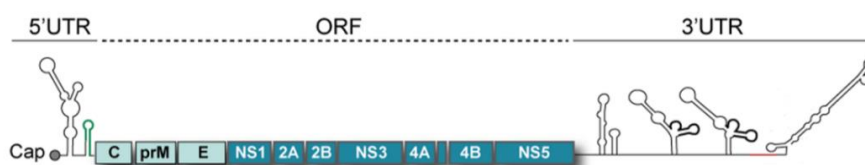


Figura 3: Genoma RNA de Dengue virus. Região 5' e 3' não traduzidas demonstrando as estruturas tridimensionais e a ORF indicando as proteínas estruturais e não estruturais. Na extremidade 5', o Cap. C: capsídeo, prM: Pre-membrana, E: envelope, NS1-5: não estrutural. **Fonte:** Adaptado de GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011.

Os sorotipos DENV-1-4 diferem entre si em cerca de 25-40% dos aminoácidos e portanto possuem genótipos diferentes (BYK & GAMARNIK, 2016).

2.2.3 Multiplicação Viral

O ciclo do DENV se inicia com a picada de um mosquito infectado pelo vírus em um hospedeiro susceptível. O DENV pode se multiplicar em várias células, dentre elas: células hepáticas, renais, linfoides, musculares, epiteliais e células do baço (GUZMAN *et al.*, 2016; UPANAN & KUADKITKAN & SMITH, 2008). As células que apresentam maior importância na adsorção inicial / ligação ao receptor celular são células do sistema mononuclear fagocitário, dentre elas os macrófagos, células dendríticas (DC - *Dendritic Cell*) e monócitos (MAROVICH *et al.*, 2001; TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003).

O processo de adsorção viral se inicia com a ligação ao receptor celular específico, e acredita-se que possa ser mediada pelo domínio III da proteína E (HUERTA *et al.*, 2008). Os receptores celulares já caracterizados são: em células dendríticas, molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 e específica das DCs (DC-SIGN – *Dendritic Cell - Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing-Non-integrin*) (TASSANEETRITHEP *et al.*, 2003); em macrófagos: receptores de manose (MILLER, J. L. *et al.*, 2008); células hepáticas: receptores laminina (THEPPARIT & SMITH, 2004); e em monócitos e macrófagos receptores: HSP90 (*Heat shock protein-90*) e HSP70 (*Heat shock protein-70*) (REYES-DEL VALLE *et al.*, 2005). Recentemente, Dejarnac e colaboradores (2018) descreveram o primeiro receptor *bona fide*, ou seja, aquele que participa diretamente da internalização do vírus. O receptor é denominado de TIM-1 e está presente nos poços de clatrina, sendo assim internalizados juntamente na formação do endossoma. Alguns estudos vêm demonstrando a importância deste receptor na infectividade viral de outros vírus, como: *Ebola virus* (EBOV), *Marburg virus* (MARV), *Lassa virus*, *Hepacivirus A* (HAV), HCV e *Japanese encephalitis virus* (JEV). Apesar de possuir alguns receptores e tipos celulares já relacionados para o DENV, muitas lacunas acerca

dos mecanismos de penetração e desnudamento ainda existem (GUZMAN *et al.*, 2016; CHU *et al.*, 2019).

A próxima fase é a penetração e acredita-se que este processo ocorra por endocitose mediada por receptor clatrina-dependente (HUERTA *et al.*, 2008; SWAMINATHAN & KHANNA, 2009). Embora estudos de Lim e colaboradores (1999) utilizando microscopia eletrônica demonstraram que a penetração também possa ocorrer pela fusão entre a membrana plasmática e a membrana do vírus, este modelo de penetração não condiz com o relatado em outros estudos sobre *Flavivirus* (FIELDS & KNIPE & HOWLEY, 2013). No citoplasma da célula hospedeira, ocorre a acidificação do endossoma que inicia as mudanças conformacionais na proteína E, expondo o *looping* de fusão do domínio II e possibilitando a fusão das membranas endossomal e viral, liberando assim o nucleocapsídeo (CLYDE & KYLE & HARRIS, 2006; HEINZ & STIASNY & ALLISON, 2004) (**Figura 4**).

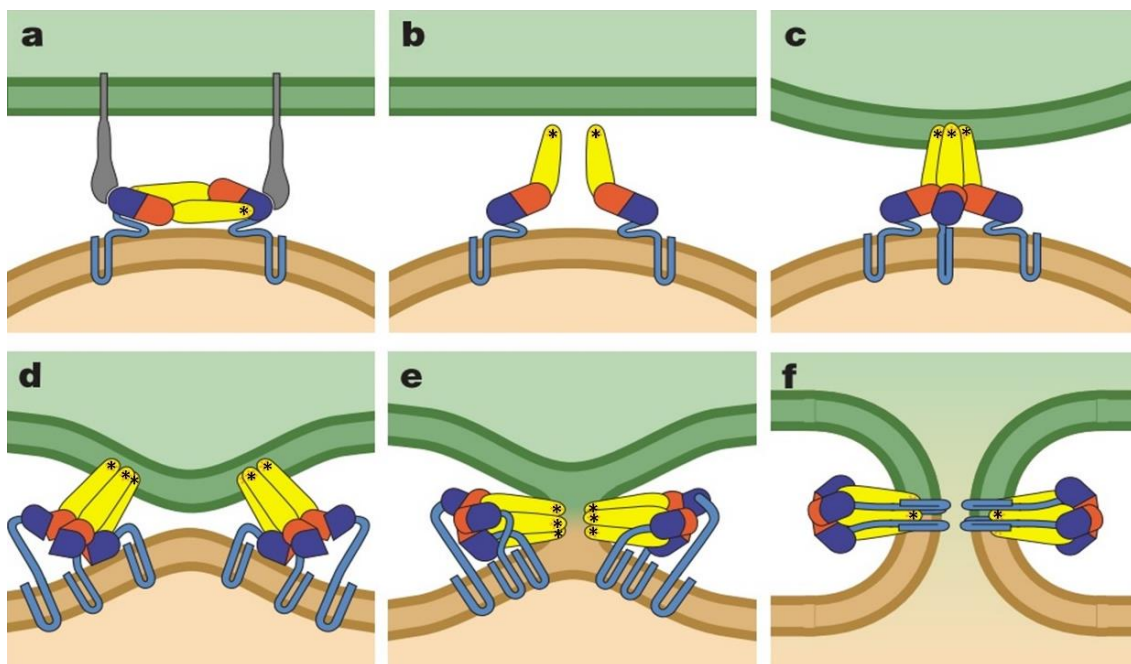


Figura 4: Mecanismo de fusão de membranas da família *Flaviviridae*. **A:** O receptor celular se liga ao domínio III (azul-escuro) da proteína E. **B:** Após a redução de pH, ocorre uma mudança conformacional e o domínio II (amarelo) fica exposto com as pontas do *looping* de fusão (asterisco) voltadas para a membrana do endossoma. **C:** O *looping* de fusão se insere na camada de hidrocarbono da membrana do hospedeiro, ocorrendo a formação de trímeros. **D:** O domínio III (azul-escuro) dobra e altera a sua conformação fazendo com que as membranas se movam em direções opostas. **E:** As membranas se fundem e o trímero se move em direções opostas. **F:** Formação do poro de fusão lipídico. **Fonte:** Adaptado de MODIS *et al.*, 2004.

No citoplasma o genoma é codificado em uma única e longa poliproteína, que será clivada pelas proteases virais NS2 ou NS3 e por proteases do hospedeiro. Posteriormente, as proteínas NS recebem sinais de endereçamento para o retículo endoplasmático (RE) para a replicação do genoma. Uma cópia negativa é sintetizada e servirá de molde para mais fitas RNA senso positivo. O lado citosólico da proteína NS2A realiza o recrutamento da região 3'UTR do genoma viral e do complexo C-prM-E para o sítio de montagem viral. As fitas recém-sintetizadas apresentam nos últimos 285 nucleotídeos da região 3'UTR o sinal de recrutamento para a formação do nucleocapsídeo. A formação de um heterodímero entre prM e E no lúmen do RE posteriormente irá envolver o nucleocapsídeo para a formação da partícula imatura. A partícula é então carregada pela via secretória celular para a maturação no trans-Golgi que possui um pH menor (pH 6.7) do que o retículo endoplasmático (pH 7.2). Este sinal de pH faz com que a partícula altere as conformações proteicas de prM e E, permitindo a clivagem de prM para a forma madura da proteína M. A partícula é liberada com o peptídeo "pr" que irá prevenir a fusão da partícula na célula infectada. O processo de liberação se dá através de exocitose (GUZMAN *et al.*, 2016; RODENHUIS-ZYBERT & WILSCHUT & SMIT, 2010; XIE *et al.*, 2019). O ciclo de multiplicação viral está esquematizado na **Figura 5**.

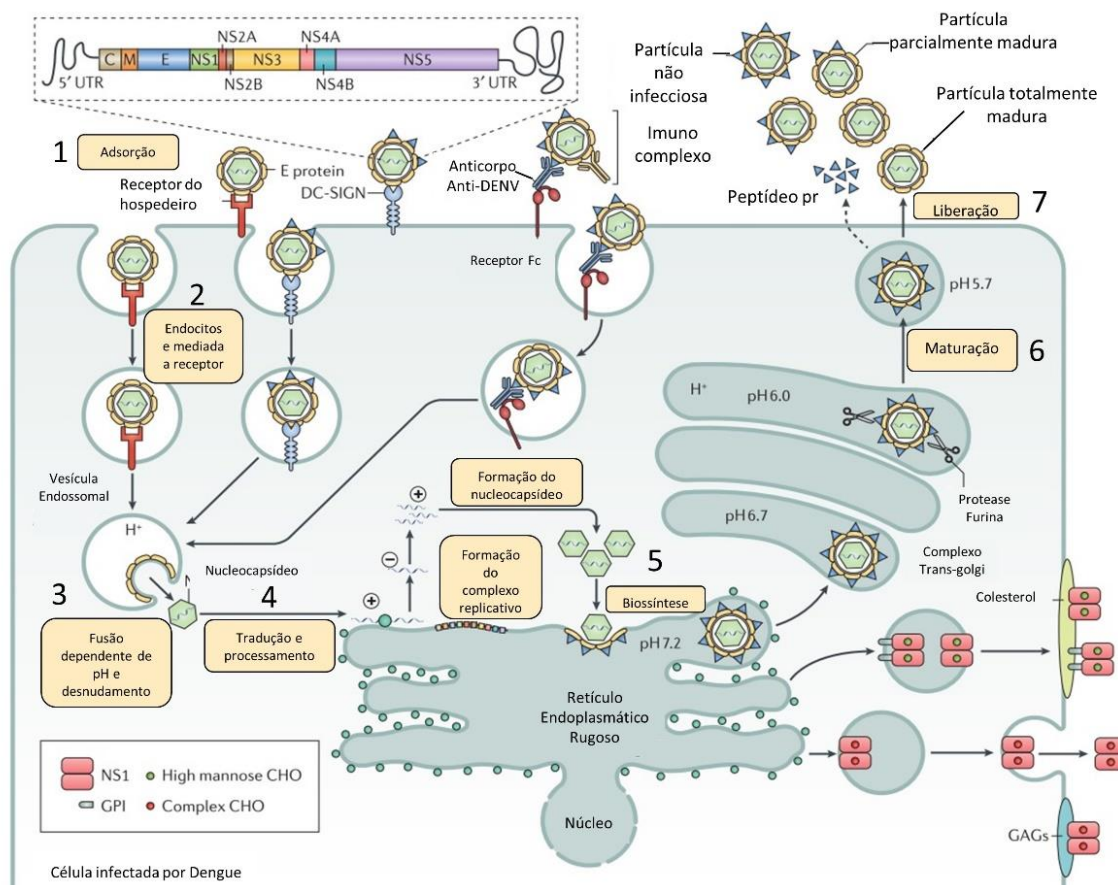


Figura 5: Ciclo de multiplicação do DENV. 1: O processo se inicia pela adesão ao receptor celular. 2: A penetração é realizada por endocitose mediada por receptor. 3: A acidificação do pH libera o nucleocapsídeo no citosol. 4: O genoma positivo serve de molde para a produção de RNA senso negativo que, por sua vez, irá servir de molde para a produção de mais genomas virais. 5: Segue-se ao processo de biossíntese das proteínas virais. A partícula imatura associada ao RE é transportada para o trans-golgi, 6 e 7 sofrendo maturação e sendo posteriormente liberada por exocitose. **Fonte:** Adaptado de GUZMAN *et al.*, 2016.

2.3 A Dengue

2.3.1 Características Gerais da Doença

A infecção por *Dengue virus* é caracterizada por uma miríade de sintomas que variam de assintomático / uma leve febre, até casos graves de febre hemorrágica e síndrome do choque. Após a nova classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), podemos distinguir as manifestações da doença em: - *Dengue sem sinais de alarme*: Apresenta pelo menos dois

sintomas dentre náuseas, vômitos, cefaleia, erupção cutânea, dores oculares, musculares e nas articulações, leucopenia e positivo para teste do laço; - *Dengue com sinais de alarme*: Inclui os sinais/ sintomas anteriores com a presença de dor abdominal, vômito persistente, ascite, efusão pleural, sangramento de mucosas, letargia, hepatomegalia, e/ ou hematócrito com decréscimo de plaquetas; - *Dengue grave*: Ocorre quando se observa o extravasamento plasmático, sangramento volumoso e falha múltipla de órgãos.

Até o momento, o arsenal terapêutico contra dengue é limitado a cuidados médicos e reposição de líquidos, não existindo um tratamento específico para a doença (TREMBLAY *et al.*, 2019).

2.3.2 Epidemiologia

A epidemiologia do DENV é complexa, pois na perspectiva da ecologia do vetor a transmissão será influenciada pelo comportamento do mosquito e por variáveis como: temperatura, sazonalidade, precipitação pluviométrica, população imunizada e sorotipo circulante (DESCLOUX *et al.*, 2012; LIU-HELMERSSON *et al.*, 2014).

A incidência da dengue nos últimos anos tem aumentado consideravelmente atingindo 128 países e, atualmente, mais de 40% da população mundial encontra-se vulnerável a infecção. Até a década de 1970, 9 países sofreram epidemias graves de dengue e recentemente estudos demonstram que a doença está se espalhando para regiões e países da Europa, Estados Unidos, América Latina e Ásia, onde até então não se havia relato da mesma. Estudos epidemiológicos estimam que 390 milhões de pessoas contraem dengue anualmente e dentre elas 96 milhões apresentam sintomas aparentes (BHATT *et al.*, 2013; LEE & LIU & YANG, 2012; OMS, 2017c).

A dengue é um grande problema de saúde pública e causa grande impacto econômico nos países em desenvolvimento. O primeiro registro bem documentado de um surto de Dengue Hemorrágica foi reportado pela OMS em 1956, onde foram observados 1.207 casos e deste momento em diante estudos demonstram que a sua incidência e morbidade vêm aumentando cerca de 30 vezes nas últimas décadas (HALSTEAD, 1980; OMS, 2009).

O principal problema epidemiológico consiste na falta de relatos apropriados, nos quais os casos são mal classificados. Esta ineficiência deve-se à falta de recursos para o diagnóstico e ao fato de que os países só notificam os casos confirmados em laboratório que, por sua vez, representam a minoria (BHATT *et al.*, 2013). A **Figura 6** representa o conceito “iceberg” da infecção por *Dengue virus* onde apenas parte das infecções apresentam a sintomatologia sendo então notificadas, dificultando a estimativa real de indivíduos acometidos.

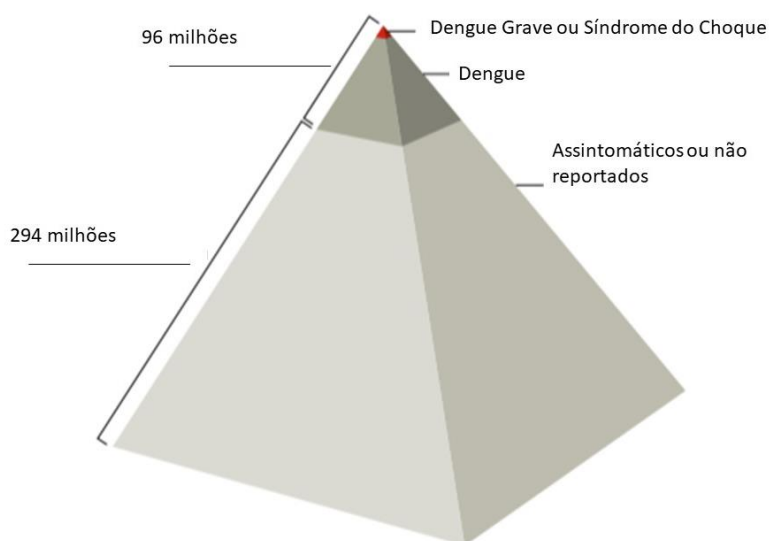


Figura 6: Conceito *iceberg* da infecção por *Dengue virus*. Os casos assintomáticos representam a maioria das infecções e mesmo que não apresentam a sintomatologia, a baixa carga viral representa importante reservatório da doença. E cerca de 5% das infecções sintomáticas representam os quadros grave e hemorrágico da doença. **Fonte:** Adaptado de JOHN & RATHORE, 2019.

Estudos de coorte realizados na Nicarágua em 2010, demonstraram que o número de casos de dengue é cerca de 21 vezes maior em relação aos casos reportados pelo Sistema Nacional de Vigilância local (STANDISH *et al.*, 2010), indicando assim a possível negligência dos governos em relação à epidemiologia do DENV. Este dado se mostra ainda mais alarmante quando se analisa a condição de indivíduos assintomáticos como reservatórios silenciosos do vírus e da doença (CASTRO; WILSON; BLOOM, 2017).

No Brasil, campanhas eficientes durante as décadas de 1930 e 1940 foram estabelecidas para a erradicação do *Aedes aegypti* (principal vetor do ciclo

urbano). Porém, durante a década de 1980, a falta de programas contra o vetor culminou na reintrodução do sorotipo DENV-1 e, conseqüentemente, em sua disseminação para diversas cidades e estados causando várias epidemias durante os anos subsequentes. Nos anos 1990 os DENV-1 e 2 apresentaram maior prevalência no Rio de Janeiro e no início do século XXI o DENV-3 foi introduzido (BARRETO & TEIXEIRA, 2008; BRAGA & VALLE, 2007; CHIEFFI, 1985; HALSTEAD, 1980). Metanálises de Guo e colaboradores (2017), sugerem que no período de 1990 a 2015 prevaleceram infecções do sorotipo DENV-2 e co-infecções de mais de um sorotipo ocorreram em cerca de 48% dos surtos epidemiológicos registrados, resultando em uma taxa de mortalidade de 2,0%. Ainda neste estudo, registrou-se um padrão global para infecção onde 54,5% eram homens com idade média de 30 anos. Segundo o Ministério da Saúde (2018), no Brasil o sorotipo mais predominantemente registrado durante o período de 2009 a 2016 foi o DENV-1, porém em 2017 foi constatado uma mudança na circulação de DENV-1 para DENV-2. Pelo mundo esta proporção varia de acordo com regiões determinadas pela OMS.

No ano de 2019 no Brasil, da semana epidemiológica 1 e 49 (30/12/2018 a 07/12/2019) foram registrados 1.527.119 casos prováveis da doença onde os estados de São Paulo, Espírito Santo e Minas Gerais representam juntos 64,7% desta estatística. Em relação aos casos graves da doença, foram confirmados no Brasil 1.388 casos de dengue grave e 18.328 casos de dengue com sinais de alarme. E em relação aos óbitos, foram confirmados 754 casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Segundo a Prefeitura de Belo Horizonte (PBH), o município se destaca por 3 grandes epidemias, sendo elas nos anos de 2010, 2013 e 2016 com 50.025, 96.126 e 154.615 casos confirmados, respectivamente. Em 2019, até 26/12/2019 foram confirmados 116.458 casos de dengue. No ano de 2020 até o dia 28 de março, na região Leste da capital foi a que concentrou o maior número de casos de dengue apresentando: 121 dos 362 casos confirmados. O monitoramento das arboviroses no município de Belo Horizonte é realizado continuamente através de análises epidemiológicas e por meio do mapa de intensidade de casos levantado em uma determinada região. Além disso, o vetor também é monitorado por meio de armadilhas de oviposição (PBH, 2019).

2.3.3 Vetores e Transmissão

O gênero *Aedes* é o principal vetor transmissor da dengue relacionado a maioria dos casos epidemiológicos, sendo a espécie *A. aegypti* a de principal relevância devidos às suas aptidões biológicas, ecológicas, taxas de disseminação e capacidade vetoriais maiores do que qualquer outra espécie do gênero (HIGA, 2011; HOPP & FOLEY, 2001). O gênero *Aedes* é o principal vetor transmissor da dengue relacionado a maioria dos casos epidemiológicos, sendo a espécie *A. aegypti* a de principal relevância devidos às suas aptidões biológicas, ecológicas, taxas de disseminação e capacidade vetoriais maiores do que qualquer outra espécie do gênero (HIGA, 2011; HOPP & FOLEY, 2001).

A dengue é transmitida principalmente pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti*, mas também pelo vetor secundário *Aedes albopictus*, ambos presentes na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo (OMS, 2009). Originado da África subsaariana o *A. aegypti* possui a característica de se adaptar facilmente ao ambiente criado pelo homem, fato que se comprova pela sua re-infestação em áreas onde os mesmos haviam sido erradicados. Estudos de alcance de voo dos mosquitos sugerem e reforçam a hipótese de que os seres humanos são os principais disseminadores do vírus, uma vez que *A. aegypti* está limitado a um perímetro de cerca de 400 metros em espaços peridomiciliares. A globalização de um modo geral também proporcionou a sua disseminação a partir do século XVII, se espalhando para outros países do hemisfério ocidental e em países do mediterrâneo, Ásia e para ilhas do Pacífico durante os períodos subsequentes (DYE, 1992; GUBLER, 2002; HONÓRIO *et al.*, 2003). A distribuição geográfica do *A. aegypti* abrange áreas equatoriais, tropicais e subtropicais sendo limitada a climas onde o inverno possui uma média de 10 °C (HOPP & FOLEY, 2001). Em países montanhosos com altitudes acima de 1.600m e 1.900m, o risco de infecção é raro, porém existem relatos de surtos de dengue em cidades acima de 2.000m de altitude, estando correlacionados a mudanças climáticas e de adaptação do vetor (LOZANO-FUENTES *et al.*, 2012; WATTS *et al.*, 2017). Covariáveis como: precipitação pluviométrica, temperatura, urbanização, acessibilidade e desigualdade social, também influenciam na distribuição de *A. aegypti* (BHATT *et al.*, 2013).

O segundo vetor de importância na transmissão da doença é a espécie *A. albopictus*. Procedente de florestas asiáticas o mosquito é conhecido popularmente como “mosquito tigre asiático” e até a década de 1980 era restrito ao seu sítio de origem. Porém, devido à intensa globalização e comércio entre países, principalmente via marítima, o mosquito se disseminou para vários países europeus, americanos e africanos (GUBLER, 2002). Ao contrário do *A. aegypti* o mosquito *A. albopictus* não é de ambiente doméstico, portanto, possui hábitos mais restritos a árvores e vegetações sendo encontrado principalmente em áreas rurais e suburbanas. Sua distribuição inclui regiões tropicais e temperadas, explicando assim surtos envolvendo o *Chikungunya virus* (CHIKV) em países europeus (CHAN & CHAN & HO, 1971).

Embora os vetores apresentem habitats específicos, *A. aegypti* e *A. albopictus*, estão sofrendo alteração de comportamento geográfico devido ao aquecimento global. O aumento da temperatura proporciona uma sobrevivência maior e conseqüentemente maior reprodução. Outros fatores como transporte marítimo e aéreo vêm resultando na introdução dos mosquitos em lugares onde antes não existiam (BESERRA *et al.*, 2009; HIGA, 2011).

O DENV é transmitido entre humanos durante o repasto sanguíneo realizado pelos mosquitos *A. aegypti* e / ou *A. albopictus*. Tipicamente os sintomas da infecção começam entre 4 a 7 dias após a hematofagia do mosquito. Este comportamento é realizado somente pela fêmea, pois a mesma necessita do sangue para a maturação dos ovos (CHADEE, 2012).

Após a picada, a viremia se desenvolve no hospedeiro devido à alta multiplicação viral (SALAZAR *et al.*, 2007). Para que o ciclo perdure, o mosquito deve realizar o repasto em uma pessoa infectada durante o período agudo da doença (3 a 10 dias) em que uma grande quantidade de vírus se encontra circulando no sangue. Assim, a epidemia se mantém em grandes centros urbanos (CHADEE, 2012).

No sistema do mosquito, o vírus começa a se disseminar durante 8 a 20 dias, período denominado de período intrínseco de incubação. Uma vez o mosquito infectado, o vírus atravessa o esôfago até chegar na hemocele, onde fica presente na glândula salivar. O ciclo se repete e a infecção se dá quando o mosquito injeta a saliva juntamente com o vírus no sangue do hospedeiro. Assim, após o período intrínseco de incubação descrito, o mosquito transmite o vírus

pelo resto do seu ciclo de vida que pode variar entre 3 a 4 semanas (CDC, 2014; OMS, 2009, 2017a).

Para que o mosquito tenha sucesso no repasto, algumas proteínas localizadas na glândula salivar e na saliva do mosquito apresentam relevância. Uma destas proteínas bem caracterizada é denominada de Apirase. Secretada pela saliva do mosquito, possui um efeito antiplaquetário, anti-inflamatório e vaso dilatador que, conseqüentemente, facilita a sucção do sangue do hospedeiro (SUN *et al.*, 2006). Outro estudo indica também a participação das proteínas salivares na disseminação rápida e sistêmica do vírus e em um aumento da disseminação do complexo antígeno-anticorpo, sendo outra possível causa da dengue grave (SCHMID *et al.*, 2016).

O vírus pode ser mantido em circulação através do ciclo urbano (epidêmico) e do ciclo silvestre (enzoótico), como demonstrado na **Figura 7**. Estudos ecológicos sugerem que o uso de terras e a movimentação de seres humanos em florestas, propicia um maior contato com novos potenciais DENV resultando em linhagens e sorotipos novos (YOUNG *et al.*, 2017).

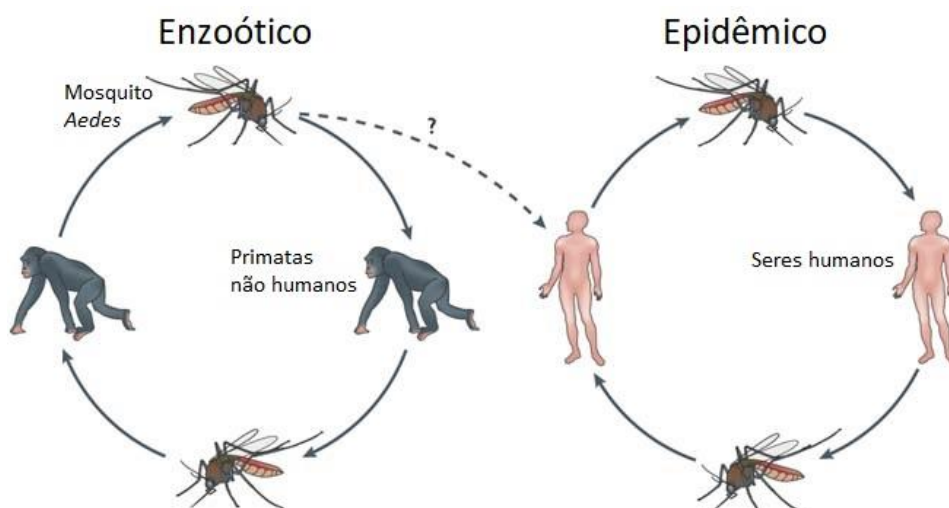


Figura 7: Cadeia de transmissão do *Dengue virus* em populações silvestres e urbanas. O mosquito circula em ambientes de matas (peri-urbanos), ciclo enzoótico (à esquerda) e urbanos, ciclo epidêmico (à direita), realizando o repasto em primatas não humanos e humanos. **Fonte:** Adaptado de WHITEHEAD *et al.*, 2007.

Em ocasiões raras o vírus pode ser transmitido em transplante de órgãos, transfusão sanguínea e existem ainda relatos de transmissão vertical em seres humanos. Porém, a maior prevalência das infecções está relacionada a picada dos mosquitos vetores (TEO & NG & LAM, 2009).

2.3.4 Patogênese

Quatro fatores principais irão influenciar na resposta imunológica contra DENV, sendo elas: estado imunológico, linhagem do vírus, idade e a genética. Além disso, em relação a dengue grave, indivíduos em uma segunda infecção por um outro sorotipo, estão mais suscetíveis ao agravamento da doença. Fatores genéticos e de faixa etária, como exemplo, pessoas de genótipo para pele branca e crianças também estão mais susceptíveis a dengue grave. A severidade da doença também está relacionada ao genótipo de linhagens virais circulantes, porém Guzman (2016) destaca que a gravidade deve ser pouco relacionada aos fatores intrínsecos virais, sendo o estado imunológico do hospedeiro o principal fator associado (AZAMI *et al.*, 2018; GUZMAN *et al.*, 2016; KATZELNICK & COLOMA & HARRIS, 2017).

Após a picada do mosquito, a saliva proveniente do mosquito juntamente com os vírus, são transportados por células dendríticas e levados até os linfonodos, onde os vírus infectam monócitos e iniciam o processo de multiplicação viral. Por intermédio das proteínas não-estruturais NS4B e NS5 o vírus consegue evadir das defesas do hospedeiro bloqueando a produção de IFN do tipo 1 (CALDERÓN-PELÁEZ, *et al.*, 2019; UNO & ROSS, 2018). Os INFs desempenham uma função importante, pois promovem a ativação de células *natural killer* (NK) que irão exercer papel fundamental na modulação da viremia, promovendo uma resposta protetora contra DENV durante os estágios iniciais da infecção (COSTA *et al.*, 2017; ERICKSON & GALE, 2008).

O DENV apresenta uma imunologia complexa no sentido de que diferentes níveis de anticorpos podem ser produzidos para apenas um sorotipo após uma primeira, segunda ou terceira infecção (AZAMI *et al.*, 2018; GUZMAN *et al.*, 2016; KATZELNICK & COLOMA & HARRIS, 2017). Em relação a imunidade humoral, a febre alta está relacionada ao pico de viremia e ao início

da produção de anticorpos IgM e IgG e, conseqüentemente, ao *clearance* viral. A resposta mediada por anticorpos é desenvolvida principalmente através da expressão e apresentação das proteínas E e prM, enquanto proteínas não estruturais induzem ativação de resposta celular de memória, NS1 induz a ativação do sistema do complemento (CARDOSA *et al.*, 2002; LAI *et al.*, 2008; JOHN & RATHORE, 2019).

O fato de DENV-1-4 serem correlacionados sorologicamente faz com que a resposta imunológica contra a proteína E desencadeie uma reação cruzada quando em contato com outros sorotipos. Isso desencadeia um agravamento do curso da doença causado pelos anticorpos heterotípicos desenvolvidos no primeiro contato com o vírus (SCHIEFFELIN *et al.*, 2010). Este fenômeno é causado possivelmente por um mecanismo denominado de intensificação dependente de anticorpo (ADE - *Antibody- Dependent Enhancement*). Uma das hipóteses aceitáveis se baseia no fato de que no decorrer dos anos após a primeira infecção observa-se um decaimento nos níveis de anticorpos que não são capazes de neutralizar o DENV, sendo, porém, capazes de se ligar ao vírus. Uma vez ligados, este complexo anticorpo-antígeno facilita a penetração do vírus em células susceptíveis, onde os vírus irão se replicar (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

Os principais fatores para o desenvolvimento da ADE estão relacionados a epidemiologia do país e ao risco de exposição do vetor a diferentes sorotipos. A convalescência de uma segunda infecção reduz a incidência do desenvolvimento de ADE em uma terceira ou quarta infecção por DENV, porém os sintomas mesmo que constatados raramente, podem ainda ser aparentes (KATZELNICK & COLOMA & HARRIS, 2017; MONTOYA *et al.*, 2013; REICH *et al.*, 2013). Estudos de De Alwis e colaboradores (2014) demonstraram que a remoção de anticorpos específicos é capaz de atenuar infecções heterotípicas *in vitro* em células K562 e diminuir a mortalidade por ADE *in vivo* em camundongos AG129, demonstrando assim uma relação entre os anticorpos e a ADE.

Em relação ao sistema do complemento, vários estudos demonstram a importância do mesmo para a infecção pelo DENV que, por sua vez, também está relacionada a gravidade da doença. O sistema do complemento é composto por proteínas circulantes no plasma sanguíneo e consiste em uma cascata de

proteínas que interagem e formam o complexo de ataque à membrana (MAC – *Membrane Attack Complex*). O processo é possivelmente mediado pela proteína NS1 que ativa a via alternativa do complemento e conseqüentemente causa a morte celular (GUZMAN *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2012).

2.3.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico de DENV é dificultado, pois não existem sintomas específicos para a doença, sendo estes gerais e similares a outras enfermidades. Nos estágios iniciais, geralmente são confundidos com uma gripe “*flu-like*”, e outras doenças como: zika, febre amarela, chikungunya, malária e sarampo. Apesar de a grande maioria dos casos de dengue ser assintomática (cerca de 70-80% das infecções), a identificação dos pacientes que necessitam de um cuidado especial é importante para o desfecho do quadro clínico. Visando sanar esta dificuldade, a OMS criou em 2009 um sistema de classificação para a detecção e identificação dos diferentes quadros de dengue (conforme mencionado no tópico **2.3.1** desta dissertação) possibilitando um processo de triagem mais eficiente e colaborativo para o sistema de vigilância epidemiológica do país (CDC, 2012; MAIRUHU *et al.*, 2004; OMS, 2009).

A confirmação da infecção pode ser realizada por exames sorológicos, imunológicos e pela detecção do material genético do vírus. Em relação aos ensaios imunológicos, estes devem ser realizados entre 7 a 15 dias após o período da infecção para detecção de soroconversão. Recomenda-se que o teste sorológico para IgM e IgG seja concomitante aos testes de detecção da proteína NS1, pois esta não apresenta reação cruzada com outros *Flavivirus* (MAIRUHU *et al.*, 2004).

Exames diretos podem ser realizados por testes moleculares, onde se detecta a presença de RNA viral. Estes devem ser realizados a partir do 5º dia após o aparecimento dos sintomas ou durante a fase inicial de convalescência. Em contraste com os exames sorológicos, os testes moleculares de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) possuem sensibilidade de cerca de 80-90% e especificidade de 95% (JUSOH & SHUEB, 2017;).

Um outro método de diagnóstico é o isolamento viral, porém este é pouco utilizado devido aos custos e da necessidade de pessoal tecnicamente qualificado para a sua realização (MULLER & DEPELSENAIRE & YOUNG, 2017).

A reação cruzada é um fenômeno comum observado entre espécies do gênero *Flavivirus*, devido a sua ancestralidade em comum e ao fato de a proteína E do envelope ser altamente conservada. A consequência é a dificuldade no desenvolvimento de diagnósticos com alta especificidade para DENV (HIROTA *et al.*, 2010; MAKINO *et al.*, 1994; MANSFIELD *et al.*, 2011). Este fenômeno também é observado em indivíduos previamente imunizados contra representantes do gênero *Flavivirus*, como exemplo, indivíduos vacinados contra YFV, principalmente em áreas onde ambos os vírus circulam simultaneamente (HOUGHTON-TRIVIÑO & MONTAÑA & CASTELLANOS, 2008).

2.3.6 Prevenção

Recentemente desenvolvida pela empresa *Sanofi Pasteur*, a vacina contra DENV é uma *quimera* viva atenuada tetravalente (*CYD-TDV-DENGVAXIA®*), baseada no vetor *Yellow fever virus* 17D em que os genes estruturais prM e E foram substituídos pelos genes homólogos ao de cada sorotipo de *Dengue virus* (DENV-1–4). Licenciada em cinco países, a vacina demonstra uma eficácia de cerca de 60%. Porém, um surto de dengue grave relatado pela OMS em 2017 nas Filipinas após a vacinação com o vetor recombinante, colocou em questionamento a eficácia da aplicação da vacina em indivíduos soronegativos. Indivíduos que nunca tiveram contato com o DENV e que receberam a vacina, desenvolveram caso de dengue hemorrágica após um posterior contato com o DENV. Sendo assim, pouco se sabe a respeito da vacinação a longo prazo em indivíduos soronegativos e a principal razão para os casos expressivos de dengue grave ocorrido nas Filipinas (FERGUSON *et al.*, 2016; HALSTEAD, 2016; OMS, 2017; PASTEUR, 2018).

Apesar da controvérsia da vacinação nas Filipinas, estudos de Flasche e colaboradores (2016) demonstram a sua importância em áreas endêmicas para a doença. A **Figura 8** destaca a importância da vacinação em áreas de grande

risco de se contrair a infecção, onde há uma alta prevalência de indivíduos soropositivos. A vacinação neste caso diminui a probabilidade de se contrair uma infecção secundária grave.

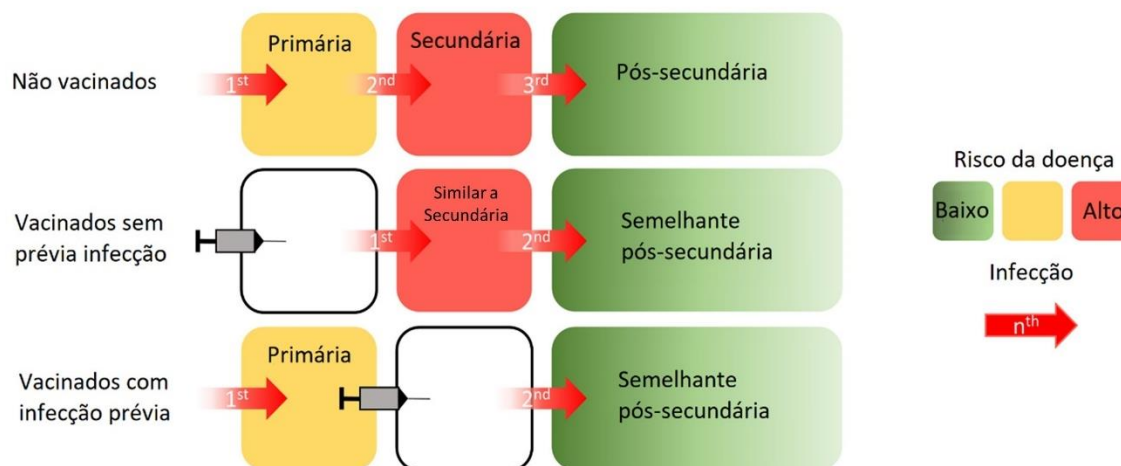


Figura 8: Vacinação contra DENV e indicação para os respectivos grupos de risco.

Indivíduos não vacinados, em uma segunda infecção, possuem uma maior probabilidade de desenvolver dengue grave (linha superior). Indivíduos vacinados, sem prévia infecção, apresentam uma maior probabilidade de desenvolver uma resposta similar à secundária em um segundo contato com o DENV (linha do meio). E indivíduos com infecção prévia, quando vacinados, apresentam risco baixo de desenvolver a doença na sua forma grave. Pois, as infecções subsequentes se comportariam imunologicamente como infecções pós-secundárias (última linha). **Fonte:** Adaptado de FLASCHE *et al.*, 2016.

Atualmente, as recomendações são para que a vacina licenciada seja aplicada somente em lugares de alta incidência da doença (OMS 2017c).

Segundo a OMS (2017a) a prevenção ainda é limitada a medidas de controle vetorial. Devido à dificuldade no desenvolvimento de vacinas, outras estratégias para a prevenção e controle do DENV, relacionadas principalmente ao controle vetorial do *A. aegypti*, estão sendo desenvolvidas e aplicadas.

A metodologia mais utilizada no mundo para o controle vetorial é a utilização de compostos químicos inseticidas. Atualmente quatro principais compostos são utilizados: carbamato, organoclorado, organofosforados e piretroide. Além disso, estes compostos apresentam toxicidade em seres humanos, e o uso em larga escala e as consequentes pressões seletivas

poderão futuramente desencadear adaptações em relação ao vetor (EPELBOIN *et al.*, 2018; LIU, 2015).

Uma estratégia alternativa adotada pela empresa Britânica *Oxitec* consiste na liberação de mosquitos machos geneticamente modificados com um gene dominante letal que compromete toda a prole após cruzamento, e consequentemente, diminui a propagação do *A. aegypti*. Trabalhos realizados em cidades da Bahia demonstraram que, quando liberados, estes mosquitos reduzem em 99% a população selvagem do mosquito (OXITEC, 2016).

Neste contexto de controle vetorial a bactéria *Wolbachia* também aparece como opção. Este projeto vem sendo desenvolvido no Brasil pela FIOCRUZ e internacionalmente pela universidade de Monash, na Austrália, onde é liderado pelo Dr. Scott O'Neill. A metodologia (O'NEILL *et al.*, 2019) consiste em infectar os mosquitos com uma linhagem virulenta da bactéria, capaz de reduzir o tempo de vida do mosquito à metade, em cerca de 15 dias (ELIMINATE DENGUE, 2012), reduzindo também a circulação do vírus e a epidemiologia da infecção. Além disso, estudos recentes demonstraram que uma superinfecção da bactéria *Wolbachia* resultou na inibição da transmissão por *A. aegypti* de *Zika virus*, CHIKV e DENV (ELIMINATE DENGUE, 2012; JOUBERT *et al.*, 2016; MOREIRA *et al.*, 2009).

2.3.7 Tratamento

Até o momento não existe nenhum tratamento específico para as infecções por DENV, os pacientes acometidos são providos de cuidados de suporte médico. No entanto, medidas de manejo adequadas, segundo as diretrizes da OMS (2009) já citadas no tópico **2.3.1**, são de suma importância antes da confirmação do diagnóstico. Assim, na ausência de um medicamento antiviral eficaz, medidas como repouso no leito e fluidoterapia por via oral podem ser cruciais na resolução da doença (GUZMAN, 2016).

Uma alternativa de tratamento consiste no uso de fitoterápicos, prática antiga e de uso corriqueiro principalmente em algumas regiões da África. Estudos demonstram que compostos extraídos de plantas como polissacarídeos

sulfatados, flavonoides, quercetina e compostos naturais de chalcona podem apresentar atividade anti-proliferativa contra DENV (RODRIGUEZ *et al.*, 2019).

De Oliveira e colaboradores (2020), utilizando o peptídeo AZD6244 (inibidor da via celular MEK/ERK - proliferação), demonstraram em ensaios *in vitro* utilizando células BHK-21 que o peptídeo apresenta uma potente atividade antiviral contra DENV-2 e DENV-3. Além disso, os autores demonstraram ainda em camundongos AG129 que o peptídeo foi capaz de estimular uma resposta protetora neste modelo em desafio com uma dose letal de DENV-2. O peptídeo encontra-se em ensaios clínicos de fase III e pode se apresentar futuramente como um tratamento alternativo e eficaz para os sorotipos testados.

Um artigo publicado por Low e colaboradores (2017), apresentando uma revisão sistemática de antivirais para Dengue, apontam que o desenvolvimento dos mesmos, deve ter como alvo e objetivo as proteínas não-estruturais, pois estas apresentam atividade enzimática fundamental no ciclo de multiplicação viral. Além disso, os autores apontam que vários candidatos a antivirais se encontram em fase de ensaios clínicos. Como exemplo o antiviral balapiravir, que apresentou uma suposta inibição da proteína NS5. Uma outra forma de terapia apresentada, é pelo desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Onde vários candidatos também se encontram em fase de ensaios clínicos. Como exemplo o anticorpo Ab513, que demonstrou eficácia no bloqueio dos quatro sorotipos de DENV, se ligando ao domínio III da proteína E. Porém, a utilização de imunoglobulinas intravenosas, no entanto, ainda não foi explorada para o tratamento da Dengue grave, devido às suas propriedades anti-inflamatórias. Portanto, ainda não se sabe os efeitos e o risco de contrair ADE, quando utilizado este tipo de tratamento, assim, estudos devem ser conduzidos levando-se em conta algumas precauções sobre o uso de anticorpos monoclonais.

Uma revisão sistemática, elaborada por Agrupis e colaboradores (2019), englobando a literatura regional da Filipinas dos últimos 60 anos, demonstrou que a grande maioria dos esforços e pesquisas conduzidas em relação a Dengue, foram concentrados no combate ao vetor, apresentando 16% dos artigos publicados. Artigos relacionados ao tratamento, manejo de pacientes, e ensaios clínicos, representaram cerca de 8% dos artigos publicados, estes dados demonstram esta grande dificuldade da pesquisa básica e a procura de novos tratamentos para a doença. Um outro estudo também de revisão

sistemática analisando cerca de 20 artigos, conduzidos por Rajapakse e colaboradores (2017), com o objetivo de buscar evidências de terapias profiláticas para os casos de sangramento por infecções de Dengue, demonstrou que as medidas tomadas como: transfusão de plaquetas e transfusão de plasma, não apresentaram evidências suficientes para embasar este tipo de tratamento para os pacientes. Os autores apontam que existem poucas evidências sobre o papel da transfusão de plaquetas em pacientes com trombocitopenia e o sangramento moderado a grave. Assim, estes dados também demonstram esta grande dificuldade para a padronização de outras alternativas para tratamento da doença.

Como o caminho para a descoberta de novos medicamentos demanda muito tempo até a chegada do consumidor final, várias pesquisas vêm sendo conduzidas, na qual propõem a estratégia de reposicionamento de fármaco. Assim, fármacos como: cloroquina, prednisona, celgosivir e lovastatina, se demonstraram seguros em pacientes com Dengue na fase aguda da doença. Apesar da proposta de tratamento dos sintomas na fase aguda, estes fármacos não apresentam uma melhora virológica ou sem alteração na viremia, apenas no alívio dos sintomas (LOW *et al.*, 2017).

2.4 Novas Possibilidades em Terapia Antiviral

2.4.1 O Adamantano

Um dos primeiros antivirais aprovados para uso humano foi a Amantadina, um derivado do Adamantano que possui fórmula molecular $C_{10}H_{16}$ e peso molecular 136.236 g/mol. Também denominado de Triciclododecano ou Diamantóide, sua estrutura é similar ao cristal diamante do qual o seu nome é derivado (*adamos*, do grego diamante / precioso). Foi primeiramente isolado e descoberto em 1933 a partir do processo de refinaria do petróleo nafta. Dentre os isômeros de $C_{10}H_{16}$ o Adamantano é o mais estável, pois o esqueleto de hidrocarbono compreende uma estrutura análoga a uma gaiola ou caixa, permitindo ser utilizada para muitas finalidades. Entre estas finalidades tem-se a síntese de diamantes industriais, aplicações na indústria farmacêutica, por

apresentar baixa toxicidade e na incorporação de moléculas bioativas com atividade antiviral, imunomoduladora, psicotrópica, analgésica, anticonvulsiva e anticâncer (FORT, 1964; HORVAT *et al.*, 2012; MANSOORI, 2008; SCHLHYER, 1957; SOSELIA *et al.*, 2018).

Este esqueleto de hidrocarbono possui uma marcante característica farmacológica descrita por Wanka e colaboradores (2013), ele funciona como uma “bala lipofílica”, em outras palavras, o Adamantano fornece à molécula incorporada atividade lipofílica e estabilidade que resulta em propriedades farmacocinéticas únicas, aumentando a permeabilidade em membranas celulares e a consequente facilidade do fármaco em penetrar nas células.

Sob o ponto de vista estrutural, o adamantano pode ser considerado como um ciclo-hexano na conformação cadeira (**Figura 9**) fundido a outro ciclo-hexano pelas posições axiais de modo que se forem observados os quatro lados da molécula se visualizará o hexâmero. Sob outra perspectiva estrutural, pode-se pensá-lo como um ciclo-hexano contendo três pontes metilênicas (grupos CH₂), em posições axiais, que se ligam a um carbono metínico (CH) formando assim a gaiola tetracíclica (VOLLHARDT & SCHORE, 2013).

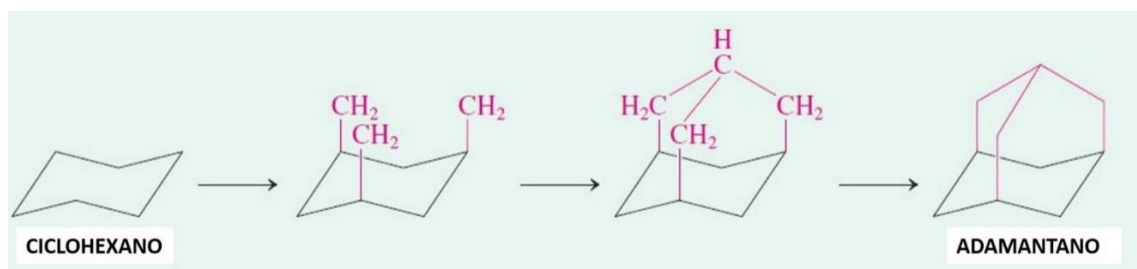


Figura 9: Estrutura tridimensional da molécula de Adamantano. Observe que na conformação final todos os ciclo-hexanos devem estar em formação cadeira. **Fonte:** Adaptado de VOLLHARDT & SCHORE, 2013.

2.4.2 A Amantadina

A Amantadina ou Aminoadamantano (**Figura 10**) marcou o início do uso de fármacos baseados nos derivados do Adamantano. Aprovadas em 1966 pela *Food and Drug Administration* (FDA), a Amantadina, Rimantadina e

Tromantadina são utilizadas atualmente como fármacos e também na pesquisa científica.

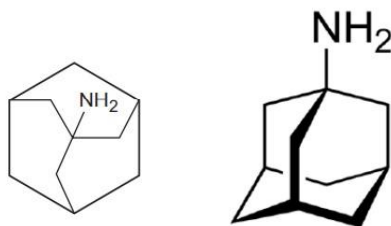


Figura 10: Estrutura química 2D da Amantadina. À esquerda, vista aérea. À direita, vista lateral. **Fonte:** FIELDS & KNIPE & HOWLEY, 2013; WANKA & IQBAL & SCHREINER, 2013.

Ao introduzir um grupo amina em uma porção terminal da estrutura do Adamantano esta nova molécula demonstrou características antivirais contra *Influenza A* e amenização dos sintomas causados pela doença de Parkinson (WANKA & IQBAL & SCHREINER, 2013). No Brasil, o Cloridarato de Amantadina (comprimidos de 100mg) é utilizado para o tratamento de Parkinson, e faz parte da Rede Nacional de Medicamentos Essenciais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A Amantadina age contra o vírus *Influenza A* inibindo canais de prótons M^2 e conseqüente bloqueio do desnudamento e multiplicação viral. O experimento para se demonstrar o mecanismo de ação foi realizado determinando-se a curva dose-resposta de Amantadina que possui um comportamento incomum. Isso significa que em baixas concentrações, cerca de $1 \mu M$, a Amantadina demonstra atividade inibitória para o vírus *Influenza A*, porém em concentrações mais altas esta característica é perdida ganhando novamente a atividade inibitória em concentrações de $100 \mu M$ (FIELDS & KNIPE & HOWLEY, 2013).

Atualmente sabe-se que Amantadina bloqueia a atividade de muitos outros vírus como exemplo: *Human immunodeficiency virus* (HIV) e o HCV (WANKA & IQBAL & SCHREINER, 2013). Estudos recentes demonstram também uma atividade imunomoduladora antiviral da Amantadina em células infectadas pelo *Human T-lymphotropic virus 1* (HTLV-1) (FRANCO, 2015).

2.4.3 A Amantadina e a Dengue

Koff e colaboradores (1980) demonstraram a redução dos títulos virais de DENV-2 em 99% ($p < 0.05$), sem que esta concentração causasse efeito citotóxico, em um estudo de dose-resposta realizado em células LLC-MK2 (rim de macaco *Rhesus*) tratadas com Amantadina em uma concentração de 50 μ g/ml. Ao avaliar os quatro sorotipos de DENV e esta mesma concentração de Amantadina acima, observou-se em células LLC-MK2 que, para o DENV-1, houve a redução de 2 logs no título viral; para DENV-2 em 3 logs; e para DENV-3 e DENV-4 em 2 logs. Destaca-se que a Amantadina foi adicionada nestes experimentos logo após a adsorção viral (de 1,5 hora), tendo sido mantida até a coleta do material para a titulação (5 dias após infecção). Para avaliar o efeito da Amantadina (50 μ g/ml) em diferentes pontos do ciclo viral, os autores utilizaram a LLC-MK2 e o DENV-2, tendo sido observado que a Amantadina reduziu o título viral em 4 logs ao ser adicionada imediatamente após o período de adição do vírus à célula, 3 logs após uma hora de adição do vírus, 1 log após 4-8 horas, não havendo redução viral mensurável quando a adição se deu após 24 horas do início da infecção. Este mesmo trabalho utilizou ainda em uma análise “*ex-vivo*” leucócitos periféricos de sangue circulante (PBL - *Peripheral Blood Leucocytes*) de *Macaca mulatta* e seres humanos os quais foram infectados com DENV-2, tendo sido demonstrada a redução de 1 log viral nos leucócitos de ambas as espécies, utilizando-se a adição da Amantadina após a adsorção viral de 1,5 hora.

Análises de vírus relacionados filogeneticamente, como DENV e WNV, demonstram similaridades com o vírus *Influenza A* no processo de penetração celular, o qual depende do processo de acidificação do pH para a infecção viral. (CHU & NG, 2004) Estudos de Blázquez e colaboradores (2016), demonstram *in vitro* que o tratamento de células Vero com Amantadina reduziu significativamente a carga viral de WNV em cerca de 90% em relação ao controle de vírus. Em um outro ensaio, foi demonstrado também em células Vero que após o WNV ser incubado por 24h juntamente com a Amantadina na concentração 750 μ M, houve uma redução significativa na quantidade de RNA viral liberado no sobrenadante, confirmando os resultados obtidos pela titulação

viral. Além disso, os autores demonstram por microscopia de imunofluorescência que a Amantadina inibe a infecção na etapa de replicação do genoma viral, possivelmente no sítio replicativo de WNV.

Em 1988 ocorreu um surto de DENV em Taiwan, acometendo cerca de 10.000 pessoas. Várias drogas foram utilizadas no tratamento destes indivíduos, sem sucesso. Houve, entretanto, melhora nos sintomas dos indivíduos ao ser utilizada a Amantadina por um a dois dias. Não tendo sido este estudo conduzido mediante um protocolo científico e sim visando a melhoria dos pacientes diante de surto vultuoso, a Amantadina não foi utilizada para nenhum outro surto subsequente de dengue e não é comumente aplicada para o tratamento de indivíduos infectados ou apresentando sintomatologia clínica. Entretanto, em 2014 e 2015 um estudo foi realizado com 34 pacientes positivos para infecção de DENV (testes de triagem utilizando NS1). Estes pacientes apresentavam febre alta, dor generalizada nos ossos, náusea, vômito, mal-estar e “*rash*” cutâneo. Os mesmos foram distribuídos em três grupos: 1. Pacientes no início dos sintomas (seis); 2. Pacientes com dois a seis dias do início dos sintomas (21); e 3. Pacientes que visitaram a clínica por outra causa e relataram ter feito uma visita inicial em outra clínica por suspeita de dengue (sete). Os pacientes de todos os três grupos receberam Enzil (100mg Amantadina) tabletes orais 3x ao dia. Apesar da baixa amostragem e de não levar em consideração variáveis e análises estatísticas foi possível concluir que a Amantadina reduziu efetivamente os sintomas no grupo 1 em 1 a 2 dias, do grupo 2 também no mesmo tempo (porém, somente a maioria dos sintomas como febre, dores nos ossos, mal-estar, “*rash*” cutâneo e mal estar gástrico), e no grupo 3 (sem uso da Amantadina) os sintomas continuaram por um mínimo de 7 dias (LIN & CHEN, 2016). Estes dados comprovam a efetividade da Amantadina, especialmente se utilizada no início dos sintomas, porém apontam a necessidade de um estudo com maior número de pacientes e com variáveis mais controladas.

2.5 Os Impactos Econômicos da Dengue no Brasil

O Brasil é um país de magnitude continental em que o seu território está localizado predominantemente em uma região tropical, e assim, propício habitat

para o *A. aegypti* e disseminação do DENV. Segundo o Ministério da Saúde (2018), no ano de 2017 foram notificados 252 mil casos prováveis de dengue no Brasil, um decréscimo na incidência em relação a 2015, onde foram notificados 1.6 milhões de casos. Apesar da queda no número de casos, a doença ainda gera muitos prejuízos para a economia brasileira.

Em um levantamento realizado pela empresa Sense Company (2018), estima-se que o Brasil apresenta uma perda econômica de modo direto e indireto de cerca de R\$ 2,3 bilhões do PIB nacional em relação a Dengue, Zika e Chikungunya. Sendo toda estas arboviroses transmitidas principalmente pelo *A. aegypti*. Deste valor, cerca de 64,6% do orçamento está relacionado ao combate do vetor (como a aquisição de pesticidas) e 16,4% são destinados a cuidados médicos para pacientes na fase aguda da doença. Nos custos indiretos foram levados em consideração os dias em que o indivíduo falta ao trabalho e a perda de produtividade.

No contexto mundial, um relatório publicado pela OMS em 2012 destaca a estimativa dos gastos globais em relação a dengue. Levando-se em consideração os custos ambulatoriais e de hospitalização, os gastos com a doença chegam a cerca de \$514 a \$1.394 milhões de dólares americanos. O relatório salienta que estes números podem ser ainda maiores, uma vez que a grande maioria dos casos é subnotificada ou mal classificada. Como perspectivas futuras, a OMS aponta como principais estratégias para reduzir os impactos causados pela dengue até 2020 a redução da mortalidade em 50% e a redução da morbidade em pelo menos 25%. Porém, como apontado pela OMS estas estratégias ainda apresentam dificuldades técnicas e sociais.

Em relação às dificuldades técnicas e às taxas de mortalidade, os casos poderiam ser reduzidos a quase zero através da implementação de um tratamento clínico adequado e oportuno, que envolva um diagnóstico clínico e laboratorial precoce, e o imediato manejo e tratamento do paciente (conforme discutido no tópico **2.3.8**). Tais medidas, aliadas à mobilização social, promoção da saúde e outras propostas de cunho social já discutidas no tópico **2.3.7**, viabilizariam uma redução considerável nos casos de dengue em todo o mundo (OMS, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A dengue é atualmente a doença viral que mais afeta pessoas no mundo, sendo a dengue hemorrágica a forma mais grave da doença, que em alguns casos tem como desfecho a morte. Mesmo diante dos números e dos graves desfechos, infelizmente até o momento não existe nenhum tratamento específico para a doença. Sendo os antivirais os únicos fármacos capazes de bloquear a infecção viral no hospedeiro de forma efetiva, estes são alternativas promissoras para doenças onde a “cura” e / ou vacinas eficazes ainda não foram alcançadas ou desenvolvidas.

Neste âmbito, embasado pelos inúmeros casos epidemiológicos registrados anualmente, o presente estudo ressalta a necessidade crescente de uma estratégia efetiva de controle fundamentada na caracterização de novos antivirais em potencial. Apesar dos cuidados médicos diminuírem a taxa de mortalidade de 20% para 1%, os antivirais podem, ainda, em casos especiais (imunossuprimidos, segunda infecção, idosos e crianças) melhorar a expectativa de vida, os sintomas e desfechos no paciente. Além disso, o uso de antivirais para o bloqueio direto do vírus possui a vantagem do tratamento imediato do paciente, diferentemente da vacinação que além de demandar um tempo para a indução da resposta antiviral pode induzir a produção de anticorpos de reação cruzada, resultando no agravamento da doença.

O desenvolvimento e caracterização de antivirais é dificultado pela complexa interação vírus / hospedeiro e uso da maquinaria celular, sendo poucos os alvos específicos para atuação dos fármacos, sem maiores efeitos colaterais. A Amantadina surge neste cenário como uma possibilidade promissora por atuar em vias exclusivamente virais. O fármaco, que é utilizado para o tratamento das infecções pelo *Influenza A*, age no bloqueio dos canais de prótons M2, e, conseqüentemente, no desnudamento da partícula viral. Pela similaridade dos processos de penetração viral apresentados pelos DENV e *Influenza A* pela via endocítica e posterior acidificação do endossoma, acredita-se que a Amantadina também apresentará um efeito substancial no bloqueio da multiplicação viral para o DENV. Os resultados preliminares do uso da Amantadina *in vitro* e *ex-vivo* e a experiência do uso da droga em um surto por

DENV ocorrido no sul de Taiwan reforçam esta hipótese e justificam o desenvolvimento do presente trabalho.

Sendo assim, tendo em vista os argumentos apresentados, este projeto objetiva a caracterização *in vitro* da atividade antiviral de três derivados inéditos da Amantadina, contra o DENV-4.

É importante destacar que estas moléculas foram previamente avaliadas *in vitro* pelo nosso grupo de pesquisa que comprovou o disparo e modulação de vias da imunidade antiviral inata no contexto da infecção pelo HTLV-1 (FRANCO, 2015; pedido de patente depositado em 26.12.2018 - BR1020180770551). Ressalta-se também que estas moléculas foram desenvolvidas na UFMG pelo nosso cooperador Professor Dr. Ângelo de Fátima, do Departamento de Química – ICEX. São moléculas puras, com grande potencial de uso real e produção em larga escala, se evidenciadas atividades anti-DENV. Além disso, os derivados do Adamantano apresentam apenas uma etapa química para a sua síntese. Assim, os custos para a fabricação e produção da molécula, se demonstraram promissores para a utilização na indústria farmacêutica. Este fato tende a impactar positivamente não somente a saúde pública, mas igualmente a produção tecnológica e a economia nacional gerando um produto de alto valor agregado a medida da ocorrência dos desdobramentos naturais advindos deste primeiro passo essencial.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a atividade antiviral *in vitro* de três derivados do Adamantano (ADA1, ADA2 e ADA5) utilizando como modelo o *Dengue virus 4* (DENV-4).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade das moléculas ADA1, ADA2 e ADA5 em células BHK-21 utilizando ensaios de viabilidade celular;
- Padronizar o inóculo celular em placas de 12 poços;
- Caracterizar *in vitro* os efeitos antivirais dos derivados ADA1, ADA2 e ADA5 em células BHK-21 infectadas por DENV-4, utilizando ensaios de titulação viral para quantificação das partículas infecciosas provenientes de amostras de sobrenadante, bem como, análise de fenótipo de placa.

4 METODOLOGIA

Foram avaliados três derivados da Amantadina – ADA1, ADA2 e ADA5: compostos cristalinos, de alto grau de pureza, desenhadas e sintetizadas pelo grupo do Professor Ângelo de Fátima, do Departamento de Química – ICEX – UFMG, colaborador deste projeto. O desenho das mesmas não foi aqui apresentado por se tratar de projeto inédito e promissor (processo de patenteamento citado), o qual será acrescido dos resultados obtidos nesta dissertação.

4.1 Produção e Manutenção das Células

4.1.1 Cultivo de Células BHK-21 e C6/36

Células BHK-21 (*Baby Hamster Kidney* – Rim de Hamster Neonato) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - SIGMA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO), Gentamicina 0,2% e Penicilina 0,05% (SIGMA). As garrafas de células foram subcultivadas sempre que necessário e mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂ e 95 % de umidade.

Células C6/36 foram mantidas em meio L-15 (*Leibovitz*) contendo 10% de SFB e subcultivadas sempre que necessário em estufa a 28°C.

Para os subcultivos (repiques), ambas as células tiveram a sua monocamada lavadas com solução salina EDTA tamponada com fosfato (PBS) 1X (1.5 mM NaCl; 40 mM Na₂HPO₄; 20 mM KH₂PO₄; pH 7.2) após o descarte do meio inicial. Foi acrescido às monocamadas Tripsina 0,25%, cuja ação foi interrompida com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - SIGMA) contendo 10% SFB (GIBCO). As células foram centrifugadas (centrífuga NF 800R, NÜVE, Rotor RA 200) durante 5 minutos à 2.500 rpm, 25 °C. O sedimento celular foi ressuspensionado nos meios apropriados para cada célula, sendo as mesmas subcultivadas após confluência da monocamada.

4.2 Produção dos Estoques Virais

4.2.1 Expansão de DENV-4

O DENV-4 foi amplificado em monocamada de células C6/36 em garrafas de cultura tratadas de 75 cm² (*TPP - Trasadingen, Suíça*).

Para o inóculo de infecção foi utilizada uma MOI (multiplicidade de infecção) de 0,1. Monocamadas confluentes foram então infectadas permanecendo em adsorção durante o período de 1 hora, no qual as garrafas eram movimentadas suavemente de maneira repetida a cada 15 minutos. Após este período, foi acrescentado meio L-15 contendo 2% de SFB (GIBCO). As células infectadas foram mantidas por 6 dias de incubação em estufa de CO₂ (5%) a 28°C ou até ser observada a formação de sincícios, quando então o sobrenadante foi coletado e centrifugado (centrífuga NF 800R, NÜVE, Rotor RA 200) durante 15 minutos à 2.500 rpm, 25 °C.

4.2.2 Titulação dos Estoques Virais

Para a titulação dos estoques virais, o procedimento foi realizado como descrito a seguir. O processo de subcultivo foi realizado como descrito anteriormente e as células BHK-21 foram ressuspendidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium - SIGMA*) contendo 10% SFB (GIBCO). Adicionou-se um inóculo celular de $2,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 6 poços. No dia seguinte, foi realizada a diluição seriada do vírus de 10^{-1} a 10^{-5} , sendo um poço utilizado como controle não infectado, não tendo recebido o inóculo viral. A adsorção foi realizada com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium - SIGMA*) a 2% SFB (GIBCO). Durante o período de uma hora da adsorção viral, a cada 15 minutos as placas foram movimentadas conforme descrito acima. Após a adsorção, o inóculo foi retirado e foi adicionado ao poço carboximetilcelulose (CMC) (SYNTH) na concentração de 1% preparado em meio de cultura contendo 2% SFB (GIBCO). As placas foram então mantidas em estufa por um período de 5 dias. Após este período, as placas foram tratadas

com formol a 10% por 3 horas para a fixação das células, lavadas em água corrente e logo em seguida coradas com cristal violeta 3% por 1 hora para contagem das placas de lise. O título viral foi expresso pelo do número de unidades formadoras de placa (*plaque forming units* – PFU) por mL (PFU / mL) segundo a fórmula abaixo representada:

$$\text{Título Viral (PFU / mL)} = N \times FC \times 10^*$$

N = Número de placas de lise contadas; **FC** = Fator de correção para 1 mL;
* = Inverso da diluição na qual foram contadas as placas de lise.

4.3 Ensaios de Citotoxicidade

4.3.1 Ensaio Colorimétrico Utilizando MTT

O MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólio] (método de redução do tetrazólio) foi utilizado para medir a atividade da enzima mitocondrial succinato desidrogenase de células viáveis que reduzem o tetrazólio (coloração amarela) para a sua forma insolúvel (roxa), formando cristais de Formazan. Foram realizados experimentos de MTT independentes e cada um deles em duplicata (Mosmann, 1983).

Células BHK-21 foram semeadas em placas de 96 poços contendo $4,0 \times 10^4$ células por poço. Foram testadas as ADA 1, 2 e 5 nas concentrações 2000 μ M, 200 μ M, 20 μ M, 2 μ M, 0,2 μ M, 0,02 μ M, 0,002 μ M e 0,0002 μ M. Para controle foram utilizados o diluente dos compostos, etanol absoluto (em sua maior concentração [2000 μ M]), Triton X-100 2,5% como controle de morte e DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - SIGMA) suplementado com 5% de SFB (GIBCO) como controle de meio.

O ensaio de MTT foi realizado como descrito por Mosmann (1983). Após as 24h de incubação (células e compostos), 20 μ L da solução de MTT (Sigma-Aldrich) (5 mg/ml) foi adicionada a cada poço. As placas foram incubadas

novamente em estufa a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade por mais 4 horas ao abrigo de luz. Em seguida, 120 µL do sobrenadante foi retirado de cada poço e a mesma quantidade de isopropanol acidificado (ácido clorídrico 4M 1% em isopropanol) foi adicionado. As placas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm.

Os gráficos foram produzidos por meio do software *GraphPad Prism 8.0* (*GraphPad Inc., San Diego, CA, USA*) e os dados estão representados como a média e erro padrão da média (SEM). Para as análises estatísticas foram utilizados os testes paramétricos seguidos de *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.3.2 Ensaio Fluorimétrico Utilizando AlamarBlue

O ensaio por AlamarBlue mensura a fluorescência do corante azul resazurina quando este é reduzido a resorufina, um corante rosa com alta fluorescência. Assim, quando dentro da célula, este indicador de oxirredução mede a viabilidade celular, uma vez que a célula está em pleno metabolismo. Portanto, a quantidade de células vivas é proporcional à fluorescência produzida.

Para tal, células BHK-21 foram semeadas em placas de 96 poços contendo $4,0 \times 10^4$ células por poço. Foram testadas as ADA 1, 2 e 5 nas concentrações 2000µM, 200 µM, 20 µM, 2 µM, 0,2 µM, 0,02 µM, 0,002 µM e 0,0002 µM. Para controle foram utilizados o diluente dos compostos, etanol absoluto (em seu maior volume [2000µM]), Triton X-100 2.5% como controle de morte e DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - SIGMA) suplementado com 5% de SFB (GIBCO) como controle de meio. Após as 48h de incubação (células e compostos), o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 10 µL da solução de AlamarBlue (*Thermo Fisher Scientific*) em cada poço, juntamente com 90 µL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - SIGMA) não suplementado com SFB (GIBCO). Após a adição do AlamarBlue, a placa foi incubada ao abrigo da luz por 3 horas e a leitura foi realizada no aparelho *Varioskan* (*Thermo Fisher Scientific*) utilizando o espectro de fluorescência de 595 nm.

Os gráficos foram produzidos por meio do software *GraphPad Prism 8.0* (*GraphPad Inc., San Diego, CA, USA*) e os dados estão representados como a média e erro padrão da média (SEM). Para as análises estatísticas foram utilizados os testes paramétricos seguido de *One-Way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.4 Ensaio de Curva de Ciclo Múltiplo

Para avaliar o pico de produção de maior progênie viral, foi preparada uma placa de 6 poços de células BHK-21 contendo $2,5 \times 10^5$ células / poço. Após 24 horas, a monocamada foi infectada com o vírus DENV-4 na MOI de 0,1, durante 1 hora, conforme acima descrito. Após o período de adsorção, o meio contendo o vírus foi retirado e foi adicionado 2 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium - SIGMA*) 2% SFB (*GIBCO*). Os tempos de coletas do sobrenadante foram padronizados para 48h, 72h, 96h, 120h e 144h. Em cada tempo de coleta, o sobrenadante foi centrifugado (centrífuga NF 800R, NÜVE, Rotor RA 200) durante 2 minutos à 2.500 rpm, 25°C e guardado a -80°. Ao final do experimento, foi realizada uma titulação viral, conforme já descrito no tópico 4.2.2, para todos os tempos padronizados.

4.5 Ensaio de Atividade Antiviral

4.5.1 Análise da Produção de Partículas Infecciosas em Células Infectadas por DENV-4 e tratadas com os diferentes compostos

Para a avaliação da quantidade de partículas virais que estariam sendo liberadas após tratamento das células infectadas por DENV-4 com os compostos testados, foi realizado um ensaio de titulação viral.

A primeira etapa desta avaliação consiste em inocular o vírus juntamente com os compostos nas concentrações determinadas no momento da adsorção

(permanecendo ao longo do período de multiplicação viral - 5 dias; 120 horas), com a finalidade de avaliar o efeito protetor dos compostos durante todo o ciclo de multiplicação viral. Para tal, monocamadas de células BHK-21 foram preparadas em placas de 12 poços contendo 4×10^4 células / poço. Os compostos foram utilizados nas concentrações de 200 μM , 20 μM , 2 μM e 0.2 μM . Para a produção do inóculo foi utilizado o DENV-4 na MOI de 0,1 que foi incubado juntamente com os compostos ADA1, ADA2 ou ADA5 nas concentrações já descritas. Após 1 hora de adsorção, o inóculo viral foi retirado e foi adicionado meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - SIGMA) 2% SFB (GIBCO) contendo apenas as respectivas concentrações analisadas dos compostos. As células foram mantidas durante o período de infecção a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5% de umidade. Decorrido o tempo da infecção, o sobrenadante foi coletado e centrifugado (centrífuga NF 800R, NÜVE, Rotor RA 200) durante 5 minutos a 2.500 rpm, 25°C para separação dos debris celulares e o mesmo foi estocado a -80°. As placas utilizadas foram fixadas em formol 10% por 3 horas, lavadas em água corrente e logo em seguida coradas com cristal violeta 3% por 1 hora para avaliação do fenótipo de placa obtido.

A segunda etapa consistiu na diluição das amostras de sobrenadante coletadas e titulação dos vírus para avaliação da progênie viral recuperada, ou seja, efeito das diferentes ADAs e concentrações na multiplicação viral. A titulação foi realizada conforme descrito no tópico **4.2.2**.

Os gráficos foram produzidos por meio do software *GraphPad Prism 8.0* (*GraphPad Inc., San Diego, CA, USA*) e os dados estão representados como a média e erro padrão da média (SEM). Para as análises estatísticas foram utilizados os testes *One-Way ANOVA* e *Brown-Forsythe ANOVA*, sendo que valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização do Inóculo Celular para os Ensaio em Placa

A fim de padronizar o inóculo celular de BHK-21 que seria utilizado nos ensaios em placas de 12 poços, as seguintes concentrações de células foram avaliadas: 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 e 7×10^5 (células / poço).

As monocamadas foram avaliadas no primeiro e no sétimo dia após a confecção da placa, conforme demonstrado abaixo (**Figura 11**).

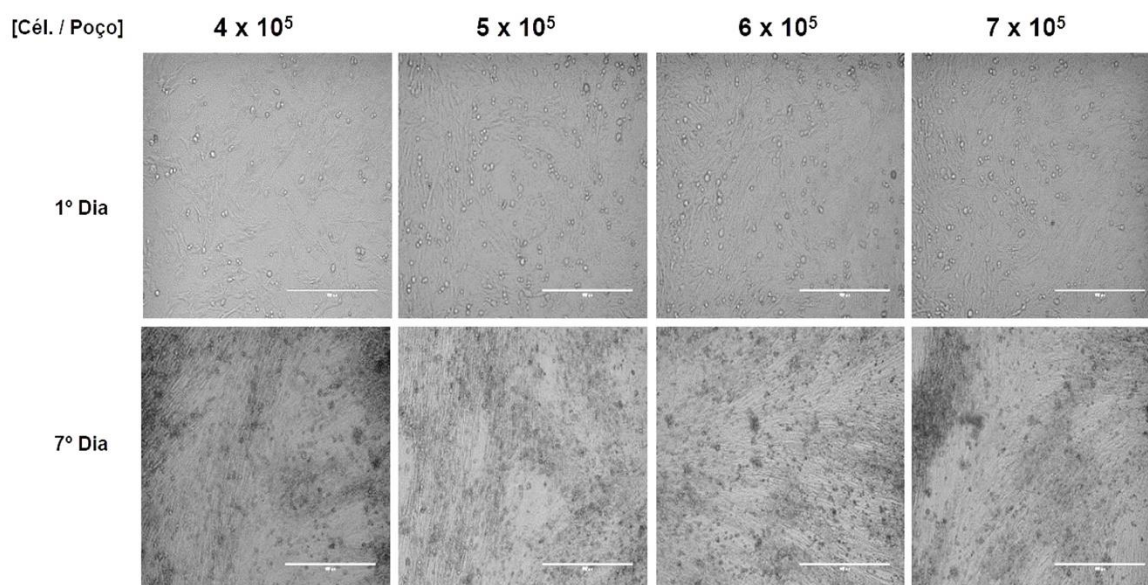


Figura 11: Padronização do inóculo celular para os ensaios em placas de 12 poços. Microscopia de campo claro do primeiro e do sétimo dia (24 e 120 horas) após a confecção das placas. Aumento de 10x. A barra representa 400 µm. Concentrações celulares testadas: 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 e 7×10^5 células / poço.

A partir das imagens obtidas, observou-se que o aumento da concentração do inóculo celular foi diretamente proporcional ao aparecimento de células vacuolizadas e desprendidas da monocamada, indicando processo de morte. Utilizando o menor inóculo (4×10^5 células / poço) obteve-se uma monocamada íntegra e conservada após o 7º dia de manutenção e com menor

taxa aparente de morte celular, sendo, portanto, a escolha para os experimentos subsequentes.

5.2 Avaliação da Citotoxicidade dos Derivados da Amantadina em Células BHK-21

5.2.1 Ensaio Colorimétrico de MTT

A citotoxicidade de diferentes concentrações dos compostos testados foi avaliada em células BHK-21 utilizando o ensaio de MTT. Os resultados são apresentados na **Figura 12** abaixo.

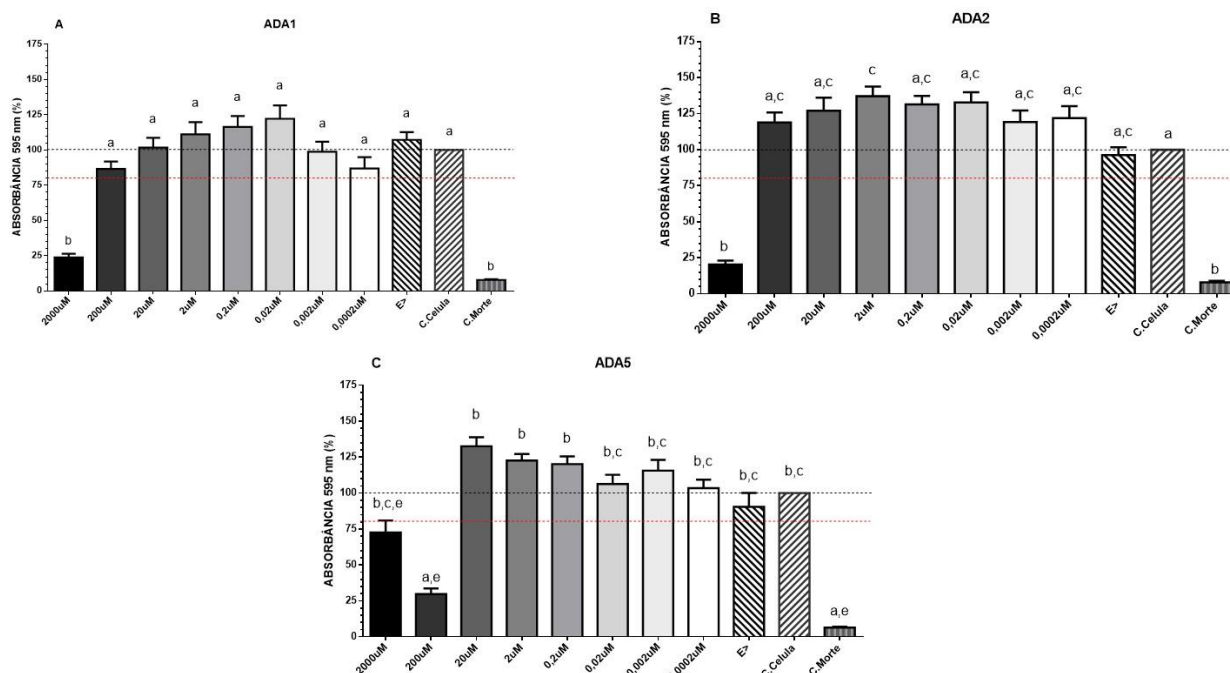


Figura 12: Ensaio de citotoxicidade por MTT dos derivados da Amantadina em células BHK-21. A: ADA1; B: ADA2; e C: ADA5. Linha pontilhada preta - 100% da viabilidade. Linha pontilhada vermelha - 80% de viabilidade após 24 horas de incubação. C. Célula: Controle de Célula, 100% da viabilidade celular; E>: Controle de Diluente [Etanol] na maior concentração; C. Morte: Controle de Morte Triton X-100. As letras indicam diferença estatística, em que letras iguais significam que não houve diferença significativa e letras diferentes indicam essa diferença. Teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de *Tukey* onde $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Este ensaio foi realizado com 3 replicatas independentes.

Para ADA1, a análise estatística (*One-Way ANOVA* $p < 0,0001$, pós-teste de *Tukey* $p < 0,05$) mostrou diferença significativa entre o controle de morte e os demais tratamentos (exceção 2000 μM) e entre a concentração de 2000 μM para as demais concentrações. Diferenças também foram encontradas entre: 200 μM vs 0,2 μM ; 200 μM vs 0,02 μM ; 0,2 μM vs 0,0002 μM , e 0,02 μM vs 0,0002 μM .

Para ADA2, a análise estatística (*One-Way ANOVA* $p < 0,0001$, pós-teste de *Tukey* $p < 0,05$) mostrou diferença significativa entre o controle de morte e as demais concentrações, com exceção de 2000 μM , e entre 2000 μM e as demais concentrações. Houve diferença significativa entre 2 μM , 0,2 μM e 0,02 μM vs o controle de célula e entre 20 μM , 2 μM , 0,2 μM e 0,02 μM vs o controle de diluente (E>).

Para ADA5 foi demonstrada diferença significativa (*One-Way ANOVA* $p < 0,0001$, pós-teste de *Tukey* $p < 0,05$) entre o controle de morte e todas as concentrações avaliadas, com exceção da concentração de 200 μM . Diferenças também foram encontradas entre a concentração de 200 μM e as demais concentrações, bem como, entre 20 μM vs 0,0002 μM , 20 μM vs o controle de células e entre 20 μM , 2 μM e 0,2 μM vs o controle de diluente (E>).

De acordo com os gráficos (**Figura 12**), a ADA1 e a ADA2 mostraram uma viabilidade celular menor do que 80% apenas na concentração 2000 μM quando em comparação com o controle de célula após 24h de tratamento. Em relação a ADA5 foi observada uma viabilidade menor ou próxima a 80% para as concentrações de 2000 μM e 200 μM .

Após estes ensaios de citotoxicidade, definiu-se que os próximos experimentos seriam trabalhados com as concentrações variando de 200 μM a 0,002 μM , para os três compostos, uma vez que os resultados mostraram que a concentração 2000 μM para as ADA1, ADA2 e ADA5 apresentaram citotoxicidade.

Porém, uma vez que para ADA1 e ADA2 a concentração de 200 μM não foi tóxica e que a concentração comercial utilizada para o tratamento de infecções pelo vírus *Influenza A* equivale a de 200 μM (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), manteve-se esta concentração para a realização dos ensaios de atividade antiviral, mesmo apresentando citotoxicidade para ADA5.

5.2.2 Ensaio Fluorimétrico por AlamarBlue

A citotoxicidade de diferentes concentrações dos compostos testados foi avaliada em células BHK-21 também com o ensaio de AlamarBlue. Os resultados podem ser avaliados na **Figura 13**.

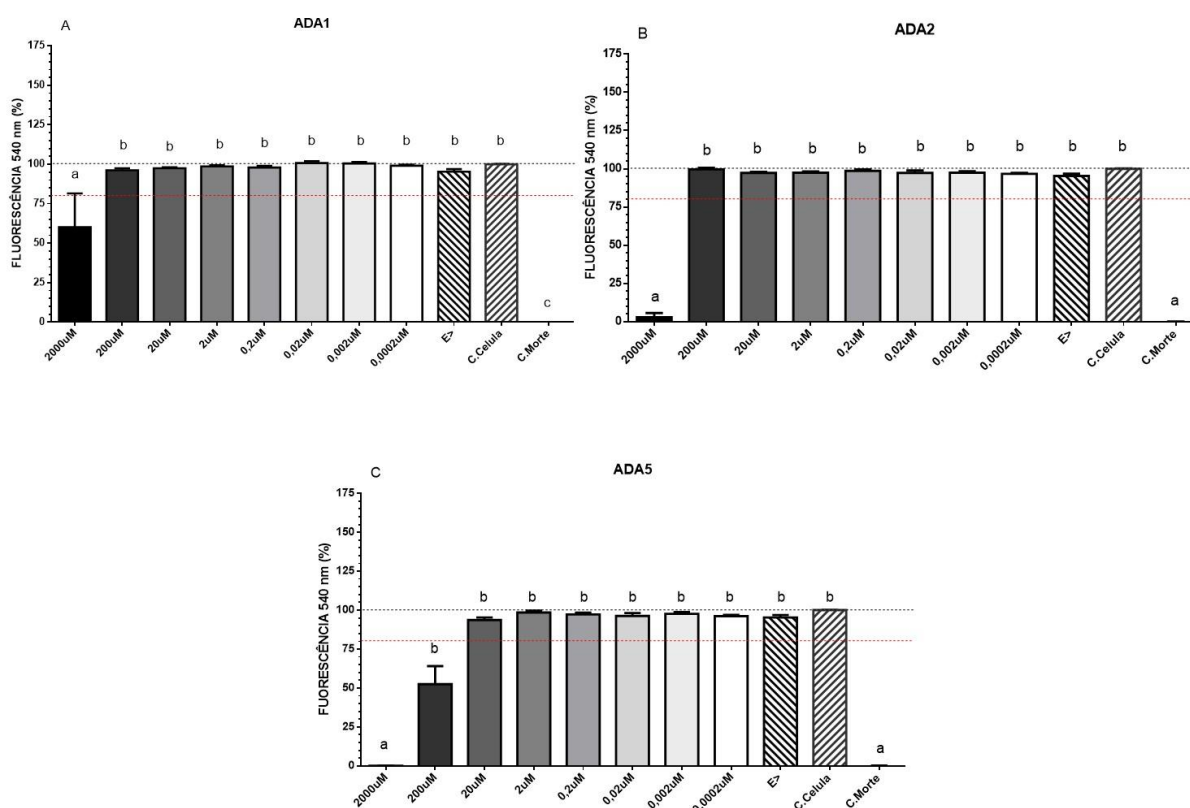


Figura 13: Ensaio de citotoxicidade por alamarBlue dos derivados da Amantadina em células BHK-21. A: ADA1; B: ADA2; e C: ADA5. Linha pontilhada preta - 100% da viabilidade. Linha vermelha - 80% de viabilidade. C. Célula: Controle de Célula, 100% da viabilidade celular; E>: Controle de Diluente na maior concentração; C. Morte: Controle de Morte. As letras indicam diferença estatística em que letras iguais significam que não houve diferença significativa e letras diferentes indicam essa diferença. Teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de *Tukey* onde $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. Este ensaio foi realizado com 3 replicatas independentes.

De acordo com os gráficos e de maneira similar ao observado no ensaio de MTT, ADA1 apresenta citotoxicidade para a concentração de 2000 µM e a análise estatística (*One-Way ANOVA* $p < 0,0001$, pós-teste de *Tukey* $p < 0.05$) demonstrou diferença entre o controle de morte e as demais concentrações.

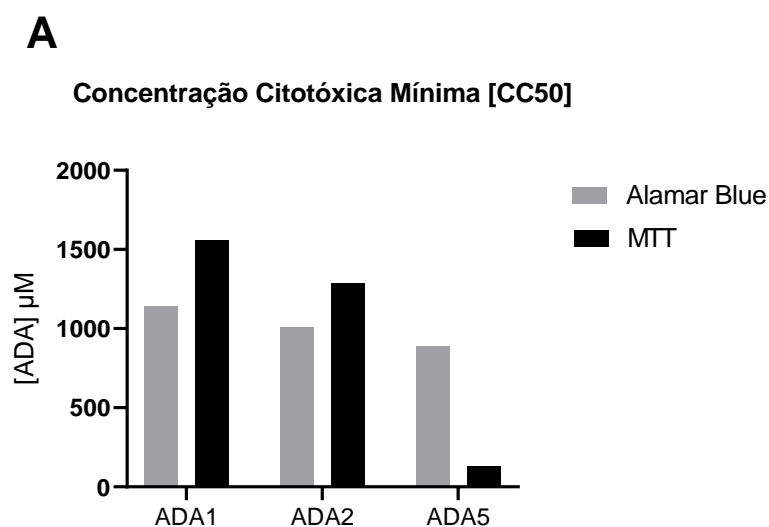
Além disso, diferença estatística foi observada ainda entre a concentração de 2000 μM em relação às outras concentrações.

ADA2 (*One-Way ANOVA* $p < 0,0001$, pós-teste de *Tukey* $p < 0,05$) apresentou uma viabilidade celular menor do que 80% apenas na concentração 2000 μM quando em comparação com o controle de célula após 24h de tratamento.

Em ADA5, a diferença estatística (*One-Way ANOVA* $p < 0,0001$, pós-teste de *Tukey* $p < 0,05$) entre a concentração 2000 μM e o controle de morte não foi significativa entre si, mas sim para os demais grupos comparados. A concentração de 200 μM apresentou diferença estatística para as demais concentrações e para os controles.

A concentração citotóxica mínima (capaz de matar 50% das células [CC_{50}]) para ambas as técnicas utilizadas também foi calculada e observamos valores similares para ADA1 (1560 μM - MTT; 1142,93 μM - AlamarBlue, diferença de 0,7326x) e ADA2 (1286,51 μM - MTT; 1110,85 μM - AlamarBlue, diferença de 0,8635x). Para a substância ADA5, entretanto, esta diferença foi de 6,787x (130,79 μM - MTT; 887,76 μM AlamarBlue), como demonstrado na

Figura 14 A e B:



B

**Avaliação da concordância por Razão CC_{50}
AlamarBlue/ MTT**

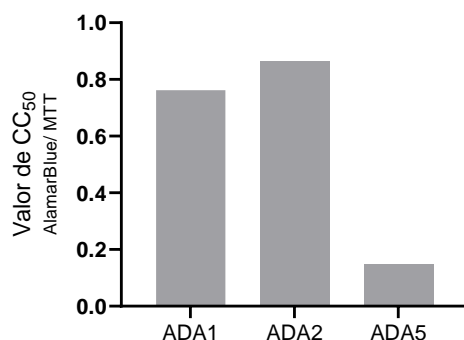


Figura 14: Concentração citotóxica mínima (CC_{50}) dos compostos avaliados pelos métodos de MTT e AlamarBlue. A. Concentração citotóxica mínima em concentração micromolar de ADA1, ADA2 e ADA5. B. Variação dos valores obtidos entre as duas técnicas (AlamarBlue/ MTT). A triplicata foi similar para os compostos. Para ADA5, o método MTT apresentou uma concentração citotóxica mínima cerca de 6.8x menor do que o calculado no método AlamarBlue.

Estes resultados estão de acordo com os gráficos de citotoxicidade apresentados nas Figuras 12 e 13 onde observa-se que somente nas concentrações de 2000 μ M para os compostos ADA1 e ADA2 apresentam caráter citotóxico. Pelos valores plotados no gráfico, hipoteticamente, o limiar de citotoxicidade deve encontrar-se por volta de 1000 μ M para estes dois compostos, concentração em que a viabilidade já estaria comprometida. Para ADA5 a concentração citotóxica mínima demonstrou variar de acordo com a metodologia utilizada.

5.3 Análise do Pico de Produção de Progênie Viral de DENV-4 em Células BHK-21 por Curva de Ciclo Múltiplo

A fim de avaliar se o tempo estipulado para a coleta do vírus nos ensaios estava mesmo sendo o mais adequado, tendo em vista os resultados obtidos, realizamos uma curva de ciclo múltiplo com DENV-4 na MOI de 0,1 (**Figura 15**).

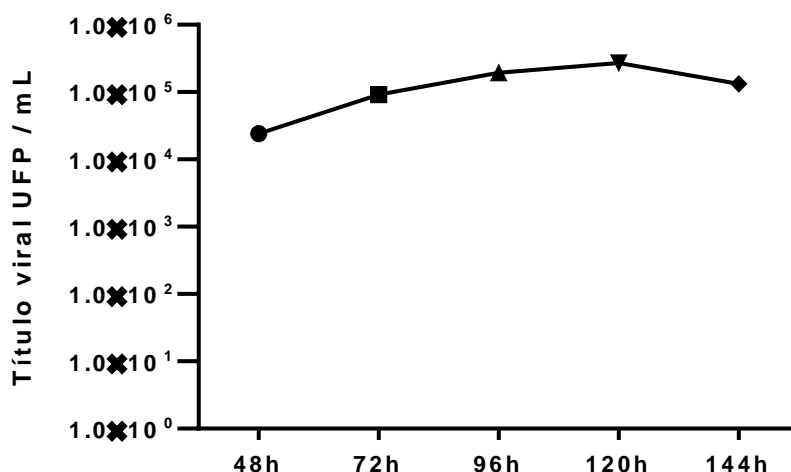


Figura 15: Curva de ciclo múltiplo para DENV-4 na MOI de 0,1. Tempos avaliados entre 48 e 144 horas. A maior produção de partículas virais foi observada no período de 120h após a infecção. Após o período de 144h observa-se um leve decréscimo nas unidades formadoras de placa, porém, sem alteração no log viral.

Os resultados demonstram que o período de 120h, utilizado anteriormente, de fato apresenta o maior pico de produção viral. Após este período, com 144h, é possível identificar um leve decaimento na produção de partículas, provavelmente decorrente da redução da viabilidade fisiológica da monocamada celular neste tempo, o que interfere no ciclo de multiplicação do vírus apesar de não se observarem alterações significativas no log viral.

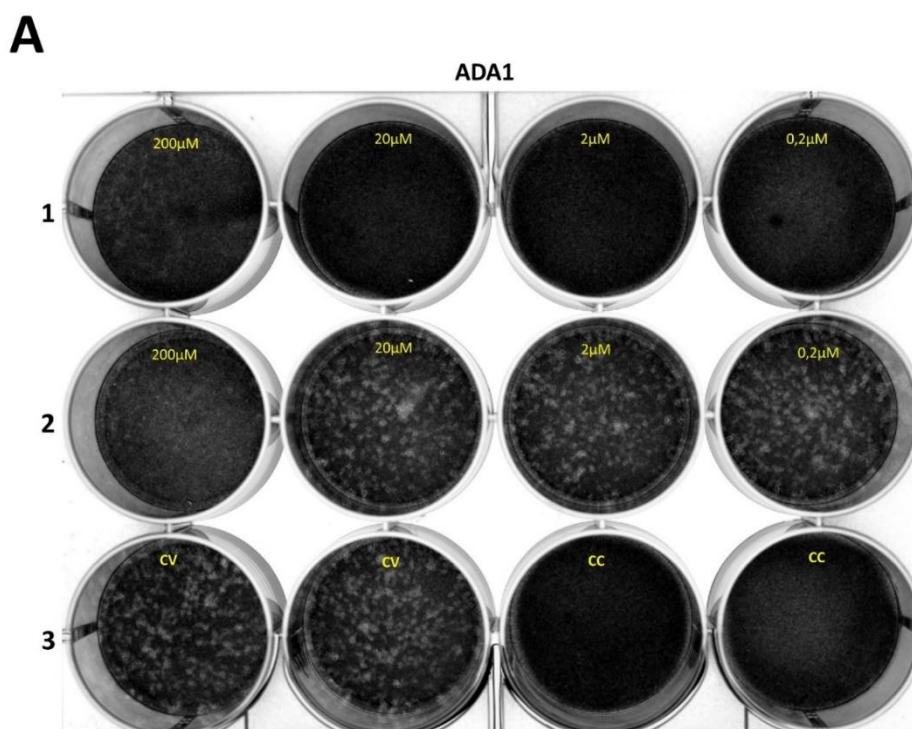
Este resultado confirmou a continuação dos experimentos com o período de avaliação em 5 dias (120h).

5.4 Avaliação da Atividade Antiviral dos Derivados da Amantadina em Células BHK-21 Infectadas por DENV-4

5.4.1 Análise da Produção de Partículas Infecciosas por Ensaio de Titulação Viral

Para a avaliação da atividade antiviral dos compostos, analisamos a produção de partículas infecciosas pelo DENV-4 em um ensaio de titulação viral.

Primeiramente, as células foram tratadas com uma solução de vírus DENV-4 na MOI de 0,1 juntamente com os compostos em diferentes concentrações (foram adicionados no momento da adsorção e deixados em contato com as células durante todo o período de infecção). Após, o sobrenadante foi coletado e titulado. As placas utilizadas neste ensaio foram coradas posteriormente para avaliação do fenótipo de placa obtido. Os resultados para ADA1 estão apresentados na **Figura 16**.



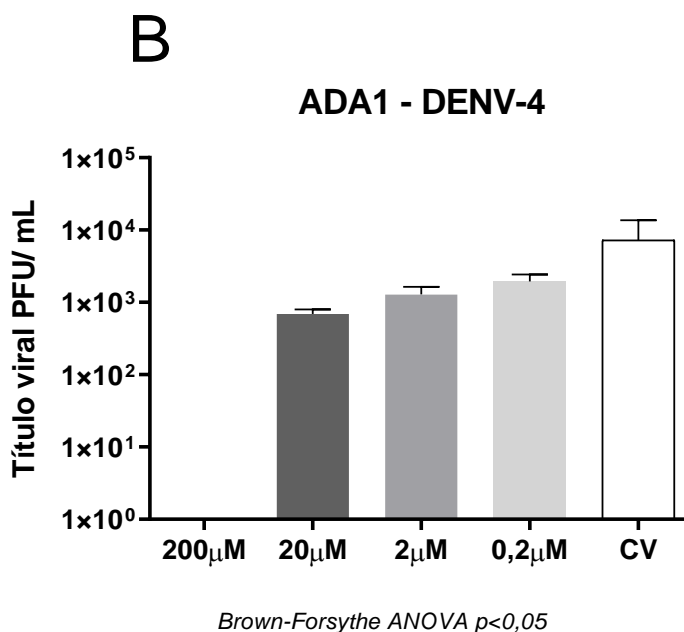
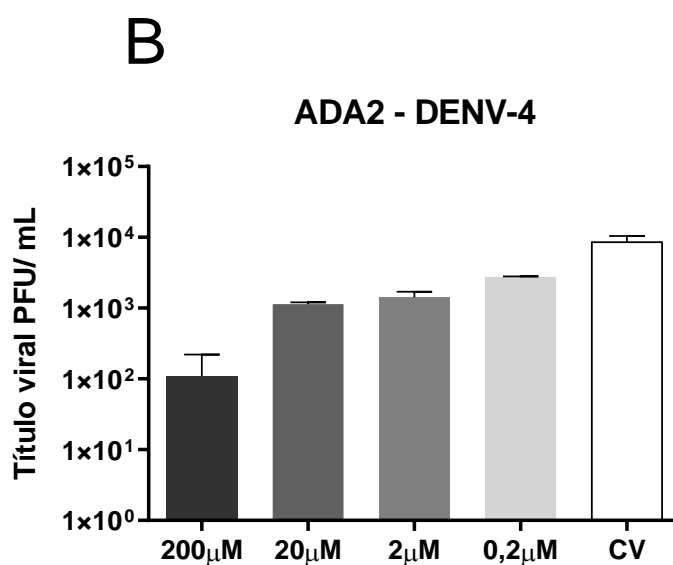
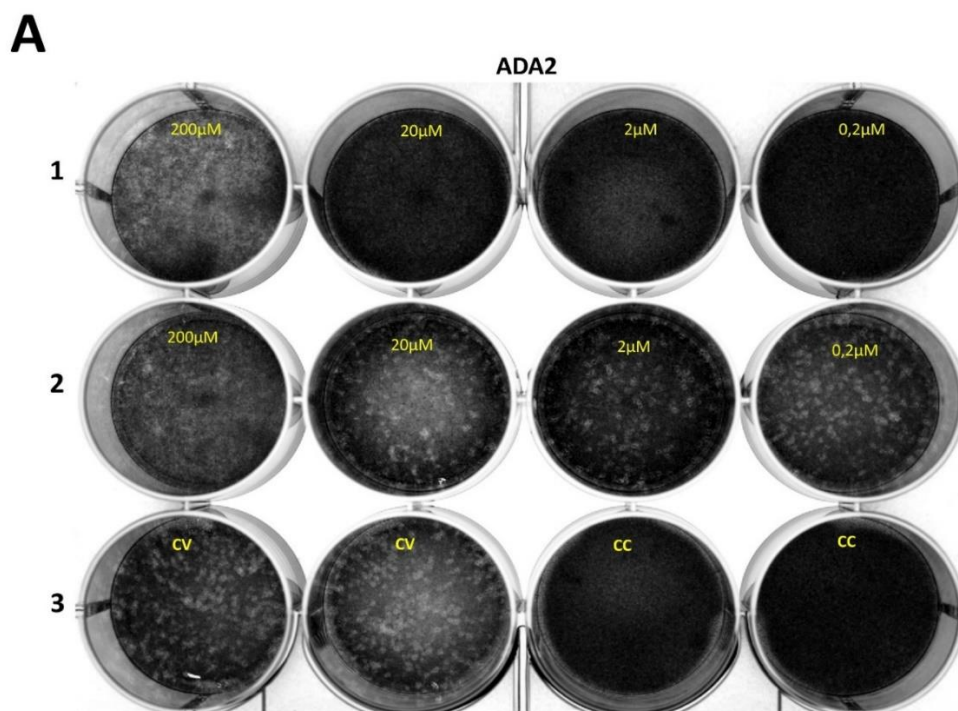


Figura 16: Ensaio de titulação viral do sobrenadante de células tratadas com ADA1 e infectadas com DENV-4 na MOI 0,1. A: Primeira etapa do experimento. Placa corada com cristal violeta, após coleta do sobrenadante, para análise do fenótipo de placa. **Na horizontal: 1** - Controle de compostos nas seguintes concentrações 200 µM, 20 µM, 2 µM e 0,2 µM. **2** - Células infectadas com DENV-4 e tratadas com ADA1 nas respectivas concentrações testadas. **3** - Controle de vírus à esquerda e controle de célula à direita. **B:** Segunda etapa do experimento. Titulação dos sobrenadantes (PFU/ mL) da placa corada acima, após infecção com DENV-4 e tratamento com ADA1. Na concentração de 200 µM, e por comparação ao controle de vírus, ADA1 apresenta inibição da multiplicação viral. Teste *Brown-Forsythe ANOVA* onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Na **Figura 16A**, observamos que a monocamada tratada com o composto ADA1 na concentração de 200 µM não mostra placas de lise evidentes, e apresenta a monocamada de células com uma aparência mais íntegra e próxima ao controle de células. Tal fenótipo complementa os resultados obtidos na titulação do sobrenadante (**Figura 16B**) em que, de acordo com as análises, existe uma diferença estatisticamente significativa (*Brown-Forsythe ANOVA* $p < 0,05$) entre os grupos analisados, sendo que a concentração de 200 µM para ADA1 demonstrou uma redução de aproximadamente 4 log no título viral quando comparada ao controle de vírus. Já as concentrações de 20 e 2 µM demonstraram uma redução de cerca de 1 log no título viral quando comparadas ao controle de vírus.

O mesmo ensaio foi conduzido para ADA2 e os resultados podem ser observados a seguir na **Figura 17**.

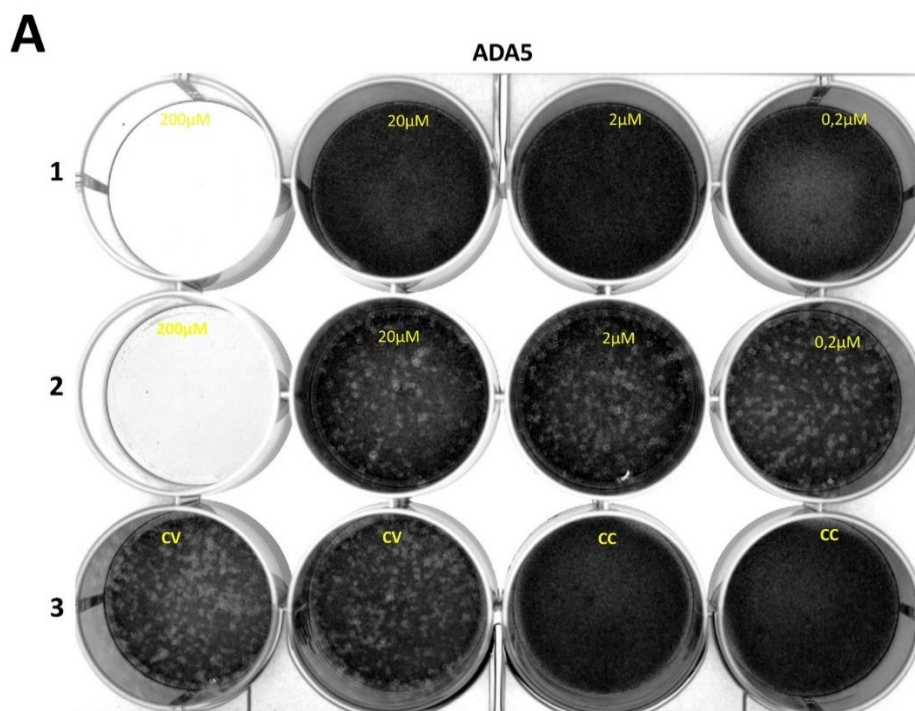


One-Way ANOVA/ Pós Teste de Tukey $p < 0,05$

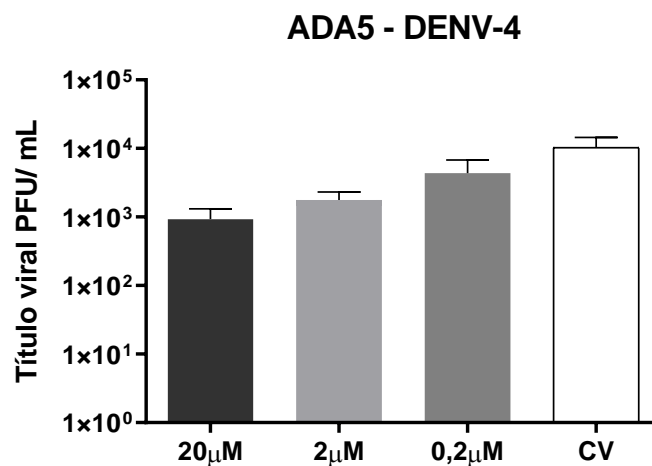
Figura 17: Ensaio de titulação viral do sobrenadante de células tratadas com ADA2 e infectadas com DENV-4 na MOI 0,1. A: Primeira etapa do experimento. Placa corada com cristal violeta, após coleta do sobrenadante, para análise do fenótipo de placa. **Na horizontal: 1** - Controle de compostos nas seguintes concentrações 200 μM, 20 μM, 2 μM e 0,2 μM. **2** - Células infectadas com DENV-4 e tratadas com ADA2 nas respectivas concentrações testadas. **3** - Controle de vírus à esquerda e controle de célula à direita. **B:** Segunda etapa do experimento. Titulação dos sobrenadantes (PFU / mL) da placa corada na figura A, após infecção com DENV-4 e tratamento com ADA2. Teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de *Tukey* onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

De acordo com o gráfico e com o fenótipo de placas obtido, diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações analisadas foram encontradas para ADA2 (*One-Way ANOVA* $p < 0.05$; 200 μM , 20 μM , 2 μM , 0.2 μM vs CV - pós-teste de *Tukey* $p < 0.05$). Além disso, observa-se ainda uma redução de aproximadamente 2 log no título viral na concentração de 200 μM , bem como, cerca de 1 log nas concentrações de 20 e 2 μM quando comparadas ao controle de vírus.

Do mesmo modo os experimentos foram conduzidos com a substância ADA5 e os resultados são apresentados na **Figura 18**.



B



Brown-Forsythe ANOVA p<0,05

Figura 18: Ensaio de titulação viral do sobrenadante de células tratadas com ADA5 e infectadas com DENV-4 na MOI 0,1. A: Primeira etapa do experimento. Placa corada com cristal violeta, após coleta do sobrenadante para análise do fenótipo de placa. **Na horizontal: 1** - Controle de compostos nas seguintes concentrações 200 µM, 20 µM, 2 µM e 0.2 µM. **2** - Células infectadas com DENV-4 e tratadas com ADA5 nas respectivas concentrações testadas. **3** - Controle de vírus à esquerda e controle de célula à direita. **B:** Segunda etapa do experimento. Titulação dos sobrenadantes (PFU / mL) da placa corada na figura A, após infecção com DENV-4 e tratamento com ADA5. Observa-se que na concentração de 200 µM figura 18A a substância apresentou citotoxicidade inviabilizando a multiplicação viral. Teste *Brown-Forsythe ANOVA* onde $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações analisadas foram encontradas para ADA5 (*Brown-Forsythe ANOVA* $p < 0,05$), com redução de aproximadamente 1 log na multiplicação viral para a concentração de 20 μM e 2 μM , como demonstrado na Figura 18B. A concentração de 200 μM não foi representada no gráfico, pois a substância apresentou citotoxicidade, destruindo a monocamada, e, conseqüentemente, o substrato para a multiplicação viral.

Os títulos virais obtidos para os três compostos mediante infecção do DENV-4 podem ser comparados no gráfico abaixo (**Figura 19**).

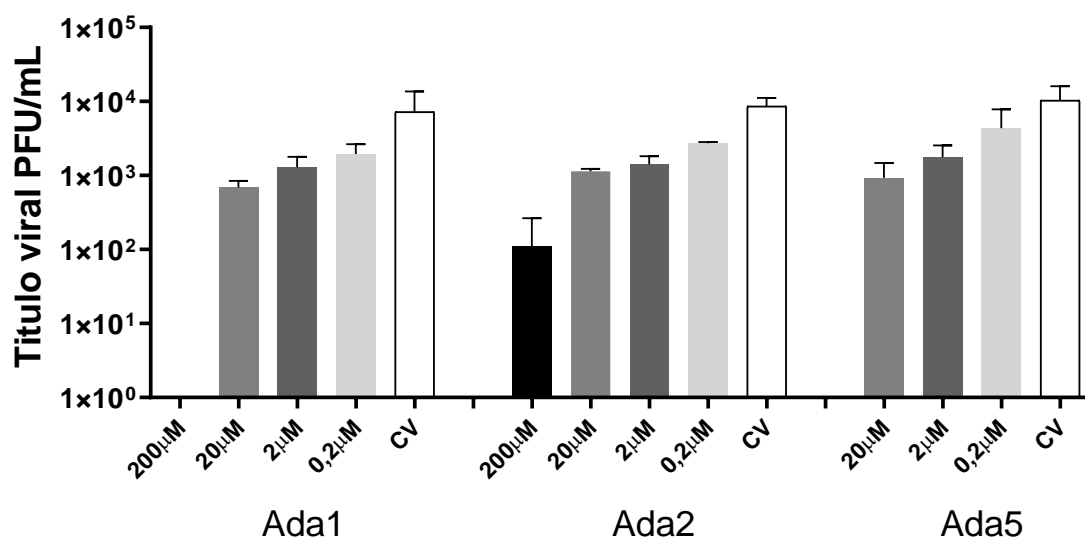


Figura 19: Gráfico comparativo dos títulos obtidos no ensaio de titulação viral do sobrenadante de células infectadas com DENV-4 e tratadas com os compostos ADA1, ADA2 e ADA5. CV: Controle de vírus. Observa-se que os compostos apresentam características dose-dependente, sendo que à medida que a concentração diminui, o título viral aumenta.

De acordo com os dados, observa-se um comportamento dose-dependente para todos os compostos testados. Na concentração de 200 μM para ADA1 observa-se uma redução de 4 log no título viral ou 100% e 25%, 1 log, nas concentrações de 20 e 2 μM . Para ADA2 observa-se uma redução de 50%, 2 log, na concentração de 200 μM e praticamente 1 log nas concentrações de 20 e 2 μM . Para ADA5, houve redução também de 1 log na concentração de 20 μM e 2 μM . De maneira que, à medida que a concentração dos compostos diminui, o título viral aumenta.

Os resultados apresentados podem ser corroborados ainda através da imagem obtida em microscopia de campo claro das placas infectadas para titulação viral. O efeito antiviral da concentração de 200 μM para ADA1 e ADA2 pode ser visualizado na **Figura 20**.

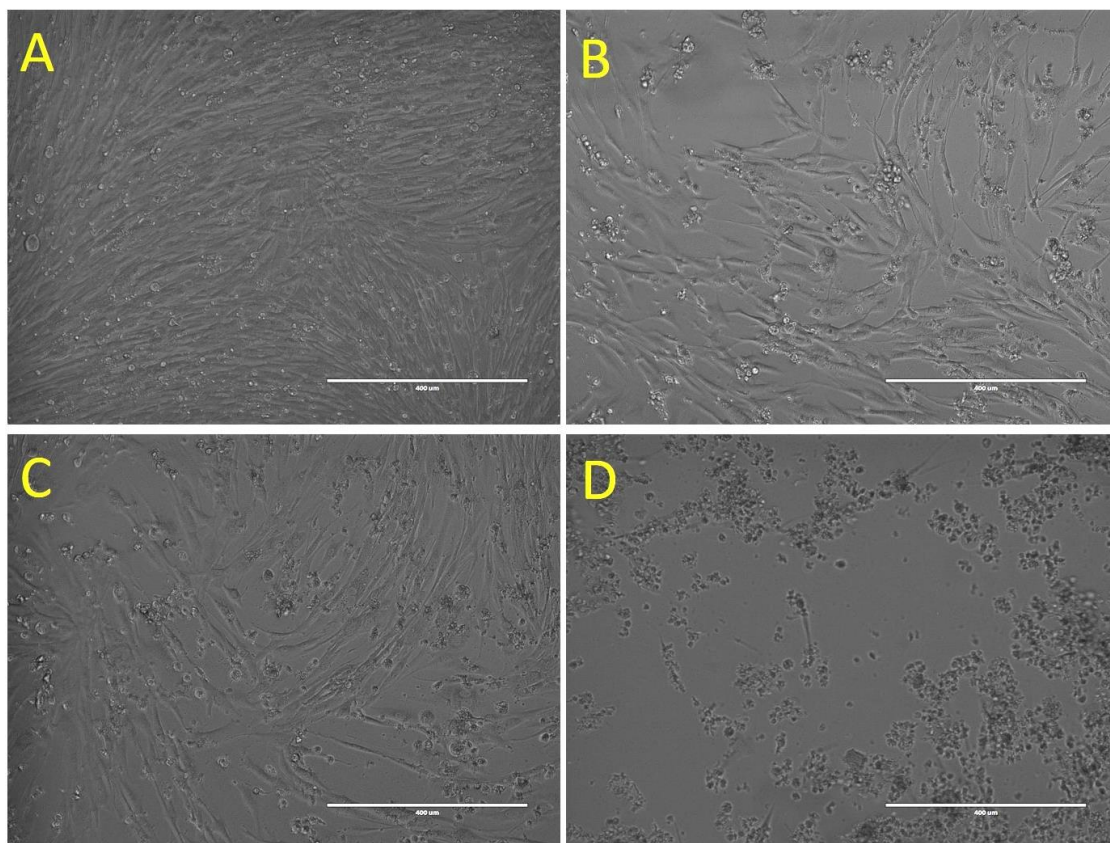


Figura 20: Efeito antiviral de ADA 1 e ADA 2 na concentração de 200 μM para o DENV-4. Microscopia de campo claro de placas infectadas com DENV-4 para titulação do sobrenadante. Aumento de 10X. A barra representa 400 μm . Células BHK-21 tratadas com DENV-4 e os compostos após 5 dias de infecção. **A:** Controle de células na ausência da infecção por DENV-4. **B:** ADA1 na concentração de 200 μM . **C:** ADA2 na concentração de 200 μM . **D:** Controle de vírus na MOI de 0,1. Observa-se um indício de efeito protetor dos compostos ADA1 e ADA2 na concentração de 200 μM quando comparado com o controle de vírus.

A concentração de 200 μM demonstrou um potencial efeito sobre a multiplicação viral de DENV-4, reduzindo os títulos virais em cerca de 4 log em relação ao controle de vírus para o composto ADA1 e 2 log para ADA2. Para ADA5 nesta mesma concentração, não foi possível validar o ensaio, uma vez

que o composto apresentou citotoxicidade, não permitindo a manutenção de uma monocamada viável para a propagação do vírus.

Este ensaio de titulação foi iniciado também para os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3 e os compostos ADA1 e ADA2 na concentração de 200 μM e dão suporte à continuação deste trabalho.

Os resultados obtidos até o momento são demonstrados na **Figura 21**.

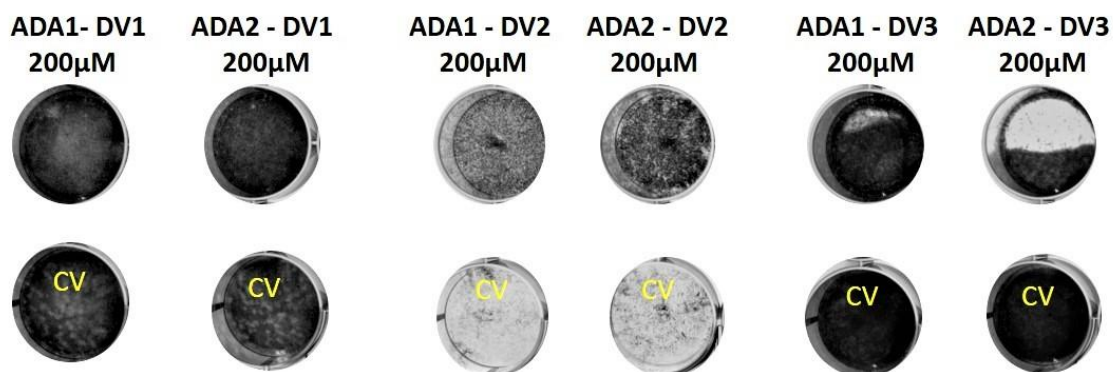


Figura 21: Ensaio de titulação viral do sobrenadante de células tratadas com ADA1 e ADA2 na concentração de 200 μM e infectadas com DENV-1/2 ou 3 na MOI 0,1. Primeira etapa do experimento. Placas coradas com cristal violeta, após coleta do sobrenadante, para análise do fenótipo de placa e do título viral. **CV:** Controle de vírus.

Os resultados da análise do fenótipo de placa, demonstram que a concentração de 200 μM para ADA1 e ADA2 também apresentou potencial antiviral para todos os sorotipos avaliados. Observa-se que pela análise fenotípica, o controle de vírus apresenta maior número de placas de lise e efeito citopático em relação aos poços tratados com ADA1 e ADA2 demonstrando o efeito antiviral dos compostos avaliados.

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antiviral de três formulações inéditas derivadas do Adamantano: ADA1, ADA2 e ADA5.

A fim de avaliar a citotoxicidade dos compostos frente a células BHK-21 utilizamos duas metodologias distintas, sendo elas: MTT e AlamarBlue. Nos ensaios de citotoxicidade utilizando MTT, observamos que os compostos não apresentaram toxicidade para células BHK-21 quando avaliados em baixas concentrações (200 μM [exceto para ADA5], 20 μM , 2 μM , 0,2 μM , 0,02 μM , 0,002 μM , 0,0002 μM).

Hamid e colaboradores (2004), realizaram um estudo com 117 compostos já aprovados para uso, entre estes: antibióticos, anti-histamínicos, antipsicóticos, antiplaquetário e quimioterápicos. Teve como objetivo avaliar a citotoxicidade para células HepG2, comparando a sensibilidade das técnicas de MTT e AlamarBlue. Utilizando a concentração de 10 μM para cada composto, os autores concluíram que ambos os ensaios forneceram informações úteis para a identificação de compostos citotóxicos *in vitro*, sendo pertinentes nos estágios iniciais da seleção de candidatos à futuros fármacos. Os autores também concluíram que a técnica AlamarBlue apresentou uma melhor sensibilidade em relação ao MTT, porém para compostos contendo terfenadina e astemizol (anti-histamínicos) ambos os ensaios apresentaram desempenho similar. Os autores pontuam que resultados falso positivos e negativos podem ocorrer em virtude da indução ou inibição da atividade metabólica enzimática mitocondrial que certos compostos podem ter afinidade. A consequência deste evento biológico é a alteração nos pontos de cortes dos valores de concentração citotóxica (CC_{50}) que pode variar entre cada metodologia avaliada. Portanto, assim como constatado no presente estudo, utilizando metodologias distintas observamos que para ADA1 e ADA2 a CC_{50} não apresentou grandes variações no ponto de corte da concentração citotóxica, conforme mostrado na Figura 14.

Entretanto, uma variação de quase 7x foi observada para ADA5 (a mais citotóxica dentre as três). Os valores de CC_{50} foram de 130,79 μM e 887,76 μM para MTT e AlamarBlue, respectivamente. Bopp & Lettieri (2008), comparando quatro metodologias avaliativas de citotoxicidade, sendo elas AlamarBlue, MTT, CFDA-AM e LDH, demonstrou *in vitro* em células de fígado de *zebrafish* que

dentre os quatro compostos avaliados nenhum apresentou diferença significativa nos valores de corte de CC_{50} para as quatro metodologias analisadas e que todos os ensaios performaram de maneira similar. Os autores relatam que os valores similares encontrados na CC_{50} podem ser explicados pelo fato de que nenhum dos compostos analisados interfere nos processos mediados pelas metodologias. Neste contexto, e de maneira contrária aos estudos de Bopp & Lettieri (2008), uma hipótese para os valores de CC_{50} discordantes encontrados para ADA5 seria a do composto interferir em alguma via, inibindo ou estimulando a resposta metabólica.

De maneira similar ao presente estudo, os ensaios de citotoxicidade conduzidos por Franco e colaboradores (2015) ao analisarem os mesmos compostos ADA1, ADA2 e ADA5, demonstraram *in vitro* que células Jurkat apresentaram viabilidade próxima e superior a 100% nas concentrações de 100 μ M (com exceção de ADA5), 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M, 0,01 μ M, 0,001 μ M e 0,0001 μ M. Como observado na Figura 12, os ensaios de MTT são corroborados pelos estudos de Franco e colaboradores (2015), uma vez que em concentrações similares às analisadas (200 μ M [com exceção de ADA5], 20 μ M, 2 μ M, 0,2 μ M, 0,02 μ M, 0,002 μ M e 0,0002 μ M) podemos observar que células BHK-21 apresentam padrões gráficos semelhantes, com viabilidade acima de 100% em relação ao controle de célula. Ainda, o composto ADA5 na concentração de 100 μ M, próxima à de 200 μ M utilizada no presente estudo, também apresentou citotoxicidade quando avaliada através da mesma metodologia de MTT. Novamente em relação aos estudos de Franco e colaboradores, observa-se que na concentração de 1000 μ M do composto ADA5 as células apresentam viabilidade superior à concentração de 100 μ M. O mesmo efeito pode ser observado na Figura 12C onde a concentração de 2000 μ M apresenta viabilidade superior em relação à de 200 μ M, demonstrando o efeito bifásico da molécula. No entanto, apesar dos resultados em concordância é importante salientar que o modelo celular utilizado nos estudos de Franco e colaboradores (2015) é diferente do utilizado no presente estudo.

O efeito hormeses possui a premissa de que uma substância pode apresentar um efeito dose-resposta bifásico (MATTSON, 2008) representando uma estratégia evolutiva apresentada pelos sistemas biológicos de se adaptarem a certas condições impostas pelo ambiente. O estudo de Mattson e

colaboradores (2017) apresenta um exemplo de como as células podem se adaptar e sobreviver quando expostas a agentes tóxicos em certas concentrações. Neste contexto, podemos hipotetizar que o efeito observado para ADA5, quando avaliada pelo MTT, seria na verdade uma adaptação biológica que teria proporcionado uma maior sobrevivência das células. Fato corroborado pela incidência de maior viabilidade celular na concentração de 2000 μM quando comparada à 200 μM .

Ainda avaliando a citotoxicidade, Dye e colaboradores (2019) demonstraram em células Vero utilizando o MTT que a Amantadina na concentração de 200 μM mantém viabilidade celular próxima a 100%. Assim, como o demonstrado na Figura 12 deste estudo, células BHK-21 tratadas com ADA1 e ADA2 apresentam também viabilidade próxima a 100% na concentração de 200 μM . Contudo, é necessário ressaltar que o modelo celular, bem como, os derivados testados aqui são diferentes, apresentando estes últimos sua estrutura química/ grupo substituintes diferente da Amantadina ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}$) com somente a estrutura do triclo-decano (Adamantano) similar ao estudo conduzido por Dye e colaboradores.

Outro parâmetro avaliado acerca da citotoxicidade refere-se à possível influência do diluente utilizado nos compostos. Por se tratarem de moléculas insolúveis em água, os compostos necessitavam de diluição em etanol, cuja toxicidade foi descartada após avaliação de sua maior concentração. Jo e colaboradores (2015) demonstraram em seus estudos com células de cultivo primário de glioblastoma que concentrações muito altas de etanol influenciaram nos resultados de seus ensaios quando estes foram avaliados por MTT. A premissa baseia-se no fato de que uma grande concentração de etanol pode acarretar danos graves à membrana celular, possibilitando a entrada de NADH resultando, conseqüentemente, na redução inespecífica dos sais de tetrazólio. Neste mesmo estudo, os autores demonstram que à medida que a concentração de etanol aumenta, a viabilidade celular diminui. No presente trabalho observou-se que mesmo o controle de etanol na maior concentração testada (equivalente a 2000 μM) não apresentou efeito citotóxico para as células BHK-21 para todos os compostos testados. O controle de etanol apresentou viabilidade de 97% em relação ao controle de célula, se mostrando similar quando avaliado pelo método do AlamarBlue, onde a média dos três experimentos independentes realizados

também apresentou viabilidade de 97%. Desta forma, foi comprovada a ausência de toxicidade do etanol para as células BHK-21, uma linhagem de mamífero, viabilizando os demais experimentos e as testagens seguintes.

Utilizando como embasamento os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, os experimentos subsequentes foram conduzidos com os compostos nas concentrações de 200 μM , 20 μM , 2 μM e 0,2 μM que se mostraram mais pertinentes e promissoras.

O próximo objetivo foi então avaliar se os compostos teriam algum efeito inibitório na multiplicação viral utilizando ensaios de titulação em placa. Estes ensaios são importantes pois mensuram o efeito direto da droga na replicação viral (FIELDS *et al.*, 2013), dinâmica que é diretamente influenciada por fatores como inóculo viral inicial, número de células, tipo de célula e a temperatura de cultivo (MEDINA *et al.*, 2012).

Para os ensaios de titulação deste estudo, mantivemos um período de infecção de 5 dias (120h) para DENV-4 na MOI de 0,1. Tal padrão foi corroborado por uma curva de ciclo múltiplo que teve como objetivo identificar o período de maior produção de partículas virais. No período de 120h obtivemos um título viral de 10^5 PFU/ mL, sendo o maior observado neste ensaio.

Prosseguindo com os ensaios de atividade antiviral, verificou-se uma importante redução na produção de partículas virais (4 e 2 logs, respectivamente) para os compostos ADA1 e ADA2 na concentração de 200 μM . As concentrações de 20 μM e 2 μM dos compostos ADA1, ADA2 e ADA5 também apresentaram redução, entretanto de 1 log viral. Estudos de Joubert e colaboradores (2018) demonstraram a eficácia da molécula do Adamantano contra DENV-2 em células A549, que nas concentrações de $42.8 \mu\text{M} \pm 8.6 \mu\text{M}$ possibilitou uma redução significativa de 50% nos títulos virais. Vasilenko e colaboradores (2019) também demonstraram que variações do grupo substituintes do Adamantano apresentam efeito antiviral para os vírus *Powassan virus* (POWV), *Omsk hemorrhagic fever virus* (OHFV) e *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV). Tais vírus pertencem ao mesmo gênero em que estão classificados os DENV, e, portanto, apresentam ciclo de multiplicação, organização genômica e estruturas morfológicas similares. Os autores relatam que entre as concentrações que variam de 3,7 μM até a concentração de 25 μM os compostos apresentaram efeito antiviral para os vírus mencionados. No presente estudo,

apesar de conduzido com um sorotipo diferente, verificou-se a redução de 1 log viral para DENV-4 quando comparamos concentrações similares às estudadas por Joubert e Vasilenko (20 μM e 2 μM para ADA1, ADA2 e ADA5).

Dey e colaboradores (2019) também conduziram ensaios de titulação utilizando células Vero, CHIKV e Amantadina nas concentrações de 10 μM , 20 μM , 60 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM . Os autores demonstraram uma redução de cerca de 58% dos títulos virais para a concentração de 40 μM e 77% para a concentração de 100 μM . Em nosso estudo, comparando-se concentrações aproximadas, observou-se uma redução de 100% para ADA1 e 50% para ADA2 na concentração de 200 μM e de aproximadamente 25% para os três compostos nas concentrações de 20 μM e 2 μM . Ainda em comparação ao estudo de Dey e colaboradores, observou-se de maneira similar no presente trabalho a redução de partículas virais de modo dose-dependente, ou seja, em concentrações maiores a Amantadina utilizada no estudos de Dey, assim como os compostos (ADA1, ADA2 e ADA5) apresentam maior atividade antiviral. Apesar dos estudos conduzidos por Dey e colaboradores (2019) serem realizados com modelo viral diferente, DENV e CHIKV apresentam características biológicas semelhantes, como material genético de RNA senso positivo, estrutura morfológica composta por envelope, modelo penetração e desnudamento assemelhado. O Adamantano, como já descrito anteriormente, apresenta um grande potencial antiviral por demonstrar afinidade por compostos lipídicos, e, assim, pode agir diretamente sobre uma variedade de vírus envelopados.

Os resultados de atividade antiviral evidenciados no presente estudo indicam que os compostos estão atuando e bloqueando a multiplicação viral em alguma etapa de seu ciclo. Sendo de suma importância conhecer e estudar a interação existente entre o fármaco e a partícula viral, inclusive em um contexto de aparecimento de linhagens mutantes que podem reduzir a eficiência do composto (FIELDS & KNIPE & HOWLEY, 2013).

A interação fármaco-partícula viral já foi descrita e indicada por Koff e colaboradores (1980) em seus estudos com Amantadina e DENV. Os autores demonstram que quando o fármaco é adicionado nos tempos iniciais de infecção, o mesmo apresenta efeito máximo sobre a produção de partículas virais, diferente de quando a Amantadina é adicionada após a adsorção. Estes dados

refletem que o composto esteja possivelmente atuando nos momentos iniciais do ciclo de multiplicação viral (penetração e desnudamento). Tendo isto em vista, podemos pressupor que de maneira similar à Amantadina testada por Koff e colaboradores, os compostos utilizados no presente estudo agiriam de maneira similar, bloqueando o vírus em algum momento inicial do seu ciclo de multiplicação.

O modelo viral que melhor representa o mecanismo de ação da Amantadina já elucidado é o *Influenza A*. Seu mecanismo de ação consiste em bloquear viroporinas (canais M2) com a consequente inibição do desnudamento e bloqueio do ciclo de multiplicação viral. Outros autores demonstram a existência de um mecanismo similar e de maneira inédita, porém com vírus CHIKV. Dey e colaboradores (2019), apontam que 6K é uma suposta proteína formadora de canais iônicos ou viroporinas que se associa principalmente às membranas do retículo endoplasmático. Os autores demonstraram que a Amantadina na concentração de 1 μ M foi capaz de inibir os canais iônicos virais, a fusão de vesículas e as propriedades de permeabilidade de membrana, sendo todas estas funções exercidas pela proteína 6K. Neste contexto, estudos de Tomar e colaboradores (2019) propõem candidatos a viroporinas para os vírus da DENV, WNV, Varíola e *Eastern equine encephalitis vírus* (EEE). Os autores sugerem que para DENV, o fragmento da proteína NS2B denominado 2K atuaria como uma viroporina, sendo capaz de alterar o pH do meio em experimentos conduzidos com bactérias modificadas, sugerindo assim uma condutividade de íons H⁺. Do mesmo modo, com base nos estudos já citados, podemos inferir que os compostos derivados do Adamantano poderiam apresentar um tropismo específico para a proteína 2K de DENV bloqueando a acidificação do pH e o consequente desnudamento. Contudo, ainda existem lacunas acerca dos mecanismos de multiplicação viral e da real função da proteína 2k sobre o ciclo de multiplicação de DENV. Estes trabalhos apresentam um indicativo do possível mecanismo de ação do Adamantano sobre os DENV, trazendo novas perspectivas de aprofundamento do presente estudo.

Ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, que inicialmente se propunha a analisar o efeito antiviral dos compostos sobre os DENV-1,2,3 e 4, nos deparamos com diversos obstáculos. Devido a variações do genótipo entre os sorotipos, observou-se padrões variados relacionados a efeito citopático,

fenótipo de placa e o tempo de coleta do sobrenadante. Padronização que demandou mais tempo do que o desejado e nos permitiu continuar para esta dissertação apenas com o DENV-4 que se mostrou mais consistente e reprodutível nos ensaios iniciais.

De fato, alguns autores demonstram que existe certa dificuldade em se trabalhar com DENV em laboratório e com os diferentes sorotipos. Esta dificuldade foi observada em cultivo ao longo das diversas tentativas de padronização, onde os vírus não produziam altos títulos *in vitro* e se multiplicavam de maneira inconsistente. Sendo assim, o modelo de células utilizado no presente trabalho não favoreceu a obtenção de altos títulos virais, prejudicando o andamento dos ensaios com os demais sorotipos. Alguns autores relatam variação no rendimento viral para sorotipos distintos, fato que é diretamente influenciado pelo tempo de infecção que também se apresenta de forma bem particular para cada vírus. Como exemplo, um estudo conduzido por Quintero-Gil e colaboradores (2018), demonstrou que o cultivo de DENV-1 e DENV-4 em células C6/36 apresenta melhor rendimento viral (10^7) no oitavo e no quarto dia pós-infecção, respectivamente. Os autores ainda debatem que, *in vitro*, DENV-2 apresenta em células C6/36 um maior título viral (10^8) e efeito citopático após o segundo dia de infecção quando comparado aos demais sorotipos. Tais resultados são condizentes com os dados epidemiológicos que reportam que o DENV-2 é o sorotipo com o maior número de infecções registradas em todo o mundo, sendo o mais associado a manifestações graves da doença, o que pode estar diretamente relacionado à capacidade de replicação do vírus. E por fim, em relação ao sorotipo DENV-3, os autores relatam que foi o sorotipo que apresentou um menor título viral (10^5) em relação a DENV-2, além de um efeito citopático menos evidente. De fato, como apresentado na Figura 21, os diferentes sorotipos apresentam efeitos distintos, sendo que DENV-2 apresentou o efeito citopático mais acentuado quando comparado ao controle e demais sorotipos. Estes dados refletem a realidade desafiadora por trás do desenvolvimento de antivirais para DENV.

Apesar de todos os entraves e tendo em vista os promissores resultados apresentados, os compostos ADA1 e ADA2 na concentração de $200\mu\text{M}$ demonstraram ser antivirais promissores para DENV-4 e potencialmente para os demais sorotipos.

7 CONCLUSÃO

- Os três derivados da Amantadina não se mostraram tóxicos em células BHK-21 na maioria das concentrações testadas e, por serem compostos puros, sintéticos e de fácil produção em larga escala, são compostos promissores para uso em indústria farmacêutica;

- Os compostos ADA1 e ADA2 na concentração de 200 μ M apresentam grande potencial antiviral contra DENV-4, uma vez que foram capazes de reduzir os títulos virais em 100 e 50%, respectivamente;

- ADA1, ADA2 e ADA5, demonstraram efeito dose-dependente para DENV-4, com o bloqueio na multiplicação do vírus sendo diretamente proporcional à concentração do composto testado;

- ADA1 e ADA2 na concentração de 200 μ M apresentam promissor potencial antiviral para todos os sorotipos de DENV, tendo em vista os ensaios preliminares realizados, contudo novos testes precisam ser conduzidos.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Tendo em vista os resultados apresentados utilizando o modelo DENV-4, um importante arbovírus no contexto nacional e mundial, o presente trabalho prevê como perspectivas imediatas:

- Avaliar a atividade antiviral dos compostos estudados para os sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3;

- Estudar o mecanismo de ação dos compostos nas diferentes fases do ciclo de multiplicação viral, com uma abordagem mais aprofundada das fases de adsorção, penetração e desnudamento;

- Caracterizar a atividade antiviral em modelo animal.

9 ANEXOS

9.1 *Produção científica*

1. SILVA, D. S. O. D. E. ; **GUIMARÃES, M. V.** ; FRANCO, G. M. ; FONSECA, F. G. ; STANCIOLI, E. F. B. . Recombinant MVA viruses expressing HBZ-multiepitope proteins: Analysis of HTLV-1 vaccine candidates. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

2. **GUIMARÃES, M. V.**; SILVA, D. S. O. D. E. ; ROCHA, R. P. ; SEFURO, A. V. ; FRANCO, G. M. ; FATIMA, A. ; FONSECA, F. G. ; STANCIOLI, E. F. B. . AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS DERIVADOS DO ADAMANTANO PARA Dengue vírus SOROTIPO 2 (DENV-2). 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

3. **GUIMARÃES, M. V.**; FRANCO, G. M. ; SEFURO, A. V. ; SILVA, D. S. O. D. E. ; FATIMA, A. ; FONSECA, F. G. ; STANCIOLI, E. F. B. . AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE DERIVADOS DO ADAMANTANO CONTRA DENGUE VIRUS. 2018. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

9.2 *Organização de eventos, congressos, exposições e feiras*

1- VI Simpósio de Microbiologia da UFMG: conecta SIM - Microbiologia Interligada. 2019.

2- Doenças Neurodegenerativas no século XXI. 2018.

3- V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG PROFESSOR EDUARDO OSÓRIO CISALPINO. 2018.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRUPIS *et al.* Trends in dengue research in the Philippines: A systematic review. **Neglected Tropical Diseases**,13(4): e0007280, April 25, 2019.

Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007280>>

Acesso em: 09 mar. 2020.

AZAMI, N.A.M. *et al.* Genotype-specific and cross-reactive neutralizing antibodies induced by dengue virus infection: detection of antibodies with different levels of neutralizing activities against homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 2 in common marmosets (*Callithrix jacchus*).

Virology Journal, 15(1):51, 2018. **Disponível em:**

<<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-018-0967-x>>.

Acesso em: 31 mar. 2018.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, 22(64):53–72, 2008. **Disponível em:** <https://cutt.ly/UrAzNI8>. **Acesso em:** 17 mar. 2018.

BEATTY, P. R. *et al.* Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. **Science Translational**

Medicine, 7(304):304ra141, 2015. **Disponível em:**

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26355030>>. **Acesso em:** 17 abr. 2018.

BENARROCH, D. *et al.* The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core.

Virology, 328(2):208–218, 2004. **Disponível em:**

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464841>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

BESERRA, E. B. *et al.* Efeitos da temperatura no ciclo de vida, exigências térmicas e estimativas do número de gerações anuais de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Iheringia. Série Zootologia*, 99(2): 142–148, 2009. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15464841>>. **Acesso em:** 25 mar. 2018.

BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446):504–507, 2013. **Disponível em:** <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12060>>. **Acesso em:** 1 abr. 2018.

BLÁZQUEZ, A. B.; MARTÍN-ACEBES, M. A.; SAIZ, J.-C. Inhibition of West Nile Virus Multiplication in Cell Culture by Anti-Parkinsonian Drugs. *Frontiers in Microbiology*, 7:296, 2016. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27014219>>. **Acesso em:** 22 abr. 2018.

BOYD, K.; HARRISON, J. M.; KAVANAUGH, M. J. False-Positive Monospot in a Returning Traveler with Dengue Fever. *Military Medicine*, 183(3–4):e235–e236, 2018. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29514339>>. **Acesso em:** 29 abr. 2018.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(2):113–118, 2007. **Disponível em:** <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742007000200006>. **Acesso em:** 14 abr. 2018.

BRESSANELLI, S. *et al.* Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *The EMBO Journal*, 23(4):728–38, 2004. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963486>>. **Acesso em:** 23 mar. 2018.

BYK, L. A.; GAMARNIK, A. V. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annual Review of Virology*, 3(1):263–281, 2016. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27501261>>. **Acesso em:** 26 mar. 2018.

BYK L.A. *et al.* Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. **MBio**, 28; 7(3), 2016. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27501261>>. **Acesso em:** 06 ago. 2019.

CABARCAS-MONTALVO, M. *et al.* Discovery of antiviral molecules for dengue: In silico search and biological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 110:87–97, 2016. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26807547>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

CALDERÓN-PELÁEZ, MARÍA-ANGÉLICA; *et al.* Dengue Virus Infection of Blood–Brain Barrier Cells: Consequences of Severe Disease. **Frontiers in Microbiology** 10: 1435. 2019 **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6606788/>> . **Acesso em:** 22 ago. 2019.

CARDOSA, M. J. *et al.* Antibodies against prM protein distinguish between previous infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. **BMC Microbiology**, 2: 9, 2002. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12019028>>. **Acesso em:** 4 abr. 2018.

CASTRO, M. C.; WILSON, M. E.; BLOOM, D. E. Disease and economic burdens of dengue. **The Lancet Infectious Diseases**, 17(3):e70–e78, 2017. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185869>>. **Acesso em:** 17 mar. 2018.

CATTEAU, A. *et al.* Dengue virus M protein contains a proapoptotic sequence referred to as ApoptoM. **Journal of General Virology**, 84(10):2781–2793, 2003. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679613>>. **Acesso em:** 27 mar. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, NATIONAL CENTER FOR EMERGING AND ZOO NOTIC INFECTIOUS DISEASES (NCEZID), DIVISION OF VECTOR-BORNE DISEASES (DVBD). **CDC**. Dengue. **Disponível em:** <<https://www.cdc.gov/dengue/symptoms/index.html>>. **Acesso em:** 14 abr. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, NATIONAL CENTER FOR EMERGING AND ZOO NOTIC INFECTIOUS DISEASES (NCEZID), DIVISION OF VECTOR-BORNE DISEASES (DVBD). **CDC**. **Disponível em:** <<https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>>. **Acesso em:** 24 mar. 2018.

CHADEE, D. D. Studies on the post-oviposition blood-feeding behaviour of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in the laboratory. **Pathogens and Global Health**, 106(7):413–7, 2012. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23265613>>. **Acesso em:** 2 abr. 2018.

CHAMBERS, T. J.; MCCOURT, D. W.; RICE, C. M. Production of yellow fever virus proteins in infected cells: Identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. **Virology**, 177(1):159–174, 1990. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2353452>>. **Acesso em:** 27 mar. 2018.

CHAN, Y. C.; CHAN, K. L.; HO, B. C. *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) in Singapore City: 1. Distribution and density*. **Bulletin of the World Health Organization**, 44(5):617, 1971. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2427851/>>. **Acesso em:** 17 mar. 2018.

CHÁVEZ, J. H. *et al.* Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. **Biologicals**, 38(6):613–618, 2010. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817489>>. **Acesso em:** 23 mar. 2018.

CHIEFFI, P. P. Algumas questões decorrentes da reintrodução do *Aedes aegypti* no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 1(3):385–387, 1985. **Disponível em:** <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1985000300011&lng=pt&tlng=pt>. **Acesso em:** 14 abr. 2018.

CHRISTIE, J. Remarks on “Kidinga Pepo”: A Peculiar Form of Exanthematous Disease. **The British Medical Journal**, 1(596): 577–579, 1872. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2296548/>>. **Acesso em:** 14 abr. 2018.

CHU, J. J. H.; NG, M. L. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. **Journal of Virology**, 78(19):10543–55, 2004. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15367621>>. **Acesso em:** 30 mar. 2018.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, 80(23):11418–31, 2006. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16928749>>. **Acesso em:** 30 mar. 2018.

CORNER, LINDA C. *et al.*, The influence of higher temperature on Dengue-2 virus infected C6/36 mosquito cell line. **Canadian Journal of Microbiology**, 33(10):863-869, 1987. **Disponível em:** <<https://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/m87-151>>. **Acesso em:** 03 fev. 2020.

COSTA, V. V. *et al.* Dengue Virus-Infected Dendritic Cells, but Not Monocytes, Activate Natural Killer Cells through a Contact-Dependent Mechanism Involving Adhesion Molecules. **mBio**, 8(4), 2017. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28765218>>. **Acesso em:** 4 abr. 2018.

DE ALWIS, R. *et al.* Dengue Viruses Are Enhanced by Distinct Populations of Serotype Cross-Reactive Antibodies in Human Immune Sera. **PLoS Pathogens**, 10(10):e1004386, 2014. **Disponível em:** <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1004386>>. **Acesso em:** 14 abr. 2018.

DE LA GUARDIA, C. *et al.* Antiviral Activity of Novel Quinoline Derivatives against Dengue Virus Serotype 2. **Molecules**, 23(3):672, 2018. **Disponível em:** <<http://www.mdpi.com/1420-3049/23/3/672>>. **Acesso em:** 17 mar. 2018.

DE OLIVEIRA LC; RIBEIRO AM; ALBARNAZ JD; TORRES AA; GUIMARÃES LFZ; PINTO AK; PARKER S; DORONIN K; BRIEN JD; BULLER MR; BONJARDIM CA. The small molecule AZD6244 inhibits dengue virus replication in vitro and protects against lethal challenge in a mouse model. **ARCH VIROLOGY**. 165(3):671-681. 2020. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31942645>>. **Acesso em:** 1 fev. 2020.

DEJARNAC, O. *et al.* TIM-1 UBIQUITINATION MEDIATES DENGUE VIRUS ENTRY. **Cell Reports**, 8;23(6):1779-1793, 2018. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29742433/>> **Acesso em:** 06 ago. 2019.

DEJNIRATTISAI, W. *et al.* Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature Publishing Group**, 17, 2016. **Disponível em:** <<https://www.nature.com/articles/ni.3515.pdf?origin=ppub>>. **Acesso em:** 30 abr. 2018.

DESCLOUX, E. *et al.* Climate-based models for understanding and forecasting dengue epidemics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 6(2):e1470, 2012. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348154>>. **Acesso em:** 2 abr. 2018.

DWIVEDI, V. D. *et al.* Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. **Briefings in Functional Genomics**, 16(4):217-227, 2017. **Disponível em:**

<<https://academic.oup.com/bfg/article-lookup/doi/10.1093/bfpg/elw040>>.

Acesso em: 27 mar. 2018.

DEY, D; SIDDIQUI, SI; MAMIDI, P; GHOSH, S; KUMAR, CS; CHATTOPADHYAY, S; GHOSH, S; BANERJEE, M. The effect of amantadine on an ion channel protein from Chikungunya virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 24;13(7), 2019. **Disponível em:**

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31339886>> **Acesso em:** 25 jan. 2019.

DYE, C. The Analysis of Parasite Transmission by Bloodsucking Insects. **Annual Review of Entomology**, 37(1):1–19, 1992. **Disponível em:** <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.en.37.010192.000245>>.

Acesso em: 17 mar. 2018.

EGLOFF, M.-P. *et al.* An RNA cap (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization.

The EMBO Journal, 21(11):2757–68, 2002. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12032088>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

ELIMINATEDENGUE. Our research | World Mosquito Program. **Disponível em:** <<http://www.eliminatedengue.com/our-research>>. **Acesso em:** 20 abr. 2018.

EPELBOIN, Y. *et al.* Successes and failures of sixty years of vector control in French Guiana: what is the next step? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 113(5):e170398, 2018. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29538490>>. **Acesso em:** 24 abr. 2018.

ERICKSON, A. K.; GALE, M. Regulation of interferon production and innate antiviral immunity through translational control of IRF-7. **Cell Research**, 18(4): 433–435, 2008. **Disponível em:** <<http://www.nature.com/articles/cr200846>>.

Acesso em: 4 abr. 2018.

FALGOUT, B. *et al.* Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of Virology**, 65(5):2467–75, 1991. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2016768>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

FAN, J.; LIU, Y.; YUAN, Z. Critical role of Dengue Virus NS1 protein in viral replication. **Virologica Sinica**, 29(3):162–169, 2014. **Disponível em:** <<http://link.springer.com/10.1007/s12250-014-3459-1>>. **Acesso em:** 26 mar. 2018.

FELIX, A. C. *et al.* Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. **Journal of Medical Virology**, 89(8):1477–1479, 2017. **Disponível em:** <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.24789>>. **Acesso em:** 30 abr. 2018.

FERGUSON, N. M. *et al.* Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. **Science**, 353(6303):1033–1036, 2016. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27701113>>. **Acesso em:** 17 abr. 2018.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. DAVID M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. [S.l.]: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

FLASCHE, S. *et al.* The Long-Term Safety, Public Health Impact, and Cost-Effectiveness of Routine Vaccination with a Recombinant, Live-Attenuated Dengue Vaccine (Dengvaxia): A Model Comparison Study. **PLOS Medicine**, 13(11):e1002181, 2016. **Disponível em:** <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002181>>. **Acesso em:** 18 abr. 2018.

FOOTE, B.S.; SPOONER, L.M.; BELLIVEAU, P.P. Boceprevir: a protease inhibitor for the treatment of chronic hepatitis C. **Annals of Pharmacotherapy**. 45(9):1085-93, 2011. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21828346>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

FORT, R. C.; VON SCHLEYER, P. R. Adamantane: Consequences of the diamondoid structure. **Chemical Reviews**, 64(3):277–300, 1964. **Disponível em:** <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr60229a004>> **Acesso em:** 16 abr. 2018.

FRANCO, G. D. M. **Novos derivados da amantadina: ensaios de atividade antiviral contra o HTLV-1**. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2015. **Disponível em:** <<https://www.ufmg.br/narede/date/2015/03/04>> **Acesso em:** 21 abr. 2018.

FREITAS, C. DE *et al.* Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 13(1): e0007072, 2019. **Disponível em:** <<https://www.biorxiv.org/content/early/2018/02/15/266361>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

FRITZ, R. *et al.* The unique transmembrane hairpin of flavivirus fusion protein E is essential for membrane fusion. **Journal of Virology**, 85(9):4377–85, 2011. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21325407>>. **Acesso em:** 23 mar. 2018.

GEBHARD, L. G.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. **Viruses**, 3(9):1739–56, 2011. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994804>>. **Acesso em:** 17 jun. 2018.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, 11(3):480–96, 1998. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665979>>. **Acesso em:** 24 fev. 2018.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century. **Dengue Bulletin**, 21: 1–14, 2002. **Disponível em:** <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord%7B&%7Dfrom=export%7B&%7Ddid=L37168479>>. **Acesso em:** 24 fev. 2018.

GUO, C. *et al.* Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990-2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Cellular and Infection**

Microbiology, 7:317, 2017. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28748176>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

GUTSCHE, I. *et al.* Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 108(19):8003–8, 2011. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518917>>. **Acesso em:** 26 mar. 2018.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**, 2:1–26, 2016. **Disponível em:** <<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>>. **Acesso em:** 26 mar. 2018.

PETTERSSON, J.; FIPALACIOS, F. Dating the origin of the genus Flavivirus in the light of Beringian biogeography. **Journal of General Virology**, 95:1969–1982, 2014. **Disponível em:** <<https://doi.org/10.1099/vir.0.065227-0>>. **Acesso em:** 26 fev. 2018.

HALSTEAD, S. B. Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. **Bulletin of the World Health Organization**, 58(1):1–21, 1980. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2395896/>> **Acesso em:** 26 fev. 2018.

HALSTEAD, S. B. Licensed Dengue Vaccine: Public Health Conundrum and Scientific Challenge. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 95(4):741–745, 2016. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27352870>>. **Acesso em:** 18 abr. 2018.

HAMID, R.; ROSTSHEY, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology In Vitro**, 703-710. 2004 **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15251189>>. **Acesso em:** 25 jan. 2020.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K.; ALLISON, S. L. The entry machinery of flaviviruses. *Emergence and Control of Zoonotic Viral Encephalitides*. **Springer Vienna**, 133–

137, 2004. **Disponível em:** <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-0572-6_11>. **Acesso em:** 30 mar. 2018.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, 3(4):376–396, 1990. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358169/pdf/cmr00049-0090.pdf>>. **Acesso em:** 17 jun. 2018.

HIGA, Y. Dengue Vectors and their Spatial Distribution. **Tropical Medicine and Health**, 39(4):17–27, 2011. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500133>>. **Acesso em:** 17 mar. 2018.

HIROTA, J. *et al.* Cross-Reactivity of Japanese Encephalitis Virus-Vaccinated Horse Sera in Serodiagnosis of West Nile Virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, 72(3):369–372, 2010. **Disponível em:** <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/72/3/72_09-0311/_article>. **Acesso em:** 29 abr. 2018.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution**, 3(1):19–28, 2003. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12797969>> **Acesso em:** 29 abr. 2018.

HONÓRIO, N. A. *et al.* Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 98(2):191–198, 2003. **Disponível em:** <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000200005&lng=en&tling=en>. **Acesso em:** 2 abr. 2018.

HOPP, M. J.; FOLEY, J. A. Global-Scale Relationships between Climate and the Dengue Fever Vector, *Aedes Aegypti*. **Climatic Change**, 48(2/3):441–463, 2001. **Disponível em:** <<http://link.springer.com/10.1023/A:1010717502442>>. **Acesso em:** 17 mar. 2018.

HORVAT, M. *et al.* Evaluation of Antiproliferative Effect of N-(alkyladamantyl) phthalimides In vitro. **Chemical Biology and Drug Design**, 79(4):497–506, 2012. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22176512>> **Acesso em:** 17 mar. 2018.

HOUGHTON-TRIVIÑO, N.; MONTAÑA, D.; CASTELLANOS, J. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. **Revista de Salud Pública**, 10(2):299–307, 2008. **Disponível em:** <http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642008000200010&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. **Acesso em:** 30 abr. 2018.

HUERTA, V. *et al.* Characterization of the interaction of domain III of the envelope protein of dengue virus with putative receptors from CHO cells. **Virus Research**, 137(2):225–234, 2008. **Disponível em:** <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170208002815?via%3Dihub>>. **Acesso em:** 28 mar. 2018.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTV**, 2019a. **Disponível em:** <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus>. **Acesso em:** 16 dez. 2019.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTV**, 2019. **Disponível em:** <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20162424>. **Acesso em:** 16 dez. 2019.

JO, H.Y.; KIM Y; PARK H.W.; MOON HE; BAE S; KIM J; KIM DG; PAEK SH. The Unreliability of MTT Assay in the Cytotoxic Test of Primary Cultured Glioblastoma Cells. **Experimental Neurobiology**, 24(3):235-45, 2015. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26412973>> **Acesso em:** 16 dez. 2019.

JOHN, A. L. ST.; RATHORE, A. P. S. Adaptive immune responses to primary and secondary dengue virus infections. **Nature Reviews Immunology**. 19(4):218-230, 2019. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30679808>> **Acesso em:** 4 maio 2019.

JONES, C. T. *et al.* Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein. **Journal of Virology**, 77(12):7143, 2003. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12768036>>. **Acesso em:** 26 mar. 2018.

JOUBERT, D. A. *et al.* Establishment of a Wolbachia Superinfection in *Aedes aegypti* Mosquitoes as a Potential Approach for Future Resistance Management. **PLoS Pathogens**, 12(2):e1005434, 2016. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26891349>>. **Acesso em:** 20 abr. 2018.

JOUBERT, J; FOXEN, E.B; MALAN, Microwave Optimized Synthesis of N-(adamantan-1-yl)-4-[(adamantan-1-yl)-sulfamoyl] benzamide and Its Derivatives for Anti-Dengue Virus Activity. **Molecules**. 10;23(7), 2018. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29996497>>. **Acesso em:** 13 dez. 2018.

JUSOH, T. N. A.; SHUEB, R. H. Performance Evaluation of Commercial Dengue Diagnostic Tests for Early Detection of Dengue in Clinical Samples. **Journal of Tropical Medicine**, 2017:4687182, 2017. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29379526>>. **Acesso em:** 2 maio 2018.

KATZELNICK, L. C.; COLOMA, J.; HARRIS, E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. **The Lancet. Infectious Diseases**, 17(3): e88–e100, 2017. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185868>>. **Acesso em:** 10 mar. 2018.

KLEMA, V.; PADMANABHAN, R.; CHOI, K. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. **Viruses**, 7(8):4640–4656, 2015. **Disponível em:** <<http://www.mdpi.com/1999-4915/7/8/2837>>. **Acesso em:** 31 mar. 2018.

KOFF, W. C.; ELM, J. L.; HALSTEAD, S. B. Inhibition of dengue virus replication by amantadine hydrochloride. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 18(1):125–9, 1980. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7416739>>. **Acesso em:** 25 abr. 2018.

KUHN, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, 108(5):717–25, 2002. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893341>>. **Acesso em:** 18 mar. 2018.

LAI, C.-Y. *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**, 82(13):6631–43, 2008. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448542>>. **Acesso em:** 4 abr. 2018.

LEE, I.-K.; LIU, J.-W.; YANG, K. D. Fatal Dengue Hemorrhagic Fever in Adults: Emphasizing the Evolutionary Pre-fatal Clinical and Laboratory Manifestations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 6(2):e1532, 2012. **Disponível em:** <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001532>>. **Acesso em:** 2 mar. 2018.

LI, L. *et al.* The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. **Science**, 319(5871):1830–1834, 2008. **Disponível em:** <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1153263>>. **Acesso em:** 17 mar. 2018.

LIM, H. Y.; NG, M. L. A different mode of entry by dengue-2 neutralisation escape mutant virus. **Archives of Virology**, 144(5):989–995, 1999. **Disponível em:** <<http://link.springer.com/10.1007/s007050050561>>. **Acesso em:** 30 mar. 2018.

LIN, C.-C.; CHEN, W.-C. Treatment Effectiveness of Amantadine Against Dengue Virus Infection. **The American Journal of Case Reports**, 17:921–924, 2016. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27920420>>. **Acesso em:** 25 abr. 2018.

LIN, S.-W. *et al.* Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. **The Journal of Infection**, 64(3):325–34, 2012. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22138554>>. **Acesso em:** 4 abr. 2018.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **Journal of Virology**, 73(6):4611–21, 1999. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10233920>>. **Acesso em:** 2 abr. 2018.

LIU-HELMERSSON, J. *et al.* Vectorial capacity of *Aedes aegypti*: effects of temperature and implications for global dengue epidemic potential. **PloS One**, 9(3):e89783, 2014. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24603439>>. **Acesso em:** 2 abr. 2018.

LIU, N. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. **Annual Review of Entomology**, 60(1):537–559, 2015. **Disponível em:** <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-010814-020828>>. **Acesso em:** 24 abr. 2018.

LOZANO-FUENTES, S. *et al.* The dengue virus mosquito vector *Aedes aegypti* at high elevation in Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 87(5):902–9, 2012. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22987656>>. **Acesso em:** 17 mar. 2018.

LOW *et al.*, Current Status of Dengue Therapeutics Research and Development. **The Journal of Infectious Diseases**, S 96 :215, 2017. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28403438>> **Acesso em:** 09 mar. 2020.

MAIRUHU, A. T. A. *et al.* Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 23(6):425–433, 2004. **Disponível em:** <<http://link.springer.com/10.1007/s10096-004-1145-1>>. **Acesso em:** 2 maio 2018.

MAKINO, Y. *et al.* Studies on Serological Cross-Reaction in Sequential Flavivirus Infections. **Microbiology and Immunology**, 38(12):951–955, 1994. **Disponível em:** <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1348-0421.1994.tb02152.x>>. **Acesso em:** 29 abr. 2018.

MALET, H. *et al.* Crystal structure of the RNA polymerase domain of the West Nile virus non-structural protein 5. **The Journal of Biological Chemistry**, 282(14):10678–89, 2007. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17287213>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

MALEWICZ, BARBARA; JENKIN, ANDHOWARD M. Cultivation of Dengue virus type 2 in baby hamster kidney cells in serum-free medium. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 28(5):918-920, 1979. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/484777>> **Acesso em:** 14 Dez. 2019.

MANSFIELD, K. L. *et al.* Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. **The Journal of General Virology**, 92(12):2821–9, 2011. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900425>>. **Acesso em:** 29 abr. 2018.

MANSOORI, G. A. Diamondoid Molecules. **Advances in Chemical Physics**, 136:207–258, 2008. **Disponível em:** <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470175422.ch4>>. **Acesso em:** 29 abr. 2018.

MANZANO, M. *et al.* Identification of cis-acting elements in the 3'-untranslated region of the dengue virus type 2 RNA that modulate translation and replication. **The Journal of Biological Chemistry**, 286(25):22521–34, 2011. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515677>>. **Acesso em:** 27 mar. 2018.

MATTSON, MARK P. Hormesis Defined. **Ageing Research Reviews**, 7(1):1–7, 2008. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2248601/>> **Acesso em:** 25 jan. 2019.

MAROVICH, M. *et al.* Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. **The Journal of Investigative Dermatology**, 6(3):219–24, 2001. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11924831>>. **Acesso em:** 28 mar. 2018.

MEDINA, F. *et al.* Dengue virus: Isolation, propagation, quantification, and storage. **Current Protocols in Microbiology**, 27, 2012 **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23184594>>. **Acesso em:** 03 fev. 2020.

MESSINA J.P. *et al.* Global spread of dengue virus types: mapping the 70-year history. **Trends Microbiology**, 22(3):138-46, 2014. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24468533>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

MILLER, J. L. *et al.* The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathogens**, 4(2):e17, 2008. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18266465>>. **Acesso em:** 28 mar. 2018.

MILLER, S. *et al.* The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **The Journal of Biological Chemistry**, 282(12):8873–82, 2007. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17276984>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**, 49:50, 2020. **Disponível em:** <<http://portalms.saude.gov.br/>>. **Acesso em:** 26 abr. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consultoria Jurídica/Advocacia Geral da União. **Nota Técnica**, N° 228/2013. Brasília, 2013. **Disponível em:** <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/12/Amantadina--atualizada-em-04-12-2015-.pdf>>. **Acesso em:** 26 dez. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico**, 50(38), 2019. **Disponível em:** <<http://portalms.saude.gov.br/>>. **Acesso em:** 26 jan 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÃO E INSUMOS ESTRATÉGICOS. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. 1ª edição, p. 47, 2020. **Disponível em:** <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_medicamentos_rename_2020.pdf>. **Acesso em:** 30 jan. 2020.

MODIS, Y. *et al.* A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100(12):6986–91, 2003. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759475>>. **Acesso em:** 23 mar. 2018.

MODIS, Y. *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, 427(6972):313–319, 2004. **Disponível em:** <<https://www.nature.com/articles/nature02165>>. **Acesso em:** 23 mar. 2018

MONDOTTE, J. A. *et al.* Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. **Journal of Virology**, 81(13):7136–48, 2007. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17459925>>. **Acesso em:** 23 mar. 2018.

MONTOYA, M. *et al.* Symptomatic Versus Inapparent Outcome in Repeat Dengue Virus Infections Is Influenced by the Time Interval between Infections and Study Year. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 7(8):e2357, 2013. **Disponível em:** <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002357>>. **Acesso em:** 4 abr. 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **JOURNAL OF**

IMMUNOLOGICAL METHODS. DEC 16;65(1-2):55-63. 1983. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>>. **Acesso em:** 4 abr. 2020.

MOREIRA, L. A. *et al.* A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, 139(7):1268–78, 2009. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20064373>>. **Acesso em:** 20 abr. 2018.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C. I.; YOUNG, P. R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, 215(2):S89–S95, 2017. **Disponível em:** <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiw649>>. **Acesso em:** 2 maio 2018.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, 98(2):192–208, 2013. **Disponível em:** <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354213000624?via%3Dihub>>. **Acesso em:** 26 mar. 2018.

MUSTAFA, M. S. *et al.* Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal, Armed Forces India**, 71(1):67–70, 2015. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609867>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

NEMÉSIO, H.; VILLALÁIN, J. Membranotropic Regions of the Dengue Virus prM Protein. **Biochemistry**, 53(32):5280–5289, 2014. **Disponível em:** <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi500724k>>. **Acesso em:** 26 mar. 2018.

OLIVEIRA, E.R.A; DE ALENCASTRO, R.B; HORTA, B.A.C. New insights into flavivirus biology: the influence of pH over interactions between prM and E proteins. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**; 31(11):1009-1019., 2017. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29064083>> **Acesso em:** 19 maio. 2018.

O'NEILL, S. L *et al.* Scaled deployment of Wolbachia to protect the community from dengue and other Aedes transmitted arboviruses. **Gates Open Research**, 2: 36, 2018. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6305154/>> **Acesso em:** 25 jan. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. **OMS**, 2009. **Disponível em:** <www.who.int/neglected_diseases/en>. **Acesso em:** 2 abr. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Treatment, prevention and control. **OMS**, 2012. **Disponível em:** <shorturl.at/LNRW4>. **Acesso em:** 1 fev. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **OMS**, 2017a. **Disponível em:** <<http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/en/>>. **Acesso em:** 2 abr. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Hepatitis C. **OMS**, 2017b. **Disponível em:** <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. **Acesso em:** 24 fev. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Dengue. **OMS**, 2017c. **Disponível em:** <<http://www.who.int/immunization/diseases/dengue/en/>>. **Acesso em:** 24 fev. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Updated Questions and Answers related to the dengue vaccine Dengvaxia® and its use. **OMS**, 2017. **Disponível em:** <https://www.who.int/immunization/diseases/dengue/q_and_a_dengue_vaccine_dengvaxia_use/en/>. **Acesso em:** 18 abr. 2018.

OXITEC. Oxitec | Site Institucional. **Disponível em:** <<http://br.oxitec.com/solucoes/aedes-do-bem/>>. **Acesso em:** 19 abr. 2018.

PASTEUR, I. S. Sanofi maintains confidence in Dengvaxia® vaccine | Sanofi. **Disponível em:** <<https://www.sanofi.com/en/media-room/articles/2018/sanofi-maintains-confidence-in-dengvaxia-vaccine>>. **Acesso em:** 17 abr. 2018.

PEIRIS, J. S. M.; PORTERFIELD, J. S. Antibody-mediated enhancement of Flavivirus replication in macrophage-like cell lines. **Nature**, 282(5738):509–511, 1979. **Disponível em:** <<http://www.nature.com/doi/10.1038/282509a0>>. **Acesso em:** 4 abr. 2018.

PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Research**, 80(1):11–22, 2008. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18585795>>. **Acesso em:** 9 abr. 2018.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, 11(4):369–77, 2008. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18644250>>. **Acesso em:** 27 mar. 2018.

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Balanço da Dengue. **PBH**, 2019. **Disponível em:** <shorturl.at/hKX34>. **Acesso em:** 25 jan. 2020.

PUERTA-GUARDO, H; GLASNER, D.R; HARRIS, E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. **PLoS Pathogens**, 14:12, 2016. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27416066>>. **Acesso em:** 22 ago. 2019

QUINTERO-GIL, DIANA CAROLINA *et al.* Differences in the replicative capacities of clinical isolates of dengue virus in C6/36 cells and in urban populations of *Aedes aegypti* from Colombia, South America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 22:4, 2018. **Disponível em:** <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702018000400257>. **Acesso em:** 03 fev. 2020.

RAJAPAKSE, *et al.* Prophylactic and therapeutic interventions for bleeding in dengue a systematic review. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 111: 433–439, 2017. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29385613>>. **Acesso em:** 09 mar. 2020

REICH, N. G. *et al.* Interactions between serotypes of dengue highlight epidemiological impact of cross-immunity. **Journal of the Royal Society**, 10(86):20130414, 2013. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825116>>. **Acesso em:** 4 abr. 2018.

REQUENA-CASTRO, ROCÍO; REYES-LÓPEZ, MIGUEL ÁNGEL *et al.* Molecular detection of mixed infections with multiple dengue virus serotypes in suspected dengue samples in Tamaulipas, Mexico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 112:7, 2017. **Disponível em:** <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762017000700520>. **Acesso em:** 27 jan. 2020.

REY, F. A. 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**, 100(12):6899–901, 2003. **Disponível em:** <<http://www.pnas.org/content/100/12/6899.full>>.

REY, F. A. *et al.* The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, 375(6529):291–298, 1995. **Disponível em:** <<http://www.nature.com/doi/10.1038/375291a0>>. **Acesso em:** 23 mar. 2018.

REYES-DEL VALLE, J. *et al.* Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. **Journal of Virology**. 79(8):4557–67, 2005. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15795242>>. **Acesso em:** 28 mar. 2018.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life**

Sciences, 67(16):2773–2786, 2010. **Disponível em:** <<http://link.springer.com/10.1007/s00018-010-0357-z>>. **Acesso em:** 30 mar. 2018.

ROSSI, S. L. *et al.* Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 4 strains. **Virology**, 423(1):58–67, 2012. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178263>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

RÜCKERT, C. *et al.* Antiviral responses of arthropod vectors: an update on recent advances. **Virus Disease**, 25(3):249–60, 2014. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25674592>>. **Acesso em:** 24 fev. 2018.

SALAZAR, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC Microbiology**, 7:9, 2007. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17263893>>. **Acesso em:** 5 mar. 2018.

SAUDI, M. *et al.* Synthesis and evaluation of imidazole-4,5- and pyrazine-2,3-dicarboxamides targeting dengue and yellow fever virus. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 87:529–39, 2014. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25285371>>. **Acesso em:** 3 mar. 2018.

SCHIEFFELIN, J. S. *et al.* Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. **Virology Journal**, 7:28, 2010. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132551>>. **Acesso em:** 2 abr. 2018.

SCHLHYER, P. V. R. A Simple Preparation of Adamantane. **Journal of the American Chemical Society**, 79(12):3292, 1957. **Disponível em:** <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01569a086>> **Acesso em:** 16 abr. 2018.

SCHMID, M. A. *et al.* Mosquito Saliva Increases Endothelial Permeability in the Skin, Immune Cell Migration, and Dengue Pathogenesis during Antibody-Dependent Enhancement. **PLOS Pathogens**, 12(6):e1005676, 2016.

Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005676>>. **Acesso em:** 11 abr. 2018.

SENSE COMPANY. Aedes aegypti fez economia do Brasil perder R\$ 2,3 bilhões em um ano. Imprensa, Comunicado D E, 30v2, 2018. **Disponível em:** <shorturl.at/beiB3> **Acesso em:** 16 abr. 2018.

SHANNON, A. E. *et al.* Simultaneous uncoupled expression and purification of the Dengue virus NS3 protease and NS2B co-factor domain. **Protein Expression and Purification**, 119:124–129, 2016. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26647367>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

SMEE, DONALD F. *et al.* Evaluation of Cell Viability Dyes in Antiviral Assays with RNA Viruses that Exhibit Different Cytopathogenic Properties. **Journal of Virological Methods**, 246: 51–57. 2017. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28359770>>. **Acesso em:** 15 dez. 2019.

SOSELIA, M. *et al.* The Synthesis of Adamantane Ring Containing Benzimidazole, Benzoxazole, and Imidazo[4,5- e]benzoxazole Derivatives from 3-Aminophenol. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 55(2):447–455, 2018. **Disponível em:** <<http://doi.wiley.com/10.1002/jhet.3062>>. **Acesso em:** 25 abr. 2018.

STANAWAY, J. D. *et al.* The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Infectious diseases**, 16(6):712–723, 2016. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26874619>>. **Acesso em:** 24 fev. 2018.

STANDISH, K. *et al.* High dengue case capture rate in four years of a cohort study in Nicaragua compared to national surveillance data. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 4(3);e633, 2010. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300515>>. **Acesso em:** 1 abr. 2018.

SUN, D. *et al.* Expression of functional recombinant mosquito salivary apyrase: A potential therapeutic platelet aggregation inhibitor. **Platelets**, 17(3):178–184, 2006. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702045>>. **Acesso em:** 5 abr. 2018.

SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Dengue: Recent Advances in Biology and Current Status of Translational Research. **Current Molecular Medicine**, 9(2):152–173, 2009. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275624>>. **Acesso em:** 28 mar. 2018.

TASSANEETRITHEP, B. *et al.* DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. **The Journal of Experimental Medicine**, 197(7):823–9, 2003. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682107>>. **Acesso em:** 28 mar. 2018.

TEO, C. S. H.; CHU, J. J. H. Cellular vimentin regulates construction of dengue virus replication complexes through interaction with NS4A protein. **Journal of Virology**, 88(4):1897–913, 2014. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24284321>>. **Acesso em:** 21 abr. 2018.

TEO, D.; NG, L. C.; LAM, S. Is dengue a threat to the blood supply? Transfusion medicine. **Oxford**, 19(2):66–77, 2009. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19392949>>. **Acesso em:** 9 abr. 2018.

THEPPARIT, C.; SMITH, D. R. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. **Journal of Virology**, 78(22):12647–56, 2004. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15507651>>. **Acesso em:** 28 mar. 2018.

THURNER, C. *et al.* Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. **Journal of General Virology**, 85(5):1113–1124, 2004. **Disponível em:**

em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15105528>>. **Acesso em:** 27 mar. 2018.

TIAN, Y.-S. *et al.* Dengue Virus and Its Inhibitors: A Brief Review. **Chemical and Pharmaceutical Bull**, 66(66):191–206, 2018. **Disponível em:** <https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/66/3/66_c17-00794/_article>. **Acesso em:** 3 mar. 2018.

TREMBLAY N.; FREPPEL W.; SOW A, A; CHATEL-CHAIX L. The Interplay between Dengue Virus and the Human Innate Immune System: A Game of Hide and Seek. **Vaccines**, 7(4), 2019. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31658677>> **Acesso em:** 7 jan. 2020.

UNO, N.; ROSS, TM. Dengue virus and the host innate immune response. **Emerging Microbes and Infections**,10;7(1):167, 2018. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30301880>>. **Acesso em:** 5 set. 2018.

U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, N. ClinicalTrials.gov. **Disponível em:** <<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=dengue>>. **Acesso em:** 25 abr. 2018.

UPANAN, S.; KUADKITKAN, A.; SMITH, D. R. Identification of dengue virus binding proteins using affinity chromatography. **Journal of Virological Methods**, 151(2):325–328, 2008. **Disponível em:** <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093408001560?via%3Dihub>>. **Acesso em:** 28 mar. 2018.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. **Química Orgânica**. 6a Ed. Porto Alegre: Bookman, 2013.

VRATSKIKH, O. *et al.* Dissection of Antibody Specificities Induced by Yellow Fever Vaccination. **PLoS Pathogens**, 9(6):e1003458, 2013. **Disponível em:** <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003458>>. **Acesso em:** 3 abr. 2018.

XIE X.; *et al.* Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. **Cell Host Microbe**, S1931-3128(19)30482-2, 2019. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31631053/>> **Acesso em:** 20 out. 2019.

YOUNG, K. I. *et al.* Abundance and distribution of sylvatic dengue virus vectors in three different land cover types in Sarawak, Malaysian Borneo. **Parasites & Vectors**, 10(1):406, 2017. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28859676>>. **Acesso em:** 24 mar. 2018.

YU, I.-M. *et al.* Association of the pr Peptides with Dengue Virus at Acidic pH Blocks Membrane Fusion. **Journal of Virology**, 83(23):12101–12107, 2009. **Disponível em:** <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01637-09>>.

WANKA, L.; IQBAL, K.; SCHREINER, P. R. The lipophilic bullet hits the targets: Medicinal chemistry of adamantane derivatives. **Chemical Reviews**, 113(5):3516–3604, 2013. **Disponível em:** <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr100264t>> **Acesso em:** 20 out. 2019.

WATTERSON, D.; MODHIRAN, N.; YOUNG, P. R. The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design. **Antiviral Research**, 130:7–18, 2016. **Disponível em:** <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26944216>>. **Acesso em:** 26 fev. 2018.

WATTS, A. G. *et al.* Elevation as a proxy for mosquito-borne Zika virus transmission in the Americas. **PloS One**, 12(5)e0178211, 2017. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28542540>>. **Acesso em:** 2 abr. 2018.

WENGLER, G.; WENGLER, G.; GROSS, H. J. Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses. **Virology**, 89(2):423–437, 1978. **Disponível em:** <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/004268227890185X>>. **Acesso em:** 31 mar. 2018.

WHITEHEAD, S. S. *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, 5(7):518–528, 2007. **Disponível em:** <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro1690>>. **Acesso em:** 17 mar. 2018.

WILDER-SMITH, A.; FLASCHE, S.; SMITH, G.P; Vaccine-attributable severe dengue in the Philippines. **The Lancet**, 394(10215):2151-2152, 2019. **Disponível em:** [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(19\)32525-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(19)32525-5/fulltext). **Acesso em:** 15 dez. 2019.

ZHANG, X. *et al.* Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. **Viruses**, 9(11), 2017. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29137162>>. **Acesso em:** 9 abr. 2018.

ZHAO, Y. *et al.* Molecular basis for specific viral RNA recognition and 2'-O-ribose methylation by the dengue virus nonstructural protein 5 (NS5). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 112(48):14834–9, 2015. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26578813>>. **Acesso em:** 31 mar. 2018.

ZOU, J. *et al.* Characterization of dengue virus NS4A and NS4B protein interaction. **Journal of Virology**, 89(7):3455–70, 2015. **Disponível em:** <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25568208>>. **Acesso em:** 31 mar. 2018.