

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

Ana Caroline Zampiroli Ataide

**Antivirais naturais e sintéticos contra
*Dengue virus***

**Belo Horizonte
Fevereiro/2012**

Ana Caroline Zampiroli Ataide

Antivirais naturais e sintéticos contra *Dengue virus*

Monografia apresentada à Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do grau de Especialista em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Alzira Batista Cecílio

**Belo Horizonte
Fevereiro/2012**

LISTA DE ABREVIATURAS

SIGLAS

- ATP**- Adenosina Trifosfato
CC₅₀- Citotoxicidade em 50%
CDs- Células dendríticas
DC-SING- Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DENV- *Dengue virus*
DENV-RdRp- Polimerase de ácido ribonucléico dependente de ácido ribonucléico
DH- Dengue hemorrágica
DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EC₅₀- Concentração necessária para causar 50% de resposta máxima
ELISA- *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
FAT- Fator de ativação de plaquetas
FITC- Isotiocianato de fluoresceína
FHD- Febre hemorrágica da dengue
GTP- Guanosina trifosfato
HHV- *Human herpesvirus*
HIV- *Human immunodeficiency virus*
HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*
HSV- *Herpes simplex virus*
HTS- *High Throughput screening*
IC₅₀- Concentração necessária para causar 50% de inibição
IFN- α - Interferon alfa
IFN- Interferon gama
IgG- Imunoglobulina G
IgM- Imunoglobulina M
IL-1 β - Interleucina 1 beta
MCNT- Máxima concentração não tóxica
MOI- Multiplicity of infection
MTT- Brometo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OMS- Organização Mundial de Saúde
ORF- *Open Read Frame* (Janela aberta de leitura)
PBMCs- *Peripheral Blood Mononuclear Cell*
rRNA- RNA ribossomal
RT-PCR- *Reverse Transcription polymerase chain reaction*
SCD- Síndrome do choque da dengue
SFB- Soro fetal Bovino
siRNA- *Small interfering RNA*
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
tRNA- RNA transportador
VACV- *Vaccinia virus*

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Fig 1: Organização gênômica dos vírus do gênero <i>Flavivirus</i>	18
Fig 2: Esquema mostrando o <i>Dengue virus</i> maduro, E- proteína do envelope; M-Membrana associada a proteína; C- capsídeo	19
Fig 3: Mosquito da espécie <i>Aedes aegypti</i>	19
Fig 4: (A) Larva do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (B) Pupa do mosquito <i>Aedes albopictus</i>	21
Fig 5: Ciclo intracelular dos flavivírus	23
Fig 6 : Manifestações clínicas da dengue, (A) petéquias na pele; (B) coágulos sanguíneos no trato gastrointestinal; (C) hemorragia subconjuntival intensa	26
Figura 7. Casos notificados de dengue de acordo com a semana de início dos sintomas por região do Brasil, 2010 e 2011.	30
Fig 8: Fórmula estrutural do hiperosídeo	36
Fig 9: Proteínas detectadas pela infecção em células C6/36 tratadas com o extrato de <i>D.suffruticosa</i> em várias concentrações em (A) correspondente a 0,025 mg/mL, em (B) 0,05 mg/mL e em (C) 0,1 mg/mL	39
Fig 10: Proteínas detectadas pela infecção nas células C6/36 tratadas com o extrato de <i>D. suffruticosa</i> nas concentrações mais altas em (A) correspondente a 0,2 mg/mL e em (B) 0,4 mg/mL	40
Fig 11: Controle mostrando as proteínas detectadas pela infecção nas células que não passaram pelo tratamento	40
Fig 12: Imagens adquiridas pelo INCA3000, em verde a proteína do envelope do <i>Dengue virus</i> e em azul o núcleo das células	51
Fig 13: Fórmula estrutural da geneticina	53

RESUMO

A dengue é uma enfermidade que ocorre e dissemina-se especialmente em países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do mosquito, *Aedes aegypti*, principal vetor da doença. Tratamentos de infecções, causadas pelo *Dengue virus* (DENV), não são específicos e nem eficazes. A busca por antivirais específicos é uma das estratégias para o tratamento da doença. Dentre os compostos que estão sendo estudados como antivirais contra o DENV, incluem-se os derivados de extratos de plantas, e os subprodutos de seus fracionamentos, compostos sintéticos como os análogos de nucleosídeos e RNAs de interferência. Essa revisão reúne os principais tipos de antivirais contra o *Dengue virus* e as implicações de cada um deles.

Palavras chave: *Dengue virus*, antivirais naturais, antivirais sintéticos

ABSTRACT

Dengue is a disease that occurs and spreads especially in tropical countries, where environmental conditions favor the development and proliferation of the mosquito, *Aedes aegypti*, the main vector of the disease. Treatment of infections caused by *Dengue virus* (DENV), are not specific and not very effective. The search for specific antiviral is a strategy for the treatment of disease. Among the compounds that have been studied as antiviral against DENV, include those derived from plant extracts, isolated compounds, synthetic compounds such as nucleoside analogues, and synthetic analogs of RNA interference. This review brings together the main types of antiviral agents against DENV and the implications of each.

Keywords: *Dengue virus*, natural antiviral, synthetic antiviral

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	14
3.OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral	15
3.1.1 <i>Objetivos específicos</i>	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
5. REVISÃO DE LITERATURA	16
5.1 Histórico	16
5.2 Agente etiológico	17
5.3 Biologia dos vetores	19
5.3.1 <i>O mosquito Aedes aegypti</i>	20
5.3.2 <i>O mosquito Aedes albopictus</i>	21
5.4 Modo de transmissão	22
5.5 Multiplicação viral	22
5.6 Patogênese	24
5.7 Manifestações clínicas	25
5.8 Diagnóstico	26
5.9 Tratamento	27
5.10 Controle e prevenção	28
5.11 Epidemiologia da dengue no Brasil	29
5.12 Uso de plantas medicinais como antivirais	30
5.12.1 <i>Pesquisa de produtos naturais no Brasil</i>	33
5.12.2 <i>Agentes antivirais derivados de extratos de plantas medicinais</i>	35
5.12.3 <i>Atividade antiviral de compostos isolados de extratos de plantas</i>	40
5.13 Estudo da atividade antiviral de produtos marinhos	42
5.14 Atividade antiviral de compostos sintéticos	42
5.14.1 <i>Atividade antiviral de análogos de nucleosídeos</i>	45
5.14.2 <i>HTS automatizado</i>	50
5.14.3 <i>Aminoglicosídeos</i>	53
5.14.4 <i>RNA de interferência</i>	55
6. Alvos em flavivírus para desenvolvimento de antivirais	57
7.CONCLUSÃO	59
8.REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

O complexo *Dengue virus* (DENV) é formado por quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os vírus causadores desta patologia pertencem a família *Flaviviridae*, são sorologicamente relacionados, mas antigenicamente distintos. (TEIXEIRA,1999). A infecção por um deles confere proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros três (FUNASA, 2001).

A dengue é uma enfermidade que ocorre e dissemina-se especialmente em países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A espécie *Aedes albopictus* também é vetor do DENV. O *Ae.albopictus* está presente nas Américas, com ampla distribuição nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, sendo também vetor de manutenção da dengue na Ásia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou um total de 721.546 casos de dengue no país, excluindo os descartados até a semana epidemiológica 39 de 2011. A Organização Mundial de Saúde estima que 50 a 100 milhões de infecções ocorrem anualmente em mais de 100 países endêmicos, colocando quase metade da população do mundo em risco. Em sua pauta a OMS coloca como prioridade o apoio às pesquisas direcionadas para a produção de imunobiológicos capazes de conferir proteção contra os quatro sorotipos dos vírus da dengue, porém ainda não se tem disponível nenhum imunoprotetor para uso em massa.

2. JUSTIFICATIVA

A busca por drogas antivirais mais efetivas e de custo acessível consiste em uma das estratégias para o controle do DENV. Tratamentos de infecções pelo DENV atualmente não são específicos e nem eficazes, o que justifica e torna necessário o estudo com a finalidade de se identificar e oferecer à população compostos potencialmente ativos na prevenção e/ou terapêutica da infecção.

A revisão de pesquisas nesta área possibilita o melhor entendimento de quais compostos poderão ser utilizados no tratamento da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar uma revisão bibliográfica a respeito de compostos naturais e sintéticos que apresentam atividade antiviral contra o DENV.

3.1.1 *Objetivos Específicos*

- Descrever os principais tipos de antivirais disponíveis com atividade contra DENV;
- Delinear os diferentes métodos de citotoxicidade que são utilizados para avaliação destes compostos;
- Descrever os principais alvos moleculares e o mecanismo de ação destes compostos naturais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Com o intuito de alcançar o objetivo proposto de descrever os principais agentes antivirais estudados contra DENV foi realizada uma pesquisa bibliográfica a respeito de antivirais naturais e sintéticos. Para a busca de artigos científicos realizou-se um levantamento na base de dados de sites como Scielo, Science , Science Direct e Pubmed. Os termos utilizados como descritores foram: Antivirais e Dengue; Compostos naturais e Dengue; e Antivirais sintéticos e Dengue.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Histórico

Os agentes etiológicos da febre amarela e da dengue foram os primeiros micro-organismos a serem denominados vírus, em 1902 e 1907, respectivamente, descritos como agentes filtráveis e submicroscópicos (TEIXEIRA,1999).

A etiologia viral da dengue foi determinada em 1906, quando Ashburn e Craig encontraram um agente infeccioso filtrável em sangue humano. Bancroft descreveu a transmissão do DENV pelo *Ae. aegypti* em 1906 (PONTES & NETTO, 1994). Logo depois, a transmissão foi confirmada por Agramonte e colaboradores (TEIXEIRA,1999).

Sabin e Schlesinger, durante a Segunda Guerra Mundial, em 1945, isolaram a cepa Havaí. Sabin neste mesmo ano, ao identificar outro vírus em Nova Guiné, observou que as cepas tinham características antigênicas diferentes e passou a considerar que eram sorotipos do mesmo vírus, denominando sorotipos 1 e 2 (TEIXEIRA, 1999). Na década de 50, Hammon e colaboradores isolaram mais dois sorotipos (os sorotipos 3 e 4) quando estudavam a epidemia da dengue hemorrágica ocorrida em Manila (Filipinas), em 1956 (PONTES & NETTO, 1994).

O vetor adaptou-se à ecologia peridoméstica de pequenas vilas antes do tráfico de escravos (DONALÍSIO & GLASSER, 2002). Desde então a espécie vem acompanhando o homem e seus deslocamentos, por isso está sendo reintroduzida em áreas de onde havia sido erradicada anteriormente (SILVA *et al.*, 2003). No Brasil, os primeiros registros de epidemias de dengue ocorreram nos Estados de São Paulo, nos anos de 1851-1853 e 1916 e Rio de Janeiro em 1923. Do começo do século XX aos anos 80, a doença foi praticamente eliminada do país, em virtude do combate ao vetor *Ae. aegypti*, durante campanha de erradicação de febre amarela.

Na década de 80 foram registrados novos casos de dengue em função do ressurgimento do vetor a partir de países vizinhos. Em 1981-1982 os primeiros casos de dengue ocorreram em Boa Vista(PR). Em 1986 e 1987 surgiram registros da doença nos Estados do Rio de Janeiro, Alagoas, Ceará, Pernambuco, Bahia, Minas Gerais e São Paulo. No começo da década de 90 (1990 a 1992) a doença se espalha pelo interior do país com casos registrados no Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Tocantins e outros Estados brasileiros (AMORIM *et al.*, 2009).

5.2 Agente etiológico

O agente etiológico da dengue é o DENV, um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente a família *Flaviviridae*, cujo material genético é constituído de RNA. São conhecidos quatro sorotipos: DENV-1, DENV- 2, DENV- 3 e DENV-4 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O vírus possui RNA de fita simples, senso positivo e envelopado. Possui um grupamento 7-metil-guanosina (um ribonucleotídeo de guanina metilada, denominado CAP) na região 5' e não apresenta cauda poli-A na região 3' (HENCHAL & PUTNAK, 1990). O genoma possui 10644 nucleotídios, com uma janela de leitura aberta (ORF, do inglês *Open Read Frame*) codificando três proteínas estruturais capsídeo, pré-M (membrana) e envelope e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). Das proteínas virais produzidas, a proteína do envelope é uma das mais antigênicas e a proteína NS1 tem papel importante na lise das células infectadas, mediada pelo sistema complemento (BARROS, 2007).

O vírus maduro apresenta três proteínas estruturais juntamente com uma bicamada lipídica empacotando o genoma de RNA viral. A proteína C do nucleocapsídeo forma uma estrutura que envolve o RNA sendo permeável a RNases, tornando a função do envelope lipídico mais importante. A proteína E do envelope e a proteína pré-M (precursora da proteína M) encontram-se imersas na bicamada lipídica. (HENCHAL & PUTNAK, 1990). As figuras 1 e 2 apresentam, respectivamente, a organização genômica dos vírus do gênero *Flavivirus* e um esquema mostrando o DENV maduro, com as proteínas do envelope, as proteínas associadas à membrana e o capsídeo.

Estudos filogenéticos realizados a partir de análises da junção E-NS1 do DENV identificaram que o DENV-1 possui cinco genótipos: genótipo I, que inclui vírus das Américas, África e região sudeste da Ásia; genótipo II, possuindo um vírus isolado no Sri Lanka; genótipo III, englobando uma cepa isolada no Japão em 1943; genótipo IV, que inclui cepas do sudeste da Ásia, Pacífico Sul, Austrália e México; e genótipo V, que possui vírus originários de Taiwan e Tailândia (RICO-HESSE, 1990; GONÇALVEZ *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2000). O DENV-2 é detentor de seis genótipos cuja nomenclatura é Asiático genótipo I, Asiático genótipo II, Americano, Americano/Asiático, Cosmopolita e Silvestre (RICO-HESSE, 1990; LEWIS *et al.*, 1993; TWIDDY *et al.*, 2002). O DENV-3 é composto por cinco genótipos, sendo: genótipo I, com vírus da Indonésia, Malásia, Filipinas e as Ilhas do Pacífico Sul; genótipo II, incluindo vírus da Tailândia; genótipo III, englobando vírus do Sri Lanka, Índia, África e América; genótipo IV, que inclui vírus de Porto Rico; e genótipo V, representado por vírus das Filipinas, Japão e China (LANCIOTTI *et al.*, 1994; WITTKKE *et al.*, 2002; ARAUJO *et al.*, 2009). O DENV-4 compreende dois genótipos: genótipo I, representado por vírus das Filipinas, Tailândia e Sri Lanka; e genótipo II, que inclui vírus da Indonésia, Tahiti, Ilhas do Caribe e Américas Central e do Sul (LANCIOTTI *et al.*, 1997).

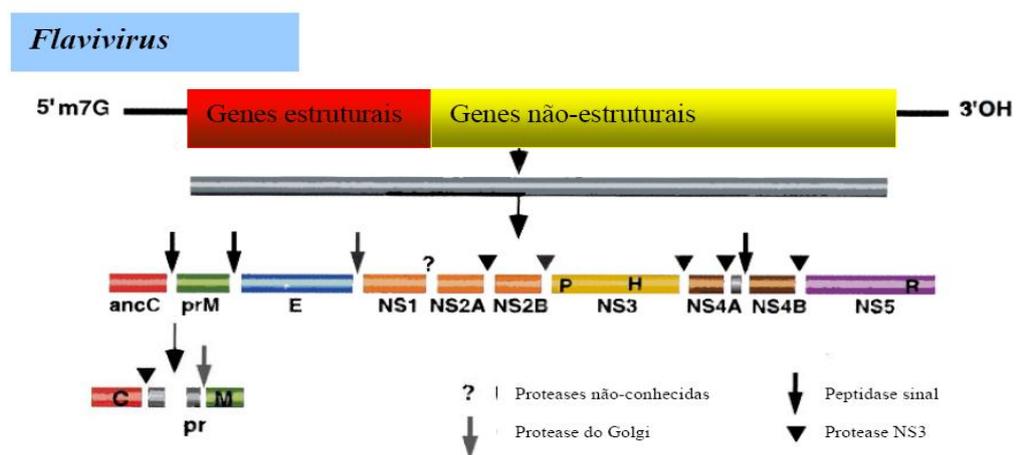


Fig 1: Organização genômica dos vírus do gênero *Flavivirus*
Fonte: BARROS, 2007

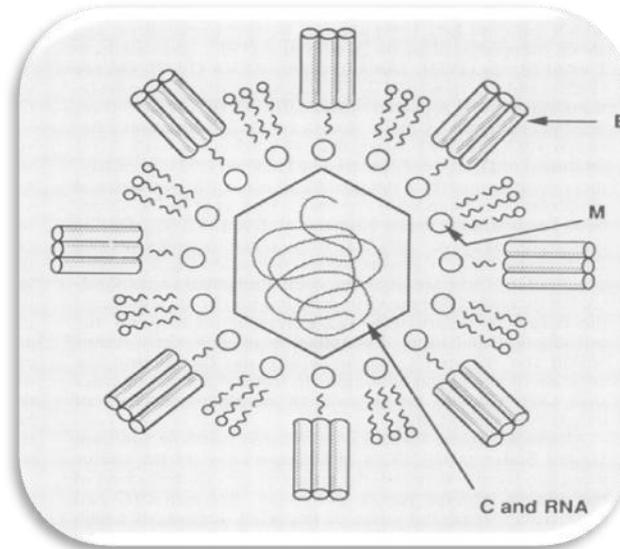


Fig 2: Esquema mostrando o *Dengue virus* maduro, E- proteína do envelope; M-proteína associada a membrana; C- capsídeo
Fonte: (HENCHAL & PUTNAK,1990)

5.3 Biologia dos vetores

Os vetores da doença são mosquitos do gênero *Aedes*. O *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) e também o *Ae. albopictus* (Skuse, 1894) pertencem ao ramo Arthropoda e à família Culicidae. (FUNASA, 2001). A expansão geográfica de populações de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* apresenta influência de fatores ambientais e sociais. Entre eles estão o clima, a densidade demográfica e a atividade econômica (GLASSER & GOMES, 2002). A figura 3 ilustra o mosquito da espécie *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.

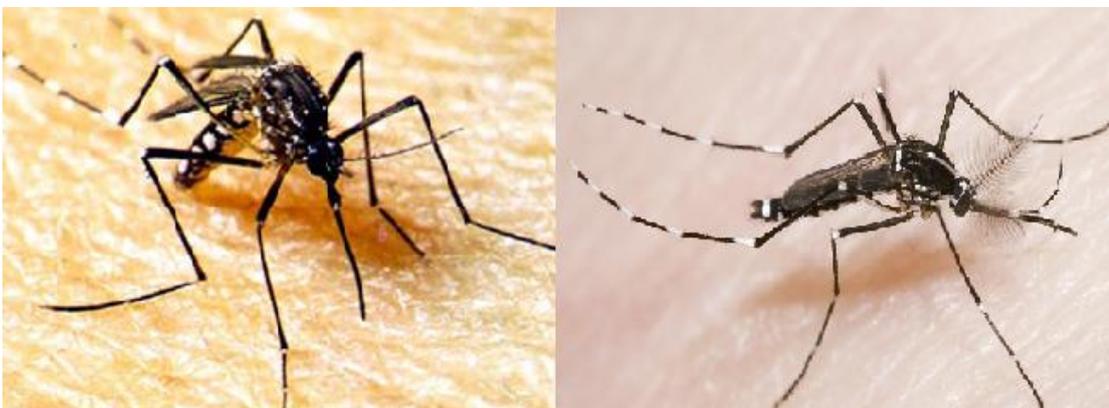


Fig 3: (A) Mosquito *Ae. aegypti*. **(B)** Mosquito *Ae. albopictus*
Fonte: (Barros, 2007)

5.3.1 O mosquito *Aedes aegypti*

O *Ae. aegypti* é uma espécie tropical e subtropical, presente entre as latitudes 35°N e 35°S. A distribuição dessa espécie também é limitada pela altitude. Embora não seja muito comum encontrá-lo acima dos 1.000 metros, já foi evidenciada sua presença a 2.200 metros acima do nível do mar, na Índia e na Colômbia (FUNASA, 2001).

Por sua estreita associação com o homem, o *Ae. aegypti* é, essencialmente, um mosquito urbano, encontrado em maior abundância em cidades, vilas e povoados. Porém no Brasil, México e Colômbia, esse mosquito já foi encontrado em zonas rurais, provavelmente transportado de áreas urbanas em vasos domésticos, onde se encontravam ovos e larvas (FUNASA, 2001).

O ciclo de vida do *Ae. aegypti* compreende quatro fases: ovo, larva (quatro estágios larvários), pupa e adulto (FUNASA, 2001).

Em condições favoráveis de umidade e temperatura o embrião se desenvolve em cerca de dois dias. Depois do desenvolvimento embrionário os ovos são capazes de resistir a longos períodos de dessecação, que podem prolongar-se por mais de um ano. Já foi observada a eclosão de ovos com até 450 dias, quando colocados em contato com a água. A resistência dos ovos de *Ae. aegypti* à dessecação é um sério obstáculo para a sua erradicação. Esta condição permite que os ovos sejam transportados a grandes distâncias, em recipientes secos, tornando-se assim o principal meio de dispersão do inseto chamada de dispersão passiva (FUNASA, 2001). As figuras 4A e 4B representam respectivamente, a larva do mosquito *Ae. aegypti* e a pupa do mosquito *Ae. albopictus*.

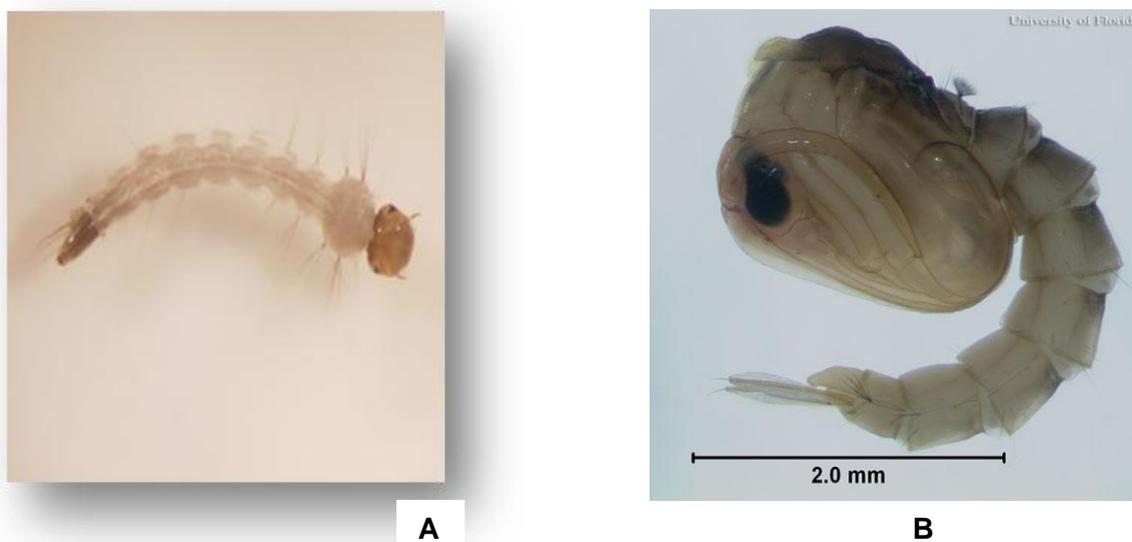


Fig 4: (A) Larva do mosquito *Ae. aegypti* **(B)** Pupa do mosquito *Ae. aegypti*
Fonte: (FUNASA, 2001)

O mosquito adulto representa a fase reprodutora do inseto. O adulto dispersa seus ovos, porém pode ocorrer transporte passivo.

As fêmeas se alimentam de sangue, servindo como fonte de repasto a maior parte dos animais vertebrados, principalmente o homem. O repasto sanguíneo das fêmeas fornece proteínas para o desenvolvimento dos ovos e ocorre quase sempre durante o dia, nas primeiras horas da manhã e ao anoitecer (FUNASA, 2001).

Quando o mosquito está infectado pelo vírus da dengue ou da febre amarela, pode haver transmissão transovariana destes. Os adultos de *Ae. aegypti* vivem em média de 30 a 35 dias (FUNASA, 2001).

5.3.2 O mosquito *Aedes albopictus*

O primeiro achado da espécie ocorreu nos fins de maio de 1986 em Itaguaí, município do Rio de Janeiro sendo em seguida encontrados novos focos em Minas Gerais e no Espírito Santo (FUNASA, 2001). A espécie se adapta ao domicílio e têm como criadouros recipientes de uso doméstico como jarros, tambores, pneus e tanques. Além disso, está presente no meio rural, em ocos de árvores, na imbricação das folhas e em orifícios de bambus. Essas características de distribuição e capacidade de adaptação a diferentes ambientes e situações

determinam dificuldades para a erradicação através da mesma metodologia seguida para o *Aedes aegypti*. Além da sua maior valência ecológica, tem como fonte alimentar sangue humano, sangue de outros mamíferos, e até mesmo de aves. Esta espécie é mais resistente ao frio que o *Aedes aegypti* (FUNASA, 2001).

5.4 Modo de transmissão

A doença é transmitida pela picada dos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* infectados. Após o repasto sanguíneo o mosquito está apto a transmitir o vírus, depois de 8 a 12 dias de incubação (Ministério da Saúde, Guia de Vigilância Epidemiológica, 2002). O período de transmissibilidade compreende o ciclo intrínseco que ocorre no ser humano e o extrínseco que ocorre no vetor. O ser humano pode transmitir o vírus para o mosquito enquanto houver a presença do vírus no sangue. O período de viremia ocorre, em média, um dia antes do aparecimento da febre até o sexto dia da doença. Logo após o repasto de sangue infectado, o vírus irá se localizar nas glândulas salivares da fêmea do mosquito, onde se multiplica durante oito a doze dias de incubação. A partir daí, o mosquito vetor é capaz de transmitir a doença e assim permanece até o final de sua vida, cerca de seis a oito semanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

5.5 Multiplicação viral

A multiplicação viral se inicia quando o DENV encontra uma célula hospedeira. O contato inicial do vírion com a célula hospedeira acontece por meio de receptores existentes na superfície da membrana da célula que irão mediar a adsorção viral. O DENV tem como mecanismo de penetração, a endocitose mediada por receptor. Tem sido proposto que este processo envolve dois ou mais receptores da célula-alvo: um receptor ubíquo, de baixa afinidade, como o DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) que inicialmente captura o vírion para a superfície celular, aumentando assim a concentração local de vírus, e um correceptor, de alta afinidade, no qual medeia a internalização do vírion (CLYDE *et al.*, 2006). Após a endocitose, o ambiente ácido do endossoma dispara um processo irreversível de trimerização da proteína E, o que resulta na fusão das membranas celular (endossomal) e viral (CLYDE *et al.*, 2006). O cerne viral é então liberado no citoplasma da célula alvo e, em seguida, ocorre a

dissociação do capsídeo protéico do genoma de RNA, processo denominado desnudamento (CHAMBERS *et al.*, 1990; NAVARRO-SÁNCHEZ *et al.*, 2005).

A fita de RNA senso positivo é traduzida em uma grande poliproteína que, por sua vez, dá origem a polimerase dependente de RNA. Durante o processo de replicação, cópias de uma fita intermediária de RNA de sentido negativo são produzidas e estas servem como molde para a produção de múltiplas cópias da fita de RNA viral sentido positivo. A replicação do RNA de fita positiva ocorre em associação com as membranas derivadas do retículo endoplasmático (CHAMBERS *et al.*, 1990; CLYDE *et al.*, 2006). Após vários ciclos de tradução, níveis elevados das proteínas C, prM e E são sintetizadas. Estas proteínas são arranjadas juntamente com o genoma viral nas membranas do retículo endoplasmático da célula hospedeira, dando origem à progênie de vírions, que são transportados pelo complexo de Golgi e secretados posteriormente pelo processo de exocitose (CHAMBERS *et al.*, 1990; CLYDE *et al.*, 2006; MURRAY *et al.*, 2008).

O ciclo de replicação ocorre em cerca de sete dias, período que coincide com o aparecimento dos primeiros sintomas no quadro clínico do paciente (NAVARRO-SÁNCHEZ *et al.*, 2005; CLYDE *et al.*, 2006). A figura 5 mostra o ciclo intracelular dos flavivírus.

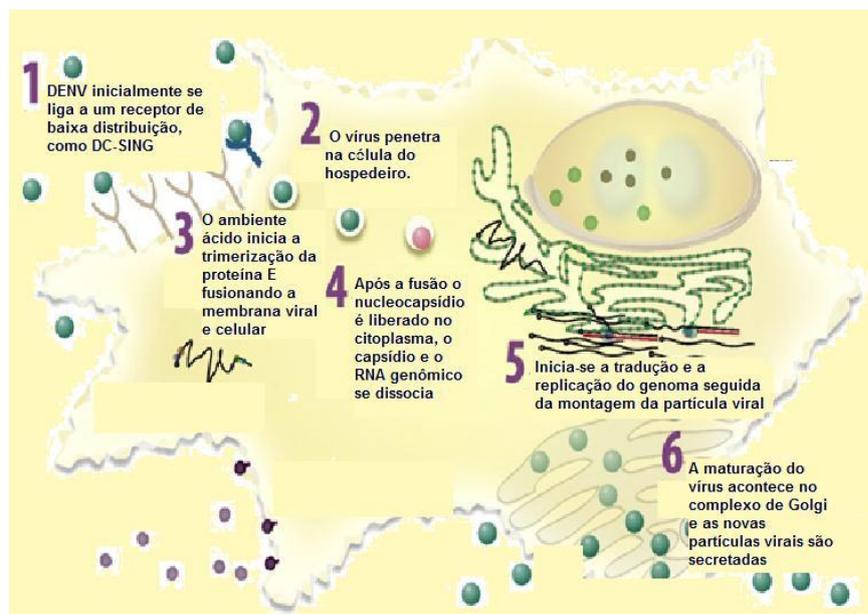


Fig 5: Ciclo intracelular dos flavivírus.

Fonte: CLYDE, 2006.

5.6 Patogênese

Febre e mal-estar surgem após o período de incubação de dois a sete dias, coincidindo com a viremia. Os sintomas se devem ao alto nível de citocinas liberadas por macrófagos ao interagirem com linfócitos T *helper* ativados. Esse alto nível de citocinas também é responsável pela leucopenia e a discreta e transitória depressão medular. Apresenta-se em altos teores séricos interleucina-2(IL-2), CD4 solúvel, interferon-gama (IFN- γ), interferon-alfa (IFN- α), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e o fator de ativação de plaquetas (PAF). As mialgias são consequentes, em parte, à multiplicação viral no próprio tecido muscular, acometendo também músculos oculomotores (FIGUEIREDO, 1999).

A febre causada pelo DENV, nas formas clássica e indiferenciada é autolimitada e o desaparecimento da doença coincide com o surgimento da resposta imune. Os anticorpos, principalmente os que se ligam à proteína E do envelope, promovem a sua lise ou bloqueiam os receptores com consequente neutralização viral, pois a proteína E é responsável pela ligação viral ao receptor de membrana da célula (FIGUEIREDO, 1999).

A resposta humoral, produzida por plasmócitos, costuma ser mais vigorosa. Os anticorpos IgM específicos são detectáveis a partir do quarto dia, após o início dos sintomas. A quantidade se eleva no sétimo dia e no oitavo começa a declinar lentamente, passando a não ser detectável após alguns meses. As IgG específicas são observadas em níveis baixos logo após o quarto dia e se elevam até as duas primeiras semanas. As IgG continuam detectáveis por anos, provavelmente por toda a vida do indivíduo, o que confere imunidade a uma reinfecção pelo mesmo sorotipo viral (FIGUEIREDO, 1999).

O DENV-2 é considerado o mais virulento, seguido pelo DENV-3, 4 e 1, em ordem decrescente. A infecção primária, quando ocorre, permite a produção de anticorpos neutralizantes contra esse primeiro sorotipo inoculado os quais são capazes de proteger o organismo contra outros sorotipos durante curto período de tempo. Isso é conhecido como imunidade cruzada e tem a duração de alguns meses ou poucos anos (LUPI *et al*, 2007).

A dengue hemorrágica de maneira geral é observada em pacientes que já apresentaram infecção por um dos sorotipos e, anos mais tarde, adquiriram outra infecção por um sorotipo diferente do vírus. Quando a segunda infecção é causada

pelo DENV-2, o risco de o paciente apresentar dengue hemorrágica é ainda maior (LUPI *et al.*, 2007).

5.7 Manifestações clínicas

A infecção pelo vírus da dengue causa uma doença cujo espectro inclui desde formas clinicamente inaparentes, até quadros graves de hemorragia e choque podendo evoluir para o óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

A dengue clássica possui como manifestações clínicas febre alta (39°C a 40°C), cefaleia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retro-orbital, náuseas, vômitos, exantema, prurido cutâneo e hepatomegalia dolorosa. Os sintomas podem variar de acordo com a idade, as crianças possuem maior propensão para desenvolver dores abdominais. Os adultos, no final da febre, desenvolvem mais manifestações hemorrágicas. Esses sintomas duram de 5 a 7 dias, acompanhados de debilidade física, que pode se estender por várias semanas (LUPI *et al.*, 2007).

Os sintomas da dengue hemorrágica são semelhantes, porém agravados, juntamente com manifestações hemorrágicas como petéquias, equimoses, sangramentos pelo nariz, gengivorragia e hemorragia em diversos órgãos. Podem ocorrer também colapsos circulatórios (LUPI *et al.*, 2007).

A síndrome do choque da Dengue (SCD) é decorrente da permeabilidade vascular, seguida de hemoconcentração e falência circulatória. É de curta duração podendo levar ao óbito ou à recuperação rápida após terapia antichoque apropriada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Alguns pacientes podem apresentar manifestações neurológicas, como convulsões e irritabilidade, devido ao fato de o DENV-2 e DENV-3 cruzarem a barreira hematoencefálica e invadirem o cérebro (FERREIRA *et al.*, 2005). A figuras 6A, B e C ilustram algumas manifestações clínicas da dengue.



Fig 6 : Manifestações clínicas da dengue, (A) petéquias na pele; (B) coágulos sanguíneos no trato gastrointestinal; (C) hemorragia subconjuntival intensa.

Fonte: LUPI, 2007.

5.8 Diagnóstico

A história epidemiológica é muito importante para distinguir dengue de malária, de febre amarela e de leptospirose. A dengue pode ter seu diagnóstico confundido com gripe ou sarampo devido à erupção cutânea. Manifestações como citopenia intensa e febre podem ser observadas na leucemia aguda e na anemia aplástica, bem como na anemia moderada e grave, que ajudam a diferenciá-las da dengue (LUPI *et al.*, 2007).

Além da observação das manifestações clínicas, o diagnóstico investigativo inclui a contagem de plaquetas, linfócitos ou leucopenia com predomínio de neutrófilos. Podem ser observados diminuição do número de leucócitos totais e aumento do número de linfócitos à medida que a fase febril aproxima-se do final. Um a dois dias antes da fase aguda pode ser observada linfocitose relativa, com aproximadamente 15 a 20% de linfócitos atípicos. Na febre hemorrágica da dengue (FHD), o paciente apresenta trombocitopenia moderada ou marcante (LUPI *et al.*, 2007).

Portanto, o diagnóstico em laboratório é o definitivo para se confirmar os casos da doença, pois a dengue pode ser confundida com muitas enfermidades (BARROS, 2007). O diagnóstico pode ser feito pela detecção do vírus através do isolamento viral, reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento genômico ou por detecção dos anticorpos (SHU & HUANG, 2004). O vírus é encontrado no soro, no plasma, nos glóbulos sanguíneos em circulação ou em tecidos, especialmente em tecidos do sistema imunológico, logo nos primeiros dias da

doença. Para o isolamento, utilizam-se amostras clínicas de pacientes com suspeita de estar com o vírus ativo. Pode-se também, utilizar infecção intracerebral de camundongos, infecção em culturas de células de mamíferos, infecção intratorácica de mosquitos adultos e infecção em cultura de células de inseto (BARROS, 2007). O diagnóstico sorológico é realizado após 5 dias do desenvolvimento da doença. Esses testes possuem limitações devido à reatividade cruzada que pode existir entre os diferentes sorotipos de dengue e outros flavivirus não permitindo a identificação da variedade viral infectante. O método de ELISA é bastante sensível e geralmente mais barato. Ele permite detectar os anticorpos específicos IgM e IgG contra o vírus da dengue (BARROS, 2007).

O diagnóstico molecular é baseado na transcrição reversa (RT-PCR), que permite especificar o tipo de vírus presente na amostra clínica, mesmo que este esteja em quantidades pequenas. Pode-se utilizar também o NESTED-PCR, o sequenciamento baseado na amplificação com ácidos nucléicos, e a PCR em tempo real (SHU & HUANG, 2004). A PCR em tempo real oferece um considerável avanço em termos de detecção e quantificação viral pelo uso de sua tecnologia. (JOHNSON *et al.*,2005). A tipagem utilizando a PCR em tempo real é mais rápida se comparada com a PCR convencional; permite quantificação da carga viral; o produto de PCR não precisa ser avaliado em gel de poliacrilamida ou agarose, o que diminui o risco de contaminação.

5.9 Tratamento

O tratamento é direcionado para o alívio dos sintomas, é feito inicialmente com analgésicos e antipiréticos. O paciente precisa ser bem hidratado. Deve-se avaliar a presença ou não de desidratação e a capacidade do paciente de ingerir líquidos. Não devem ser usados medicamentos derivados do ácido acetil salicílico, por aumentar o risco de hemorragias. Pode haver uma progressão da dengue clássica para a febre hemorrágica e a conduta frente ao paciente depende de sinais clínicos e da evolução da hemoconcentração (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O período que requer maior atenção está entre o terceiro e o oitavo dia, quando os primeiros sinais de evolução do quadro clínico para dengue hemorrágica/síndrome do choque da dengue (DH/SCD) podem ser observados. Os casos de dengue hemorrágica costumam beneficiar-se de hidratação oral

abundante. Quando não é possível a hidratação oral, deve-se considerar a hidratação parenteral intravenosa. Nenhum benefício foi observado com o uso de corticosteróide no tratamento do choque. (LUPI *et al.*, 2007).

Estudos que investigam possíveis antivirais para o tratamento da dengue é de extrema importância uma vez que não existem tratamentos específicos para a doença. Além disso, esse tratamento pode reverter os casos mais graves como a febre hemorrágica da dengue (FH) e a síndrome do choque da dengue (SCD).

5.10 Controle e prevenção

As estratégias de controle incluem os seguintes componentes: saneamento do meio ambiente, ações de educação, comunicação e informação, incluindo ações de combate ao vetor que podem ser de caráter químico, físico ou biológico (TEIXEIRA *et al.*, 1999).

A necessidade de armazenar água para consumo em tonéis é um fator que favorece a proliferação do mosquito vetor. O uso de embalagens descartáveis contribui para a multiplicação dos mosquitos, quando estas embalagens de plástico, alumínio, vidro ou isopor, não são adequadamente recolhidas após a sua utilização. O aumento da produção de veículos automotores contribui igualmente para a multiplicação do vetor, na medida em que aumenta o número de pneus usados dispostos inadequadamente no meio ambiente. Pneus são recipientes prioritários para a postura de ovos pelos mosquitos, e contribuem para o transporte passivo de ovos, larvas e insetos adultos, facilitando a sua disseminação (TAUIL, 2002).

A mobilização comunitária para a adoção de práticas de redução dos vetores é de fundamental importância. A população tem a informação correta, porém suas práticas não são coerentes com o conhecimento do problema. A abordagem do assunto pelos meios de comunicação e pelas escolas deve buscar, justamente, a promoção de mudanças nas práticas habituais facilitadoras da proliferação do *A. aegypti* (TAUIL, 2002).

5.11 Epidemiologia da Dengue no Brasil

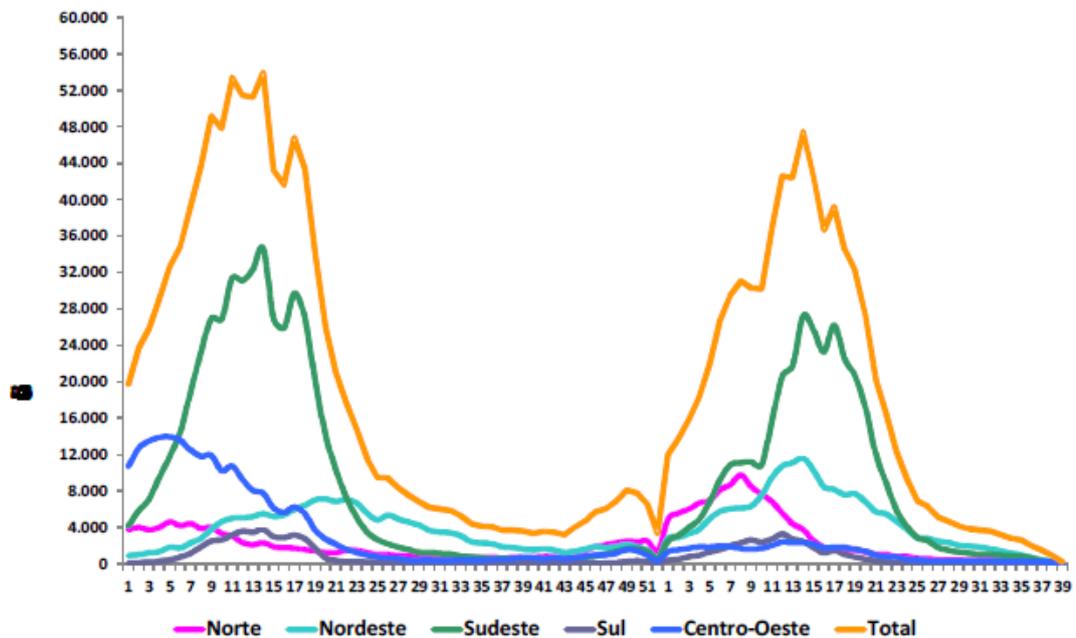
No Brasil ocorrem epidemias desde o século XIX. Em 1916, já existiam relatos de dengue que, entretanto, não foram confirmados por falta de diagnóstico laboratorial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A primeira epidemia confirmada ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista, cidade de Roraima, causada pelos sorotipos 1 e 4. Em 86, ocorreram epidemias no Rio de Janeiro e em algumas capitais da região Nordeste, provavelmente relacionadas à circulação do sorotipo DENV-1. A partir daí, a dengue vem ocorrendo em todo o Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Na década de 90, devido ao aumento significativo da dispersão do *Ae.aegypti* no território nacional, ocorreram vários casos da doença. No ano de 1990 foi identificada a circulação do sorotipo DENV-2. As epidemias se concentraram principalmente nos grandes centros urbanos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil. Em 2000 foi identificada a circulação do sorotipo 3 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A partir de 2008, a Fundação Ezequiel Dias comprovou a transmissão simultânea em Minas Gerais dos sorotipos DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Em julho de 2010 foi detectada a introdução do sorotipo DENV-4 no Brasil, e em Minas Gerais a presença deste sorotipo foi confirmada em setembro de 2011. O que demonstra o maior risco no país de um aumento ainda maior da transmissão da dengue e da ocorrência de casos na forma mais grave da doença.

Ainda em 2011, a Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde registrou um total de 721.546 casos de dengue no país, excluindo os descartados, até a semana epidemiológica 39. Até o dia 23 de fevereiro de 2012 a secretária notificou 6094 casos de dengue em Minas Gerais.

Juntos, esses dados reiteram a importância das ações de controle e prevenção por parte do poder público e da população. A figura 7 apresenta os casos notificados de dengue no ano de 2010 e 2011 (MINISTÉRIO DA SAÚDE,2012)



Fonte: 2010: Sinan banco oficial (18/06/2011); 2011: casos prováveis (Sinan; SES/UF).

Figura 7. Casos notificados de dengue de acordo com a semana de início dos sintomas por região do Brasil, 2010 e 2011.

Fonte: Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde

5.12 Uso de plantas medicinais como antivirais

Desde os tempos remotos a humanidade utiliza as plantas com finalidade terapêutica. Enquanto buscava alimentação para a sua sobrevivência a humanidade foi descobrindo as propriedades tóxicas ou curativas das plantas (ALVES, 2001).

A maioria dos trabalhos com plantas medicinais está voltada para o isolamento e a identificação de substâncias, muitas vezes associados a ensaios biológicos ou estudos quimiotaxonômicos (PUPO *et al.*, 2007).

A Fitoterapia, segundo a Portaria 971(MS/2006) da ANVISA é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. A Fitoterapia vem crescendo nos últimos anos e o mercado mundial gira em torno de 22 bilhões de dólares (YUNES *et al.*, 2001). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde.

Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso. Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese. Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, cerca de 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas (FOGLIO *et al.*, 2006).

Esses medicamentos, após estudos em nível farmacológico, toxicológico e molecular, permitem constatar que apresentam um mecanismo de ação total ou parcialmente esclarecido. A avaliação toxicológica segura envolve estudos de farmacologia pré-clínica e clínica realizados de acordo com as normas que regem os processos de validação de fármacos puros (YUNES *et al.*, 2001).

O fitoterápico é uma substância produzida a partir da planta inteira, sem manipulação química, enquanto que o fitofármaco é um medicamento feito com os princípios ativos manipulados retirados das plantas por procedimentos laboratoriais (SALVI & HEUSER, 2008).

A vantagem do uso de plantas medicinais se deve aos seguintes fatores: efeitos sinérgicos a outros medicamentos; associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes; menores riscos de efeitos colaterais; menores custos em pesquisa. A mistura dos vários compostos presentes na planta na maioria das vezes parece ser mais efetiva que a ação de compostos isolados. (YUNES *et al.*, 2001).

O conhecimento etnofarmacológico ao longo de nossa evolução culminou com o desenvolvimento de fármacos de grande importância na terapêutica atual, tais como o ácido salicílico, a atropina, a pilocarpina, o quinino, a artemisinina, o taxol, a digoxina e a morfina (ALVES, 2001). Programas de triagens de plantas em busca de substâncias biologicamente ativas têm sido desenvolvidos em instituições de pesquisa e na indústria farmacêutica, principalmente, de países mais desenvolvidos. Estes programas são caracterizados por uma abordagem multidisciplinar envolvendo botânica, fitoquímica, biologia, farmacologia, e técnicas moleculares (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

As informações etnofarmacológicas constituem um importante critério para a seleção de plantas na pesquisa de produtos naturais com atividades biológicas. A possibilidade de se encontrar atividade biológica entre plantas usualmente empregadas na medicina tradicional é maior que em triagens aleatórias (MECKE *et al.*, 1995). A busca de novos agentes antivirais e antimicrobianos com base no critério etnofarmacológico tem se mostrado muito promissora. No caso de plantas utilizadas como antimicrobianos, cerca de 80% apresentaram-se ativas. Quanto aos antivirais, no período de 1968 a 1990, foram testadas em torno de 4000 plantas. Desse total, aproximadamente, 450 plantas exibiram algum nível de atividade, *in vitro*, contra uma ou mais espécies de vírus (CHE, 1991; McCUTCHEON *et al.*, 1992; VLIETINCK *et al.*, 1997).

Muitos processos biológicos são extremamente dependentes de interações proteína-proteína, e inúmeras pequenas moléculas que interferem nestas interações são produtos naturais estruturalmente complexos. Como consequência, uma das estratégias mais promissoras para obtenção de diversidade química é justamente associar a capacidade de produção de compostos da química combinatória à diversidade química e complexidade estrutural dos produtos naturais, produzindo coleções combinatórias menores derivadas da qualidade dos produtos naturais, uma abordagem denominada Síntese Orientada pela Diversidade (do inglês “Diversity Oriented Synthesis”, DOS). Os efeitos sinérgicos ou cooperativos entre compostos podem ser perdidos após os fracionamentos. Uma estratégia para atenuar esse problema seria realizar o fracionamento com resinas que levam a obtenção de frações menos complexas (PUPO *et al.*, 2007).

Alguns laboratórios usam também sistemas de HPLC (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) preparativo paralelo para separar um grande número de extratos brutos, possibilitando que amostras relativamente puras entrem nas triagens iniciais, aumentando a possibilidade de sucesso de identificação de novos produtos bioativos (PUPO *et al.*, 2007).

5.12.1 Pesquisa de produtos naturais no Brasil

No Brasil a pesquisa moderna teve início em meados do século passado e tem sido foco de constantes revisões, indicando uma preocupação com a diversidade a ser pesquisada, a qualidade e objetividade dos trabalhos bem como sua divulgação no meio científico. A busca das propriedades curativas de plantas a partir de seus constituintes isolados, “princípios ativos”, traduz uma visão reducionista no que diz respeito à pesquisa científica sobre plantas medicinais, podendo esta mesma visão ser estendida a outros reinos estudados sob a mesma ótica (PUPO *et al.*, 2007).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies vegetais catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (ALVES, 2001). Apesar da sua rica biodiversidade, estes recursos ainda não são bem explorados. Verifica-se que o mercado de fitoterápicos cresce nos países mais desenvolvidos (SILVA *et al.*, 2006).

Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas. (FOGLIO, M.A *et al.*, 2006; YUNES *et al.*, 2001).

Existe um pequeno número de patentes relacionadas com a área de Produtos Naturais registradas por brasileiros, cerca de 5,8% das 738 patentes registradas a respeito de plantas nativas brasileiras. A lei de patentes nacional não aceita apenas a descoberta de um princípio ativo natural, mas requer aplicação industrial e novidade inventiva para o reconhecimento de uma patente (PUPO *et al.*, 2007).

O crescente interesse por medicamentos oriundos de plantas medicinais, mais especificamente os fitoterápicos, a possibilidade de implementação da fitoterapia no sistema público de saúde nacional e, principalmente, as resoluções RDC nº 17 de 24/02/2000 e RDC nº 48 de 16/03/200443, dispondendo sobre o registro de fitoterápicos no Brasil, fizeram crescer o número de publicações referentes à etnofarmacologia, registrando-se as espécies mais popularmente conhecidas e utilizadas, tanto entre populações indígenas quanto em urbanas, assim como a utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias e no sistema de saúde (PUPO *et al.*, 2007).

As espécies nativas mais estudadas que são de uso popular estão representadas nas famílias Bignoniaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Leguminosae, Annonaceae, Apocynaceae, Lamiaceae e Euphorbiaceae. No entanto, a maioria dos fitoterápicos regularizada pelo governo é de origem exótica (PUPO *et al.*, 2007).

As pesquisas com produtos naturais giram, principalmente, em torno de cerca de 50 famílias, principalmente Leguminosae, Piperaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Anacardiaceae, Lamiaceae, Meliaceae, Bignoniaceae, Annonaceae, Solanaceae, Clusiaceae, Myrtaceae, Apocinaceae e Combretaceae, respectivamente em ordem decrescente de citações, dentre as quais muitas espécies vêm sendo empregadas pelo povo brasileiro (PUPO *et al.*, 2007).

Os estudos estão direcionados especificamente à determinação estrutural, porém uma parte já incluiu ensaios sobre atividade biológica, estudos da via biossintética de compostos ativos, análise quantitativa de marcadores quimiotaxonômicos para controle de qualidade, avaliação da qualidade do fitoterápico comercializado, avaliação da segurança clínica e citotoxicidade, interações medicamentosas entre fitoterápicos e fármacos. Porém, há ainda uma grande lacuna entre atividades biológicas descritas e uso popular, assim como uma carência de estudos quanto aos efeitos adversos, contraindicação, toxicidade e validação da eficácia e segurança do fitoterápico nativo (PUPO *et al.*, 2007).

Ainda falta neste ramo uma política mais ousada do governo, sem repetir erros de abandono de projetos importantes como o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da CEME60 (Central de Medicamentos extinta em 1977), e uma maior objetividade na elaboração dos temas de pesquisa da comunidade científica (PUPO *et al.*, 2007).

5.12.2 Agentes antivirais derivados de extratos de plantas medicinais

Tang & colaboradores (2012) investigaram o efeito antiviral dos extratos metanólicos de *Andrographis paniculata*, *Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *Momordica charantia*, *Ocimum sanctum* e *Pelargonium citrosum* contra DENV-1.

Dentre essas espécies investigadas *O. sanctum* apresentou o mais alto conteúdo de flavonóides (88,6%) enquanto *M.charantia* (21,7%) e *A. paniculata* (24,3%) apresentaram os mais baixos. A máxima concentração não tóxica (MCNT) das seis plantas foi determinada testando os extratos em células Vero *in vitro*. A MCNT apresentada em ordem decrescente foi de *M.charantia* (0,20 mg/mL) > *C.limon* (0,10 mg/mL) > *P.citrosum*, *O.sanctum* (0,10 mg/mL)> *A.paniculata* (0,05 mg/mL) > *C.citratus* (0,001 mg/mL). O ensaio antiviral foi baseado na verificação da inibição, em diferentes intensidades, do efeito citopático induzida pelo DENV-1 nas células VERO. *A paniculata* teve o maior efeito inibitório (75%) seguido por *M.charantia* (50%). Esses resultados foram ainda verificados com um ensaio de inibição *in vitro* utilizando o MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). *C. limon* e *P. citrosum* inibiram o efeito citopático ou evitaram a morte celular causada pelo DENV-1. *O.sanctum* e *C.citratus* mostraram uma leve inibição viral baseada no efeito citopático, porém essa inibição não foi significativa no ensaio de MTT. Porém ensaios morfológicos que não possuem análises quantitativas são subjetivos e necessitam de testes confirmatórios (TANG *et al.*, 2012).

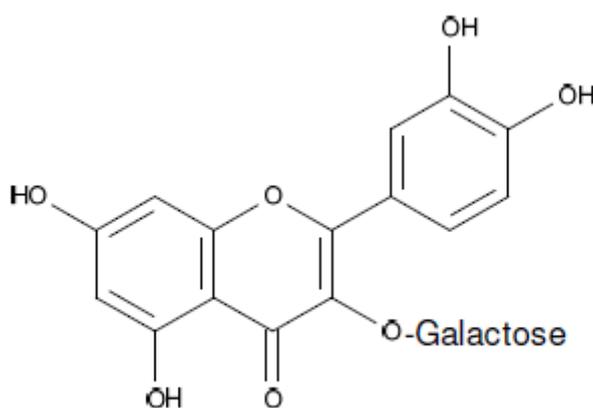
Existem alguns constituintes importantes responsáveis pela atividade antiviral tais como diterpenos (presentes em *A.paniculata*); e lutelina, canfenol e quercetina (flavonóides específicos de *M. charantia*). As plantas com menos flavonóides apresentaram melhor ação antiviral, uma das possíveis explicações para isso é que a relação existente entre a estrutura do flavonóide e a ação antiviral se faz também importante (TANG *et al.*, 2012).

Leardkamolkarn e colaboradores estudaram a atividade antiviral do extrato aquoso de *Houttuynia cordata* (*H. cordata*) contra DENV-2. Os resultados obtidos com a pré e pós incubação do extrato avaliado (variando as concentrações de 10 a 100µg/mL) com células HepG2 mostrou significativa redução intracelular da produção de RNA viral correlacionado com o declínio da expressão de proteínas.

H. cordata pertence a família *Saururaceae*, é reconhecida como planta medicinal e consumida por pessoas no leste e sudeste da Ásia. As propriedades medicinais da planta são utilizadas para tratamento de sinusite crônica e alergias. A planta tem inúmeras utilidades na promoção da saúde e regula reações de inflamações induzidas por sérias patologias. Investigações recentes documentaram efeito de *H. cordata* no tratamento de uma série de distúrbios fisiológicos e imunológicos, como antialérgico, antioxidante e antileucêmico. A propriedade anti-inflamatória da *H. cordata* também foi demonstrada em ratos com síndrome respiratória grave induzida (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2011).

H.cordata já demonstrou ter inibição efetiva na replicação viral de HIV-1 e influenza virus, e inativou herpes virus HSV-1 e HSV-2. Entretanto o componente no extrato que tem ação na inibição desses vírus ainda não foi conhecido, visto que a composição das frações nunca foi revelada. Tem sido relatado que parte da folha desta planta é rica em óleo essencial contendo compostos lipídicos. Estes óleos possuem atividade antibacteriana e anti-inflamatória (LU *et al.*, 2006).

Um dos principais constituintes do extrato, o hiperosídeo (Fig 8), é um composto bioativo efetivo contra a infecção por dengue, que foi demonstrado neste estudo (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2011).



Hiperosídeo

Fig 8: Fórmula estrutural do hiperosídeo
Fonte: SANTOS, K.M.P, 2007

No estudo de Leardkamolkarn e colaboradores (2011) os caules aéreos e folhas de *H. cordata*, cultivada na parte norte da Tailândia, foram coletadas e secas

ao ar. Posteriormente foram esmagados, passando por uma peneira de malha. A solução aquosa do extrato foi filtrada com uma membrana de 0,22µm antes de ser analisada através da cromatografia por HPLC (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2011).

Para os ensaios, o extrato de *H. cordata* foi dissolvido em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e preparado como solução estoque a 100 mg/mL. O extrato foi filtrado através de uma membrana de 0,22µm antes do uso (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2011).

Os ensaios de citotoxicidade foram feitos pelo método do MTT frente as células HepG2 e LLC-MK₂. As células HepG2 são células de carcinoma hepatocelular e as células LLC-MK₂ são linhagens de fibroblasto de rim de *Macaca mulata*. Foram testadas várias concentrações do extrato. A absorbância foi mensurada através do aparelho VERSAMAX™ (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2011).

Três modos de ação foram investigados: modo protetor (A), modo de tratamento (B), e modo bloqueador (C). No modo (A) e no modo (B) as células foram cultivadas por 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após a pré ou pós incubação com 10µg/mL e 100µg/mL do extrato de *H. Cordata* por 3 horas, as células foram inoculadas com DENV-2 MOI (Multiplicidade de infecção) = 0,01, por 1,5h. No modo (C) DENV-2 (5 x 10⁴ PFU/mL) foi pré- misturado com 10µg/mL e 100µg/mL do extrato e incubado a 37°C por 1h. A mistura foi então adicionada as células HepG2 e incubada a 37°C por 1,5h. O inóculo foi removido e as células foram incubadas por 3 dias.

Para verificar a atividade antiviral contra DENV foi feita a quantificação da síntese de RNA viral e análise por citometria. Para a citometria, as células infectadas com dengue, foram examinadas através da expressão da proteína no modo (A) e no modo (B). Para isso as células foram marcadas com anticorpo monoclonal contra a proteína E do envelope viral e anticorpo conjugado com isotiocianato de fluoresceína(FITC). O nível de expressão da proteína do envelope viral foi analisado através do equipamento com software FACSDiva. O sobrenadante da cultura do modo (A) e do modo (B) foi também coletado e titulado (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2011).

Para o modo (C), o ensaio de placa foi feito diretamente após a incubação do extrato com o DENV-2. O percentual de inibição viral foi comparado entre as células tratadas e as células do controle não tratado. Foi realizado ainda, neste estudo, a

avaliação de alterações cromossômicas na célula a partir da análise da divisão mitótica e alterações do cromossomo (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2011).

Como resultado o extrato da planta mostrou atividade de inibição contra DENV-2 em todos os modos de estudo que foram realizados. Porém, a maior atividade antiviral demonstrada foi no modo (A). A concentração de 100µg/mL foi efetiva por mostrar proteção das células infectadas por DENV no modo (A) assim como por diminuir a síntese de RNA intracelular no modo (B) e por inativar o vírus no modo (C). A diminuição da expressão da proteína do envelope de DENV-2 nas células HepG2 correlacionou bem com o número de cópias produzidas de RNA. Nas células LLC-MK₂ a inibição viral mostrou ser dependente da concentração do extrato, uma vez que o efeito tendeu-se a aumentar com as concentrações mais altas (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2011).

O IC₅₀, concentração necessária para causar 50% de inibição na formação de placas virais, foi de 0,8µg/mL. Contudo, o extrato exibiu um baixo efeito citotóxico com CC₅₀ (concentração que causa o decréscimo de 50% no número de células viáveis), de 1,24mg/mL e 1,99mg/mL nas células LLCMK₂ e HepG2 respectivamente e não causou nenhum dano cromossomal. Os componentes do extrato foram considerados seguro para o consumo (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2011).

Através do HPLC pôde-se observar a identificação de quatro flavonoídes: quercetina, ácido clorogênico, quercitrina e hiperosídeo. O hiperosídeo foi o composto mais representativo, podendo-se sugerir que a ação antiviral do extrato seja fortemente influenciada por esse componente. A estrutura do hiperosídeo é um derivado fenólico da quercetina contendo um glicosídeo no Carbono 3. Provavelmente o modo de ação do extrato aquoso de *H. cordata* se deu através da interação e desativação das partículas virais apresentadas. Considerando a estrutura fenólica do hiperosídeo, a sua atividade antiviral é atribuída pelos agrupamentos de hidroxila e de glicosídeos (LEARDKAMOLKARN *et al.*, 2011).

No estudo de Muliawan (2008) foi realizada uma investigação da atividade antiviral de *Dillenia suffruticosa* contra a replicação do DENV-2. *D. suffruticosa* está presente na Malásia e tem atividade antibacteriana e antifúngica, mas não há relato de atividade antiviral. Para a preparação do extrato 100g da planta foram adicionados à 80mL de água destilada seguido de incubação em banho maria a 60°C por 4 a 5 horas, e filtração.

Para determinar o efeito antiviral de *D. suffruticosa*, células C6/36, provenientes de *A. albopictus*, foram submetidas às concentrações de 0,025mg/mL, 0,05mg/mL, 0,1mg/mL, 0,2mg/mL e 0,4mg/mL do extrato. As células foram então incubadas por 2 horas a 28°C antes de serem infectadas pelo DENV-2 (MULIAWAN *et al.*, 2008).

Para avaliar o efeito antiviral, a proteína NS1 do DENV foi utilizada como parâmetro, através de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida com coloração pela prata. A banda correspondente a NS1 das células tratadas e infectadas sofreu redução nas concentrações 0,025mg/mL (fig. 9A), 0,05mg/mL (fig.9B), 0,1mg/mL, 0,2mg/mL (fig. 10A) e 0,4mg/mL (fig. 10B). Pode-se observar que nas concentrações mais altas, correspondentes a 0,2mg/mL e 0,4mg/mL, a concentração da proteína NS1 foi reduzida significativamente. A figura 11 apresenta o resultado observado com as células infectadas não tratadas. (MULIAWAN *et al.*, 2008).

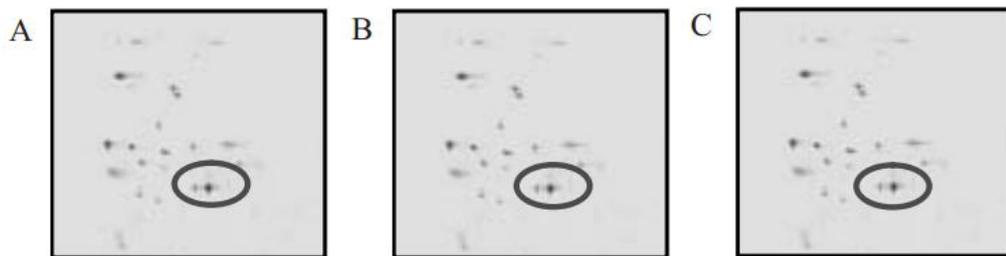


Fig 9: Proteínas detectadas pela infecção em células C6/36 tratadas com o extrato de *D. suffruticosa* em várias concentrações em (A) correspondente a 0,025 mg/mL, em (B) 0,05 mg/mL e em (C) 0,1 mg/mL

Fonte: MULIAWAN *et al.*, 2008

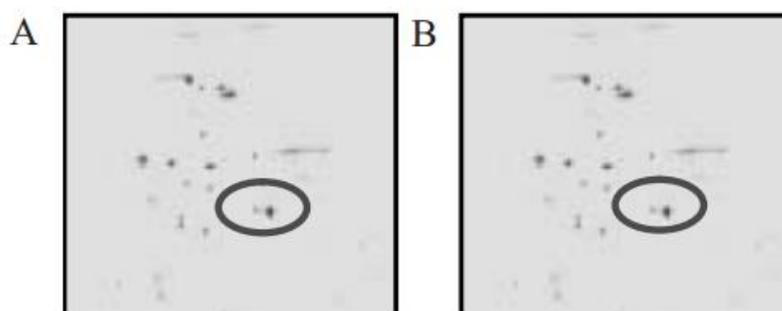


Fig. 10: Proteínas detectadas pela infecção nas células C6/36 tratadas com o extrato de *D.suffruticosa* nas concentrações mais altas em (A) correspondente a 0,2mg/mL e em (B) 0,4mg/mL

Fonte: MULIAWAN *et al.*, 2008

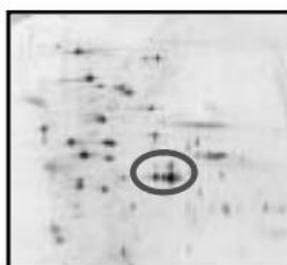


Fig 11: Controle mostrando as proteínas detectadas pela infecção nas células que não passaram pelo tratamento.

Fonte: MULIAWAN *et al.*, 2008

O autor conclui que a planta possui efeito inibitório contra a replicação de DENV-2 e que a expressão da proteína NS1 pode ser utilizada como um marcador e um parâmetro para avaliar os efeitos de agentes antivirais contra DENV-2 (MULIAWAN *et al.*, 2008).

5.12.3. Atividade antiviral de compostos isolados de extratos de plantas

No estudo de Zandi & colaboradores (2011) a atividade de quatro tipos de bioflavonoides contra DENV-2 (quercetina, naringina, hesperetina e daidzeína) foram testados em células Vero. O ensaio de citotoxicidade foi feito pelo MTT. Os bioflavonoides foram adicionados 5 horas antes da infecção. A atividade antiviral foi analisada em diferentes estágios de infecção e replicação do vírus. A replicação foi mensurada através da quantificação do DENV pela RT-PCR e FFURA (do Inglês

Foci Forming Unit Reduction Assay) ou ensaio de redução de placa. Somente quercetina mostrou significativa ação antiviral com $IC_{50} = 35,7 \mu\text{g/mL}$, e $CC_{50} = 252,6 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$. Diante dos resultados obtidos com a quercetina, os autores elegem este flavonoide como um candidato a testes mais específicos para seu possível emprego na terapêutica de dengue.

No trabalho de Brandão e colaboradores (2010), foi feito um estudo com a planta *Polygonum spectabile* presente no Sul da América, com ocorrência no Brasil, Uruguai e Argentina. No Brasil esta planta é popularmente conhecida como erva de bicho. A planta vem sendo usada no tratamento de diarreia, úlceras, gengivites, reumatismos e lesões cutâneas (Brandão *et al.*, 2010).

Espécies de *Polygonum* são consideradas como plantas invasoras, pois crescem em muitos sistemas de cultivo utilizados pelo homem, desde áreas agrícolas especialmente, até praças e jardins de centros urbanos. Severamente combatidas, sob pretexto de serem prejudiciais, as plantas invasoras podem, no entanto, ser benéficas quando integram sistemas de manejo de pragas (JÁCOME *et al.*, 2004).

Das espécies de *Polygonum*, já foram isoladas várias substâncias, como por exemplo, flavonóides, sesquiterpenos do tipo drimano, sulfatos de estilbenos e um nor-sesquiterpeno, poligonal (JÁCOME *et al.*, 2004).

Neste estudo investigou-se a atividade antimicrobiana e a atividade antiviral de diferentes extratos e compostos isolados das partes aéreas de *P. spectabile*. Para o preparo dos extratos, após a secagem da planta a 40°C por 72 horas, foram feitos diferentes tipos de percolações. A percolação com etanol foi significativa para os estudos antivirais com HHV-1, VACV e DENV-2. Depois o material foi submetido à cromatografia por HPLC. Três compostos isolados do extrato também foram avaliados neste estudo (Brandão *et al.*, 2010).

Os ensaios de citotoxicidade dos compostos foram testados variando as concentrações de 500 até 0,125 $\mu\text{g/mL}$. Os testes foram realizados utilizando as células LLC-MK₂ e células Vero. A citotoxicidade das células e a atividade antiviral foram determinadas pelo método do MTT. Os extratos etanólicos apresentaram baixa citotoxicidade nas células testadas. A concentração efetiva EC_{50} foi de 24,6 $\mu\text{g/mL}$ para DENV-2. Os compostos polares presentes nos extratos etanólicos são esperados por serem responsáveis pela atividade antiviral (Brandão *et al.*, 2010).

5.13. Estudo da atividade antiviral de produtos marinhos

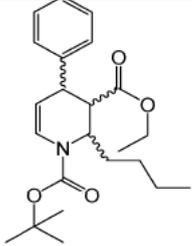
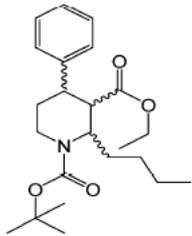
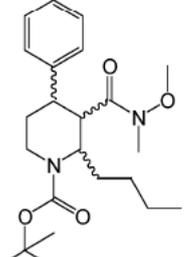
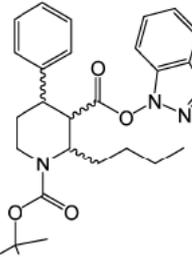
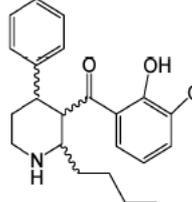
Metabólitos isolados de invertebrados marinhos como calipetina, crambescidina, ptilomicalina A, celeromicalina, gimnocrome D e isogimnocrome também já foram estudados como antivirais. Os metabólitos isolados foram testados contra DENV-1 com MOI de 0,05. As amostras foram tituladas e as células infectadas foram visualizadas por coloração imunológica e ELISA. A atividade antiviral dos extratos foi determinada pela redução do número de placas formadas pelo DENV-1 comparada com os controles. A adsorção viral foi anterior à adição dos metabólitos (LAILLE, M *et al.*, 1998).

Apenas três compostos das sete moléculas testadas (gimnocromos B e D e isogimnocromo-D) mostraram um efeito de inibição da replicação do DENV em uma concentração muito baixa. A $RF_{50\%}$, concentração onde 50% das placas formadas pelos vírus foram reduzidas, desses compostos teve valor equivalente a $\leq 1 \mu\text{g/mL}$. O gimnocromos B e D diferem somente na sua elipse, e ambos os compostos são originados de grupos sulfato, porém gimnocromo B tem atividade antiviral menor (LAILLE, M *et al.*, 1998).

5.14 Atividade antiviral de compostos sintéticos

A atividade de compostos ricos em flavonoides contra DENV foi relatada no trabalho de Mudiana e colaboradores (2010). O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antiviral, *in vitro* contra DENV-2, de cinco compostos sintéticos derivados de flavonoides. Para tal foi utilizado um modelo de cultura celular humana: as células HepG2 (ZANDI *et al.*, 2011)

Os compostos sintéticos derivados de flavonoides foram: YK 38, YK 51, YK 73, YK 73x e YK 101 (ver quadro 1). Os autores realizaram ensaios de citotoxicidade para determinar a máxima concentração não tóxica (MCNT) de cada composto para as células (MUHAMAD *et al.*, 2010). O quadro 1 mostra os compostos trabalhados neste estudo.

NOME	ESTRUTURA	ABREVIACÃO
Ethyl (1-tert-butoxycarbonyl-2-butyl-4-phenyl)-3,4-dihydropyridinyl-3-carboxylate		YK 38
Ethyl (1-tert-butoxycarbonyl-2-butyl-4-phenyl)-piperidinyl-3-carboxylate		YK 51
1-tert-butoxycarbonyl-2-butyl-3-(methoxy(methyl)carbamoyl)-4-phenylpiperidine		YK 73
3-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-(1-tert-butoxycarbonyl-2-butyl-4-phenyl)-3,4-dihydropyridinyl-3-carboxylate		YK 73x
(2-butyl-4-phenylpiperidin-3-yl)(2,3-dihydroxyphenyl)methanone		YK 101

Quadro 1: Compostos estudados no trabalho e suas respectivas estruturas químicas

Fonte: MUHAMAD *et al.*, 2010

Os compostos sintéticos foram dissolvidos em metanol, sendo assim, foi realizado um experimento controle utilizando somente metanol. Os autores analisaram a citotoxicidade do metanol e dos compostos. Estes tiveram suas concentrações ajustadas para 2,5,10,15,20,25,30,35,40 e 45 µg/mL. Utilizando-se meio DMEM suplementado com 2% de SFB. O ensaio de citotoxicidade foi realizado em placas de 96 poços contendo monocamada de células HepG2. Os resultados

foram obtidos por MTT, após 96 horas de incubação em estufa a 37° C com 5% de CO₂. (MUHAMAD *et al.*, 2010).

O ensaio antiviral foi realizado em três conjuntos de experimentos, sendo feitas quadruplicatas. Para cada experimento foram realizadas diluições de dez vezes, o que corresponde a 1000 - 10 TCID₅₀ da amostra de DENV-2. Para as diluições utilizaram-se DMEM com 2% de SFB. Foram montadas placas de 24 e 96 poços, com 1x10⁵ e 1x10⁴ células/poço (HepG2) respectivamente. As diluições seriadas do DENV-2 foram inoculadas nas placas que foram incubadas por 1 hora a 37°C com 5% de CO₂. Nas placas haviam controles de células (controle negativo), do vírus (controle positivo) e controle dos compostos. Após 1 hora, a MCNT de cada composto foi aplicada nos poços e as placas foram novamente incubadas. As placas de 24 poços foram observadas por microscópio de contraste de fase por 4 dias para avaliar a presença de efeito citopático. As placas de 96 poços, após 48 e 96 horas de incubação, foram analisadas quanto ao potencial de inibição através do CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation assay (Promega Corp.) (MUHAMAD *et al.*, 2010).

Para análises estatísticas foi utilizado o Kruskal-Wallis, onde p<0,05 ou p<0,001 indicaram diferenças significantes nas variáveis contínuas dos grupos testados. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que o composto YK 38 foi o mais citotóxico entre todos com MCNT de 15µg/mL. Todos os compostos apresentaram atividade inibitória contra DENV-2 (Quadro 2), sendo esta atividade dose dependente (MUHAMAD *et al.*, 2010).

Composto sintético	Dose(µg/mL)	Percentual de inibição
YK 51	5	92%
YK 73	2	90%
YK 73X	20	91%
YK 101	10	80%
YK 38	10	72%

Quadro 2: Compostos sintéticos com as respectivas doses utilizadas e os percentuais de inibição.

Fonte: MUHAMAD *et al.*, 2010

Os autores discutem sobre a realização dos ensaios utilizando as células HepG2 refletirem a interação entre vírus-célula hospedeira. A utilização de HepG2 é justificada pela presença de lesão hepática em pacientes infectados com DENV. O valor médio da MCNT foi de 27 µg/mL o que, de acordo com os autores, sugere um

potencial destes compostos para uso em ensaios com animais (MUHAMAD *et al.*, 2010).

Dados sobre a absorção, metabolismo e excreção de flavonoides em humanos são contraditórios. Os estudos mostraram que o flavonoide mais intensamente estudado na dieta, a quercetina, é absorvida em quantidades significativas. Naturalmente flavonoides existem predominantemente na forma glicosilada. A forma do flavonoide parece influenciar na taxa de absorção. As formas de quercetina glicosilada são absorvidas mais facilmente. Entretanto, o papel da glicosilação de flavonoides na facilitação da absorção é questionado pelo fato de que a catequina, que é não glicosilada na natureza, ter uma boa absorção (NIJVELDT *et al.*, 2001).

As cicloxigenase e lipoxigenase, presentes nos flavonoides, desempenham um papel importante como mediadores inflamatórios. Elas estão envolvidas na liberação de ácido araquidônico, que é um ponto de partida para uma resposta inflamatória geral. Também é descrito a capacidade anti-inflamatória dos flavonoides, envolvidos na capacidade de inibir a degranulação de neutrófilos (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Os flavonóides também possuem atividades antivirais. Suas atividades já foram estudadas contra o herpes simplex vírus, vírus sincicial respiratório, HIV, rotavírus, parainfluenza e adenovírus. A quercetina foi relatada por exibir atividades antibacterianas e habilidades antireplicativas (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Alguns flavonóides agem sobre a replicação intracelular de vírus, enquanto outros inibem as suas propriedades infecciosas. A maioria dos estudos dos efeitos sobre os vírus foram realizados *in vitro* e pouco se sabe sobre o efeito antiviral de flavonoides *in vivo* (NIJVELDT *et al.*, 2001).

5.14.1 Atividade antiviral de análogos de nucleosídeos

Produtos sintéticos que mimetizam a adenosina e a adenosina trifosfato consistem numa importante classe de terapêuticos. Uma larga variedade de inibidores de quinase assim como drogas anticâncer simulam propriedades do ATP na ligação dessas enzimas. Semelhantemente, derivados fosforilados de agentes

antivirais assim como Adefovir, um açúcar análogo modificado de adenosina, inibe a ação de polimerases virais. Muitos análogos de nucleosídeos mimetizam a adenosina (e substratos de adenosina quinase), e esses compostos são frequentemente convertidos intracelularmente em metabólitos fosforilados que exibem potentes atividades biológicas (Wu *et al.*,2011).

O artigo relata a síntese e avaliação biológica de três análogos de 2 deazapurina (Compostos 4-6) e sondas químicas relacionadas(7-9). Esses imitadores hidrófobos de adenosina foram projetados para examinar a relação entre a atividade antiproliferativa e atividade antiviral contra PV e DENV *in vitro* (Wu *et al.*,2011). O quadro 3 mostra alguns dos compostos relacionados no trabalho.

Número do composto	Nome do composto
1	Adenosine
2	6-Methyl-9-β-D-ribofuranosyl-purine
3	Tubercidin
4	7-Methyl-3-β-D-ribofuranosyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine (1-deaza-6-methyl-9-β-D-ribofuranosylpurine,4)
5	3-deaza-6-methyl-9-β-D-ribofuranosylpurine
6	4-Methyl-7-β-D-ribofuranosylpyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyrimidine (7-deaza-6-methyl-9-β-D-ribofuranosylpurine,6)
7	4-Methyl-7-(5'- <i>O</i> -methyl-β-D-ribofuranosyl)pyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyrimidine (7-deaza-6-methyl-9-(5'- <i>O</i> -methyl-β-D-ribofuranosyl)purine, 7)
9	4-Methyl-7-β-D-ribofuranosylpyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyrimidine 5'-triphosphate (7-deaza-6-methyl-9-β-D-ribofuranosylpurine 5'-triphosphate, 9)

Quadro 3: Compostos sintetizados e utilizados no trabalho

Fonte: Wu *et al.*,2011

A viabilidade celular, neste estudo, foi avaliada através do ensaio com luciferase que quantificou a abundância de ATP presente nas células vivas. A atividade antiviral de três compostos (2,4 e 7) foi avaliada no ensaio de replicação do DENV. Nesse ensaio, BHK-21 expressou luciferase. As células foram tratadas por 24 horas com o 7-deaza-6-metil-9-β-D-ribofuranosilpurina. As células foram lisadas e a atividade da luciferase foi quantificada. O composto 6 foi o que mais inibiu (IC₅₀= 0,88μM) e o composto 2 mostrou alguma inibição na atividade de replicação (IC₅₀= 5,46 μM), mas os compostos 4,5 e 7 não mostraram nenhuma inibição anterior a 10 μM (Wu *et al.*,2011).

Para provar a atividade antiviral do nucleosídeo 6, este composto foi avaliado num ensaio de infectividade com DENV. Células Vero infectadas com DENV-2 foram tratadas durante 6 a 24 horas, e o título viral foi determinado pela contagem de placas virais depois da lise celular e quantificação do RNA pelo PCR em tempo real amplificando a região NS1 (Wu *et al.*,2011).

O composto 6 mostrou ser um potente inibidor da replicação viral (ensaio de placa $IC_{50}= 0,062\mu M$, PCR em tempo real $IC_{50}=0,039\mu M$). Esses compostos foram comparados como ribavirina no ensaio de resistência à guanidina. Ribavirina é uma droga antiviral empregada clinicamente tornando-se fosforilada intracelularmente, mimetizando purina ribonuclease e incorpora-se dentro do genoma do RNA viral. Entretanto comparando com ribavirina, os compostos 6 e 2 fazem aumentar a frequência de mutagênese virais (Wu *et al.*,2011).

A citotoxicidade dos compostos 2-7 diferenciaram significativamente. A citotoxicidade de tubercidina é derivada da supressão de um número de processos incluindo a respiração mitocondrial, síntese de purina, processamento de rRNA, tRNA, metilação, proteína e síntese de RNA. Os compostos 2 e 3 mostraram pronunciado efeito na proliferação das células Hela depois do tratamento por somente 7 horas. Os compostos 4 e 7 mostraram pouca citotoxicidade durante este mesmo período. Além do mais, efeitos citotóxicos significantes do composto 6 são evidentes depois de 24 a 48 horas. Estes resultados sugerem que modificações sutis na adenina heterocíclica possibilita separação do efeito antiviral do efeito citotóxico nas células hospedeiras (Wu *et al.*,2011).

O novo 7-deaza derivado de 6-metil-9- β -D-ribofuranosilpurina foi sintetizado. Esse composto exibiu alta e potente atividade contra Poliovírus e DENV-2 em cultura de células e possui uma melhora na citotoxicidade comparado com 6-metil-9- β -D-ribofuranosilpurina e tubercidina (Wu *et al.*,2011).

O composto 7-deaza-6-metil-9- β -D-ribofuranosilpurina, estruturalmente relacionado com o produto natural tubercidin, potencialmente inibe a replicação de poliovírus(PV) em células HELA($IC_{50}= 11nM$) e DENV em células vero ($IC_{50}=62nM$) (Wu *et al.*,2011). Mecanismos de estudo revelaram que 5'trifosfato de 7-deaza-6-metil-9- β -D-ribofuranosilpurina é incorporado dentro do RNA mimetizando ATP e GTP.

Yin e colaboradores (2009) realizaram estudos com um análogo de adenosina, o NITD008 que potencialmente inibe o DENV ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Em adição aos quatro sorotipos do dengue, NITD008 também inibe outros flavivirus (YIN *et al.*,2009).

A forma trifosfatada do composto inibe a RNA polimerase dependente de RNA do vírus indicando que o composto funciona como um terminador de cadeia durante a síntese de RNA. O NITD008 tem boas propriedades farmacocinéticas e pode ser administrado por via oral. O composto contém uma substituição de carbono para o N-7 da purina e um acetileno na posição 2 da ribose. O tratamento de camundongos infectados com o DENV suprimiu a viremia, reduziu a elevação de citocinas e completamente preveniu a infecção e a morte dos animais testados. Nenhuma observação adversa foi observada quando ratos foram testados com NITD008 (YIN *et al.*,2009).

Duas proteínas não estruturais do vírus têm propriedades enzimáticas. A proteína NS3 do vírus funciona como uma protease usando NS2B como cofator. O nucleotídeo 5' RNA trifosfatado, a helicase e NS5 atuam como metiltransferase. A NS3 e NS5 são dois componentes do complexo de replicação viral e têm sido os alvos preferenciais para o desenvolvimento de antivirais (YIN *et al.*,2009).

A viabilidade celular foi mensurada usando o ensaio com MTT. No ensaio antiviral, as células Vero foram infectadas com 0,1 MOI dos vírus DENV-2, WNV (*West Nile virus*), YFV (*Yellow fever virus*), PWV (*Powassan virus*) e WEEV (*Western equine encephalitis virus*) e tratadas imediatamente com NITD008. Quarenta e oito horas depois da infecção o meio de cultura foi coletado e os títulos virais foram mensurados pelo ensaio de placa. NITD008 inibiu os 3 flavivírus (WNV, YFV e PWV) tratados com 9µM suprimindo o título viral em 10^3 e 10^6 . Estes resultados demonstraram que NITD008 especialmente inibiu vírus da família *Flaviviridae* (YIN *et al.*,2009).

O composto até 50µM não é citotóxico em células VERO, HEK293, Huh-7, Hep62, A549 e BHK-21. O composto inibiu o DENV-2 numa dose resposta de $EC_{50}=0,64M$. Tratamento com 9 µM reduziu o título viral mais de 10^4 vezes. O NITD008 também inibiu potencialmente os outros 3 sorotipos quando testado em diferentes linhagens celulares e em PBMCs (Células mononucleares do sangue periférico) (YIN *et al.*,2009).

Foram realizados testes para verificar o efeito de proteínas do plasma humano sobre a eficácia de NIT0008 contra DENV. Adicionou-se para isso, proteínas do soro, albumina (40mg/mL) e α 1-glicoproteína ácida (2mg/mL). O EC_{50}

aumentou em 2 a 3 vezes, provavelmente devido ao fato das proteínas do plasma se ligarem ao composto. No entanto o valor de EC_{50} não foi afetado significativamente *in vivo* (YIN *et al.*,2009).

NITD008 também inibiu a DENV-RdRp através do término da síntese da cadeia de RNA. Ainda foi feito testes em animais para avaliar as propriedades farmacocinéticas do NITD008, concluindo-se que o composto é biologicamente disponível para administração (YIN *et al.*,2009).

O modelo de viremia foi usado para examinar a eficácia *in vivo*. A infecção de camundongos AG129 com DENV-2 leva a uma viremia com picos no terceiro dia após a infecção e elevação do número de citocinas, que são característicos de dengue. Com o tratamento, esses picos de viremia se reduziram. O tratamento também suprimiu os níveis de NS1 no plasma. O tratamento dos animais, com 1mg/kg de NITD008, imediatamente após a infecção não reduziu a morte, mas o tratamento com 3mg/kg protegeu parcialmente e o tratamento com 10mg/kg protegeu completamente os camundongos infectados com dengue. Os resultados demonstraram que o NITD008 pode suprimir a viremia, decair o nível de citocinas e prevenir a morte. Foi avaliado também a toxicidade de NITD008. A toxicidade *in vitro* foi acessada em mais de 150 ensaios bioquímicos, incluindo o teste de Ames. Neste teste avalia-se as mutações devido a genotoxicidade. Em ensaios *in vivo*, observaram-se em cães, moderada perda de peso, diminuição da atividade motora, vômitos e fezes com mucos ou sangue e em ratos foram observados opacidades irreversíveis na córnea, anormalidades no sangue e distúrbios do movimento (YIN *et al.*, 2009).

Entretanto, em camundongos houve redução da viremia e concomitantemente prevenção da mortalidade. Como a terapia antidengue tem como objetivo prevenir a evolução das formas mais graves da doença, como a SCD e a DH, o NITD008 pode ser uma droga em potencial para ser utilizada no tratamento dos casos clínicos da doença (YIN *et al.*,2009).

Comparando com os compostos que estão sendo descritos como antivirais, como a castanospermina e 7-deaza-2-C-methyl-adenosine o NITD008 mostrou ser o mais eficaz em cultura de célula (YIN *et al.*,2009).

5.14.2 HTS (HIGH THROUGHPUT SCREENING)

No trabalho de Shum e colaboradores (2010), adaptou-se um ensaio baseado em alto conteúdo de células para a triagem e identificação de inibidores e moduladores da infecção pelo DENV. Assim, foi possível monitorar (através da coloração por imunofluorescência de glicoproteínas do envelope viral) a inibição de diferentes compostos sobre a produção de proteínas do DENV. A citotoxicidade foi avaliada em células HEK293.

Os autores utilizaram um painel de compostos que são reconhecidos por terem atividade antiviral contra o DENV em culturas celulares, incluindo compostos como ribavirina, inibidores de vias de sinalização celular (U0126), e polissacarídeos, como a carragenina, que presumem interferir na ligação do vírus (SHUM *et al.*, 2010).

Trabalhos feitos por Takhampunya (2006), Diamond (2002), Wu (2002), Olsen (2004), Whitby (2005), Zhang (2009) e Yin (2009) identificaram compostos de pequenas moléculas com atividade anti-DENV como ribavirina, 7-deaza-2-C-metiladenosina, 6-O-butanoil castanospermina, geneticina e adenosina análogo de NITD008. No entanto, somente poucos destes compostos têm propriedades farmacológicas apropriadas para fórmulas comerciais e nenhuma droga apresentou eficácia contra o DENV em triagens químicas (SHUM *et al.*, 2010).

Atualmente, muitos candidatos a antivirais têm como alvos o material genético viral, porém podem tipicamente induzir mutações que geram vírus resistentes a tais compostos. Uma estratégia para contornar esse problema é a utilização de alvos do hospedeiro, de modo a competir com o vírus, o que pode reduzir ou evitar a geração de resistência e permitir o desenvolvimento de terapias mais duráveis (SHUM *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, o desenvolvimento de drogas antivirais utilizam ensaios de redução citopática e de placa para triagem e avaliação da eficácia. Tecnologias de microscópio automatizadas tem a capacidade de recolher imagens de processos biológicos celulares, o qual combinado com o HTS tem facilitado os processos de triagem de grandes números de compostos permitindo a quantificação de alterações na quantidade de vírus ou na viabilidade celular (SHUM *et al.*, 2010).

SHUM e colaboradores (2010) descrevem a adaptação, validação e triagem de um ensaio multiparamétrico, contra uma biblioteca de compostos bioativos e

fármacos conhecidos, para monitorar diretamente a replicação viral em células hospedeiras e simultaneamente avaliar a viabilidade celular. Para isso células HEK293 foram infectadas com DENV-2 imediatamente depois da adição dos compostos a serem investigados. Dois dias depois quantificou-se a proteína viral produzida pelas células infectadas. Inoculação de HEK293 com DENV-2 resulta na produção de largas quantidades da proteína do envelope do DENV, localizada em compartimentos intracelulares que podem ser detectados por imunofluorescência.

Estudos prévios revelaram que os níveis encontrados de proteína E do DENV são reflexos da quantidade de vírus infecciosos produzidos. Uma redução na produção da proteína E poderia ser potencialmente uma indicação de redução na entrada viral, da replicação do genoma e/ou do processamento de RNA (SHUM *et al.*,2010).

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada mensurando a redução do número de núcleos celulares por poço. A figura 12 mostra as imagens adquiridas pelo INCA3000, um microscópio confocal a laser automatizado. Em verde observa-se a proteína E e em azul os núcleos das células (SHUM *et al.*, 2010).

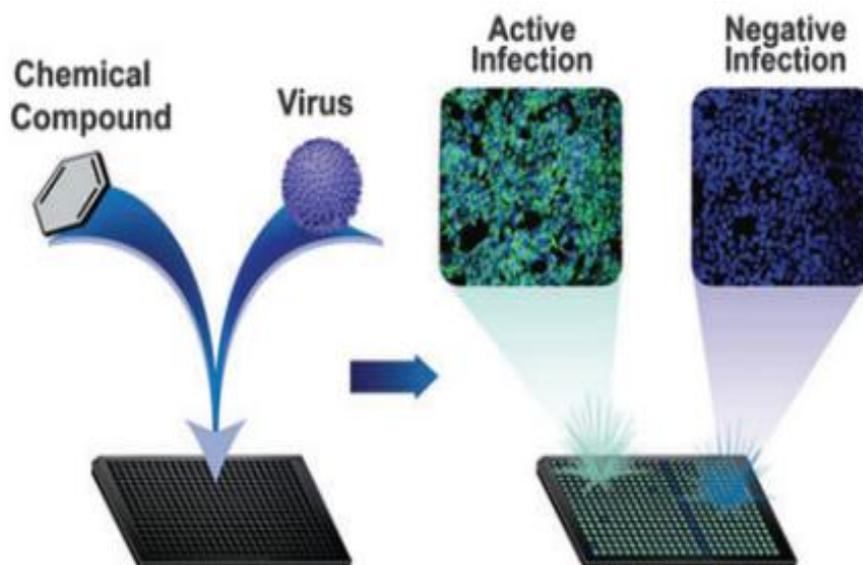


Fig 12: Imagens adquiridas pelo INCA3000, em verde a proteína do envelope do *Dengue virus* e em azul o núcleo das células.

Fonte: SHUM, D *et al.*, 2010

Um piloto foi feito relacionando quatro agentes com atividade antiviral, para selecionar um possível controle positivo para os testes futuros. A genisteína, uma isoflavona de soja e inibidora da tirosina quinase,

modula a fosforilação celular da tirosina, o que parece ter papel na replicação viral. O análogo de guanosina, a ribavirina, que pode afetar a infecção viral, é uma enzima essencial envolvida na síntese de nucleótidos de guanina. U0126, um mitógeno ativado inibidor da proteína quinase e carragenanos, polissacarídeos feitos de subunidades de galactose sulfatada, parecem produzir atividade antiviral através da interferência com a absorção do vírus e internalização na célula hospedeira.

Ribavirina e carragenanos exibiram um $IC_{50} = 75 \pm 5$ mM e $0,01 \pm 0,004$ mg/mL respectivamente com nenhuma citotoxicidade detectada. Genisteína não mostrou inibição nas concentrações testadas e apresentou um $EC_{50} = 21 \pm 3$ mM. O IC_{50} para U0126 foi de 14 ± 2 nM, com pronunciado efeito citotóxico (EC_{50} de 38 ± 5 mM). Baseado nestes resultados selecionou-se os carragenanos, na concentração de 4mg/mL, para ser utilizado como controle positivo (SHUM *et al.*, 2010).

Os autores realizaram testes com 5632 compostos. Para isso utilizou-se como ponto de corte um valor de inibição maior que 80% e foi observado que 273 compostos apresentaram atividade antiviral. Para eliminar os compostos citotóxicos, valores maiores do que 20% de citotoxicidade foram descartados. Com isso eliminou-se 184 compostos dos que haviam mostrado atividade e 79 compostos foram selecionados, 59% destes interagiram com receptores e 12% interagiram com transportadores. O quadro 4 mostra os compostos identificados com os mais altos níveis de intensidade de inibição (SHUM *et al.*, 2010).

Compostos		Percentual de inibição	
		DENV-E	Núcleo
NSC95397	Citotóxico	-751	91
Acriflavina	Citotóxico	-172	51
Fluoro-Desatinib	Citotóxico	-116	94
Merbromim	Não citotóxico	-334	9
CytochalasinD	Citotóxico	-160	84
Cytochalasin A	Citotóxico	-135	79
Daunorubicin	Citotóxico	-103	99

Quadro 4: Compostos identificados com mais altos níveis de intensidade de inibição

Fonte: (SHUM *et al.*, 2010)

Este ensaio, ao mesmo tempo em que permitiu selecionar os agentes antivirais com potencial inibidor da replicação viral, também permitiu avaliar a

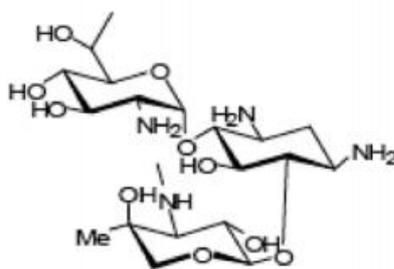
citotoxicidade. Essa ferramenta portanto, auxilia na triagem de possíveis agentes antivirais (SHUM *et al.*, 2010).

5.14.3 Aminoglicosídeos

Alguns aminoglicosídeos são conhecidos por apresentarem atividade antiviral. O aminoglicosídeo, geneticina (G418), segundo estudo realizado por Zhang e colaboradores (2009), foi capaz de diminuir o efeito citopático resultante da infecção de células BHK pelo DENV-2, com um valor de dose-dependência correspondente a EC_{50} , de $3 \pm 0,4 \mu\text{g} / \text{ml}$.

A geneticina inibiu DENV-2 com rendimento $EC_{50} = 2 \pm 0,1 \mu\text{g} / \text{mL}$ e uma $EC_{90} = 20 \pm 2 \mu\text{g} / \text{mL}$. Além disso, na concentração de $25 \mu\text{g} / \text{mL}$ de geneticina a formação de placa quase que completamente foi bloqueada. Além disso, geneticina inibiu a replicação do RNA viral e a tradução viral. A gentamicina e canamicina não mostraram propriedades antivirais. Neomicina e paromomicina demonstraram atividade antiviral, porém em altas concentrações (Zhang *et al.*, 2009).

Esses dados sugerem que a atividade antiviral da geneticina é devido ao anel I e II deste aminoglicosídeo. O anel II confere a possibilidade do composto se ligar no RNA viral e o grupo hidroxila na extremidade 3' da geneticina contribui significativamente para a atividade antiviral (Zhang *et al.*, 2009). A figura 13 mostra a fórmula estrutural da geneticina.



Geneticin

Fig 13: Fórmula estrutural da geneticina
Fonte: Zhang, X.G, *et al.*, 2009

A viabilidade celular neste artigo foi determinada utilizando o resaruzin (Almar Blue) indicador de morte. A análise quantitativa da conversão do corante foi medida utilizando um leitor de placas fluorescente com excitação. A viabilidade foi mensurada por porcentagem em comparação com o controle (Zhang *et al.*, 2009).

Para avaliar a atividade antiviral, as células foram infectadas com 0,05 MOI. O ensaio realizado foi feito com adsorção, os sobrenadantes foram coletados e titulados. Foi realizado *western blot* para analisar a quantidade de proteína do envelope do DENV e PCR em tempo real usando TaqMan para análise quantitativa intracelular do RNA viral (Zhang *et al.*, 2009).

Após 96 horas da infecção, cerca de 90% da monocamada foi destruída. A geneticina reduziu a viabilidade das células BHK com um CC_{50} de $165 \pm 5 \mu\text{g} / \text{ml}$, mas impediu a formação do efeito citopático pelo DENV das células infectadas com valor de $EC_{50} = 3 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ (Zhang *et al.*, 2009).

A geneticina inibiu o número de placas produzidas pelo DENV, evidenciando a sua capacidade de inibir a proliferação e disseminação do vírus. Através da técnica de PCR observou-se que a droga não chegou a bloquear os eventos iniciais da infecção pelo DENV, tais como a entrada viral. A geneticina inibiu a síntese de RNA viral em 40% depois de 12 horas, 24 horas e 48 horas. A adição de geneticina diminuiu o RNA viral em cerca de 90%, quando comparado com o controle infectado não tratado (Zhang *et al.*, 2009).

Para avaliar o efeito da geneticina sobre a tradução de proteínas virais, os autores utilizaram a proteína do envelope como marcador da tradução. A geneticina inibiu a formação da proteína E em cerca de 80%. Este composto pode seletivamente afetar diferentes estruturas virais e funções. Outra possibilidade levantada é que a droga pode inibir diretamente o DENV através da interação com proteínas virais estruturais ou não estruturais, ou então na ligação ao RNA viral (Zhang *et al.*, 2009).

5.14.4 RNA de interferência

O silenciamento gênico tem despertado grande interesse na utilização de RNA de interferência (RNAi) como estratégia terapêutica (ALHOOT *et al.*,2011; SUBRAMANYA *et al.*, 2010).

Diversos estudos demonstram a eficácia do RNAi em suprimir a infecção por flavivirus, inclusive DENV em linhagens de células experimentais. Além disso, a versatilidade do RNAi poderia ser explorada para bloquear importantes mediadores da resposta do hospedeiro que podem contribuir com a patogênese da dengue. Entretanto a existência de 4 sorotipos do DENV e sua capacidade de desenvolver resistência ao RNAi, através de mutações, exige cautela antes da possibilidade do uso clínico. Um grande obstáculo à utilização terapêutica do RNAi é a entrega específica dos pequenos RNA de interferência (siRNA) à tipos celulares relevantes (SUBRAMANYA *et al.*,2010).

Células dendríticas (CDs) infectadas com DENV desempenham um papel chave na imunopatogênese da FHD e SCD juntamente com macrófagos que liberam citocinas pró-inflamatórias e fatores solúveis que medeiam o extravasamento de plasma, trombocitopenia e choque hipovolêmico associado à infecção por DENV. Sendo assim, o desenvolvimento de um método para introduzir siRNA em CDs seria importante para a possível utilização terapêutica do RNAi, para eliminar a replicação viral e atenuar a vigorosa resposta do hospedeiro (SUBRAMANYA *et al.*,2010).

O objetivo do artigo é possibilitar a entrega específica de siRNA às CDs e a redução da expressão de Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) *in vitro* e *in vivo*. Foi sintetizado um peptídeo quimérico (DC3-9DR) para realizar a entrega de siRNA seletivamente às CDs (SUBRAMANYA *et al.*,2010).

O peptídeo DC3-9DR foi capaz de transduzir siRNA para CDs derivados de monócitos, sendo a melhor razão de 1:10. A especificidade de DC3-9DR foi atestada ao não ocorrer transdução de siRNA em células T primárias, ou organizações celulares que não CDs (SUBRAMANYA *et al.*,2010).

Foi utilizado um siRNA contra uma região conservada do envelope do DENV-2 (siRNA FvE^D). Os testes foram realizados pré e pós-infecção com células BHK-21 e com o DENV. Os resultados revelaram que siRNA FvE^D é um potente antiviral, uma vez que a proteção observada 24 horas após a infecção persistiu após 48 horas de infecção (SUBRAMANYA *et al.*, 2010).

O próximo teste foi avaliar se a entrega de siRNA mediada por DC3-9DR inibe a replicação do DENV-2 em CDs derivados de monócitos tendo FvE^D como alvo. A avaliação por citometria de fluxo e por PCR quantitativa demonstrou uma inibição do vírus de 80%. A entrega do siRNA mediada pelo peptídeo DC3-9DR foi utilizada para inibir a expressão do TNF- α induzido por DENV-2. Foram tratados CDs derivados de monócitos com siRNA contra TNF- α . Os níveis de mRNA de TNF- α foram avaliados e observou-se uma redução de 80% nesses níveis. Os resultados demonstraram redução da replicação viral e da expressão de TNF- α , o que sugere uma moderação da resposta imune do hospedeiro com o posterior bloqueio de muitos aspectos da patogênese da dengue (SUBRAMANYA *et al.*, 2010).

Por fim o teste *in vivo* foi realizado com camundongos através de imunização com DC3-9DR. Os resultados obtidos permitiram sugerir que DC3-9DR é capaz de entregar siRNA para CDs. Entretanto estudos adicionais são necessários para avaliar a capacidade do peptídeo ser uma ferramenta eficaz como terapia de RNAi contra a infecção por DENV (SUBRAMANYA *et al.*, 2010).

6. Alvos em flavivírus para desenvolvimento de antivirais

Existe uma necessidade de desenvolvimento de antivirais contra *Flavivirus*, uma vez que a busca constante por vacinas tem encontrado inúmeras barreiras. São necessários antivirais capazes de reduzir a viremia nos estágios iniciais da doença, bloquear a replicação viral ou mesmo modular a resposta do hospedeiro (Bray, 2008).

Potencialmente, agentes antivirais poderiam inibir qualquer processo crítico para a reprodução do vírus. Muitas abordagens estão sendo utilizados para identificar potentes agentes antivirais como compostos quimioterápicos, incluindo: estudo das estruturas de proteínas virais, secundárias ou terciárias e estruturas do RNA viral; triagem de composto com potencial antiviral; ensaio, de conhecidos inibidores de outros vírus; modificação química de conhecidos inibidores virais, a fim de otimizar sua função (RAY & SHY, 2005).

As proteínas C, M, e E são proteínas estruturais que compõem a partícula do vírus, ao passo que as proteínas NS são necessárias para a replicação do genoma e expressão, e podem também funcionar na montagem viral e evasão da resposta imune (RAY & SHY, 2005). A caracterização bioquímica e estrutural das proteínas virais é de suma importância para a identificação de pequenas moléculas que promovem a inibição do ciclo de vida viral. Ensaios bioquímicos e celulares são essenciais nesse processo (Sampath & Padmanabhan, 2010).

Proteínas do envelope de *Flavivirus* têm sido apontadas por apresentar um papel crucial na montagem do vírus, na morfogênese, e na infecção de células hospedeiras. A inibição da infecção por flavivirus de uma célula hospedeira, por meio de uma pequena molécula antagonista de proteína do envelope é uma estratégia atraente para o desenvolvimento de agentes antivirais (RAY, D & SHY, P-Y 2005).

A proteína C, responsável pela formação do nucleocapsídeo, sofre uma dimerização induzida pela interação com DNA ou RNA (Kiermayr *et al.*, 2004). A descoberta de compostos que bloqueiem a dimerização ou a interação capsídeo-RNA poderia ser realizada através da coinfeção de um sistema *in vitro* (Sampath & Padmanabhan, 2010).

Proteínas M e E são proteínas que possuem interações que definem os estágios de partículas virais imaturas e vírions maduros. O desenvolvimento de

ensaios com foco na interação proteína-proteína permitiria avaliar as transições conformacionais das proteínas M e E permitindo a descoberta de novas drogas. A obtenção de informações sobre a estrutura das partículas imaturas e maduras abre caminho para a produção de novos medicamentos (Sampath & Padmanabhan, 2010).

As proteases, proteínas responsáveis pela clivagem da poliproteína viral, são essenciais para o processo da replicação viral, o que a torna um alvo atraente para a terapêutica antiviral. Um composto capaz de interferir na poliproteína afetaria todos os passos subsequentes da replicação viral (Sampath & Padmanabhan, 2010).

A atividade de helicase da NS3 é provavelmente necessária no processo de fusão de estruturas secundárias que antecede a síntese de RNA ou para separar RNA dupla fita, intermediários, formados durante a síntese de RNA viral, ou ainda como uma translocase capaz de remover proteínas ligadas ao RNA viral. A separação de fitas é uma reação dependente de energia, logo ocorre mediante a hidrólise de ATP. Dessa forma, todas as RNA helicases são detentoras de atividade ATPase. No caso específico de helicases de flavivirus a hidrólise prioriza trifosfatos de nucleosídeos de purinas em detrimento às pirimidinas. Para este tipo de atividade, as drogas poderiam atuar de três maneiras: inibição da ATPase, interferência na ligação com ATP ou na hidrólise, assim como na translocação (Sampath & Padmanabhan, 2010).

A helicase de flavivirus representa um grande desafio para o desenvolvimento de drogas, devido ao fato de o seu mecanismo de ação não estar totalmente elucidado. Somado a isto, existe o problema de seletividade de compostos que causam a inibição a partir do sítio de ligação do ATP. Estes compostos podem apresentar citotoxicidade ao hospedeiro (Sampath & Padmanabhan, 2010).

NS5 metiltransferase (MTase) de acordo com Dong e colaboradores (2008), é uma proteína recentemente estudada e apresenta-se como alvo atrativo para a ação de drogas. Seu domínio funcional encontra-se na porção N-terminal da proteína. Esta enzima demonstra ter papel importante no ciclo replicativo de flavivirus, uma vez que mutações em resíduos críticos à atividade de metilação prejudicam seriamente a replicação viral (Sampath & Padmanabhan, 2010).

7. CONCLUSÃO

Fitoterápicos são muitas vezes utilizados na medicina popular tornando-se uma alternativa para as pessoas que não podem ter acesso à medicina convencional. É importante investir em pesquisas científicas para avaliar as propriedades das plantas medicinais, visto que os riscos do uso indiscriminado podem ocasionar efeitos maléficos ao organismo devido à toxicidade das mesmas. A rica biodiversidade do Brasil habitualmente é pouco explorada não desenvolvendo oportunidades de se investir em estudos que possam contribuir para a descoberta da cura de diversas doenças. Muitas pesquisas que envolvem plantas medicinais e seus compostos isolados possuem um resultado promissor na busca de antivirais contra o DENV.

É importante o estudo minucioso da citotoxicidade dos candidatos a antivirais, tanto de compostos naturais quanto sintetizados, incluindo estudos de análises mitóticas e alterações do cromossomo.

O desenvolvimento de metodologias mais precisas pode facilitar os processos de triagem de compostos, visto que é vasta a gama de possíveis candidatos a antivirais. O HTS automatizado é uma nova tecnologia que pode facilitar as pesquisas neste campo.

Muitos trabalhos com antivirais são avaliados *in vitro*, porém, muitos deles carecem de pesquisas mais específicas *in vivo*. Antivirais efetivos devem reduzir a viremia nos estágios iniciais da doença, bloquear a replicação viral e modular a resposta do hospedeiro.

Estudos devem incluir também a avaliação dos antivirais no que diz respeito à indução de mutagêneses virais. Muitos marcadores de avaliação de inibição viral, relatados nesta revisão, estão relacionados à mensuração de proteínas do vírus como a do envelope, NS1, NS3, NS5, sendo que a do envelope é a mais estudada. Ensaio bioquímico e celulares são necessários para se realizar a caracterização bioquímica e estrutural das proteínas virais, que são de suma importância para a identificação de pequenas moléculas que promovem a inibição do ciclo viral.

8. REFERÊNCIAS

ALVES, H de M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos, **Caderno Temático de Química Nova na Escola**, Rio de Janeiro, n. 3, Maio-2001

ALHOOT, M.A. Inhibition of *Dengue Virus* Entry and Multiplication into Monocytes Using RNA Interference, **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.11, p. 1-10, 2011

ARAÚJO, J. M. G; BELLO, G; SCHATZMAYR, H.G; SANTOS, F. B dos; NOGUEIRA, R.M.R. *Dengue virus* type 3 in Brazil: a phylogenetic perspective. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, [S.l.], v. 104, n. 3, p. 526-529, May 2009.

BALUNAS M.J & KINGHORN, A.D Drug discovery from medicinal plants. **Life Science**, Chicago, v.78, n.5, p.431-441, Set.2005

BARROS, M.C.E.S, **Expressão de proteínas do vírus da Dengue em células de inseto utilizando o sistema baculovírus de expressão**, 2007. Pós Graduação em patologia molecular. Dissertação(Mestrado)- Universidade de Brasília Disponível em:< <http://repositorio.bce.unb.br/handle/10482/2971>> Acesso em: 20/02/2010

BRAGA, I.A & VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência, **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília,v.16, n.4, p,279-293, Out-Dez, 2007

BRANDÃO, G.C; KROON, E.G; DUARTE, M.G.R; BRAGA, F.C de S. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart., **Phytomedicine**, v.17, n.12, p.926-929, 2010.

BRAY M. Highly pathogenic RNA viral infections: challenges for antiviral research. **Antiviral Res**, v.78, 2008.

CÂMARA, F.P; THEOPHILO, R.L.G; SANTOS, G.T dos; PEREIRA, S.R.F.G; CÂMARA, D.C.P; MATOS, R.R.C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro v. 40,n.2, p.192-196, Mar-Abr, 2007

CARVALHO, R.A; LACERDA, J.T de; OLIVEIRA, E. F de; SANTOS, E.S dos. **Extratos de Plantas Medicinais como Estratégia para o Controle de Doenças Fúngicas do Inhame (*Dioscorea sp.*) no Nordeste** Disponível em <<http://www.emepa.org.br/anais/volume1/av107.pdf> > Acesso em 05/05/2010

CHAMBERS, T.J.; HAHN, C.S.; GALLER R.; RICE, C.M. Flavivirus genome, organization, expression and replication. *Annual Reviews Microbiology*, v.44, p.649-88, 1990.

CHE, C.T. Plants as a source of potential antiviral agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N.R. (eds.) **Economic and Medicinal Plants Research**, v. 5. London: Academic, p. 167- 251, 1991.

CLYDE.K; KYLE, J.L; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinantsof *Dengue Virus* Replication and Pathogenesis, **Journal of virology**, California , v.80, n.23 , p. 11418–11431, Dez. 2006

CORRÊA, M.P Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas, v.3, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926 a 1978

CUSHNIE, T. P. Tim, LAMB, Andrew. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 26, p. 343-356, 2005.

DIAMOND M.S; ZACHARIAH, M; HARRIS, E.. Mycophenolic acid inhibits *Dengue virus* infection by preventing replication of viral RNA. **Virology**, v. 304, p. 211-221, 2002.

DONALÍSIO, M.R & GLASSER, C.M Vigilância Entomológica e Controle de Vetores do Dengue, **Rev.Bras. Epidemiologia**, São Paulo, v.5, n.3, 2002

DONG H; ZHANG, B; SHI, P-Y. Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target. **Antiviral Res.**v.80, n.1, p.1-10, 2008

DULBECCO, R. Microbiology In: DULBECCO, R (Ed) Evolution of microbiology and microbes. **Lippincott company**, Philadelphia, p. 769-795, 1994

FERREIRA, M.L.B; CAVALCANTI, C.G; COELHO, C.A; MESQUITA, S.D. Manifestações neurológicas de dengue, **Arq. Neuropsiquiatria**, Pernambuco, v.63, n.2, p.488-493, 2005

FIGUEIREDO, L.T.M Patogenia das infecções pelos vírus do dengue, **Simpósio de Virologia Médica I** , Ribeirão Preto, v.32, p.15-20, Jan-Marc 1999

FUNASA, Instruções para pessoal de combate ao vetor- Manual de normas técnicas, 3ª edição, Brasília, 2001 Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf> Acesso em: 30/11/2011

GLASSER, C.M & GOMES, A.C Clima e sobreposição da distribuição de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* na infestação do Estado de São Paulo, **Rev.Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n.2 p.166-172, 2002

GONÇALVEZ, A. P. Diversity and evolution of the envelope gene of *Dengue virus* type 1. **Virology**, v. 303, n. 1, p. 110-119, Nov. 2002.

GUSMÃO.E; VIEIRA, F de.A; JÚNIOR, E.M.F. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* RICH. EX A JUSS.), **Cerne**, Lavras, v.12, n.1, p.84-91,jan-mar.2006

HENCHAL, E.A & PUTNAK, J.R The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**,v.3, n.4, p.376-396, Oct.1990

HUDSON, J.B. **Antiviral compounds from plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press., 200 p. 1990.

JÁCOME, R.L.R.P; LOPES, D.E.S; RECIO, R.A; MACEDO, J.F; OLIVEIRA,A.B Caracterização farmacognóstica de *Polygonum hydropiperoides* Michaux e *P. spectabile* (Mart.) (Polygonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.1, p. 21-27, 2004

JASSIM, S.A.A & NAJI, M.A Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective, **J.App. Microbiol.** v.95, p. 412-427, 2003

JOHNSON,B.W; RUSSEL, B.J; LANCIOTTI, R.S. Serotype- Specific detection of Dengue viruses in a fourplex Real Time Reverse Transcriptase PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.10, p.4977-4983, 2005

Kiermayr S; KOFLER, R.M; MANDL, C.W; MESSNER, P; HEINZ, F.X. Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and *in vitro* assembly of capsid-like particles. **Jornal Virol** 2004; v.78, p.8078–8084

LAILLE,M; GERALD, F; DEBITUS,C. In vitro antiviral activity on *Dengue virus* of marine natural products. **CMLS Cellular and Mollecular Life sciences**, v.54, p. 167-170, 1998

LANCIOTTI, R.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **Journal of General Virology**, [S.l.], v. 75, n.1, p. 65-75, Jan. 1994.

LANCIOTTI, R.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. **Journal of General Virology**, [S.l.], v. 78, n. 9, p. 2279-2284, Sept. 1997.

LEARDKAMOLKARN,V; SIRIGULPANIT, W; PHURIMSAK,C; KUMKATE, S; HIMAKOUN, L; SRIPANIDKULCHAJ, B. The inhibitory actions of *Houttuynia cordata* Aqueous extract on *Dengue virus* and Dengue-infected cells, **Journal of Food Biochemistry**, v.36, p.86-92,2006.

LEWIS, J. A; CHANG, G.J; LANCIOTTI, R.S; KINNEY, R.M; MAYER, L.W; TRENT, D.W. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 216-224, Nov. 1993.

LU, H., WU, X., LIANG, Y; ZHANG, J. Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of *Houttuynia* THUNB. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, v. 54,p. 936–940, 2006

LUPI, O; CARNEIRO, C.G; COELHO, I.C.B. Manifestações mucocutâneas da dengue, **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.82, n.4, p.291-305, Set.2007

MECKE,M; VILLAREAL, M.L; TORTORIELLO, J; BERLIN, B; BERLIN, E.A. A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. **Phytother. Res.**, v.9, p.224-250,1995

McCUTCHEON,A.R; ROBERTS, T.E; GIBBONS, E; ELLIS, S.M; BABIUK, L.A; HANCOCK, R.E; TOWERS, G.H. Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, v.49, p.101-110,1995

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Informe epidemiológico**. Disponível em <<http://www.saude.mg.gov.br/publicacoes/estatistica-e-informacao-em-saude/boletim-semanal-dengue/fevereiro-2012pdf>> Acesso em: 01/02/2012

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Guia de Vigilância Epidemiológica**, 6ª Edição Brasília, 2005 Disponível em: <http://www.prosaude.org/publicacoes/guia/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf> Acesso em: 30/10/2011

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Secretária de Vigilância em Saúde- Semana epidemiológica 1 a 39 de 2011** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_37_39.pdf> Acesso em: 30/11/2011

MUDIANA,M; LEE, Y.K; NOORSAADAHABDRAHMAN, R.Y. Antiviral actions of flavanoid-derived compounds on *Dengue virus* type. **International Journal of Biological Sciences**, v.6 ,n.3, p.294-302, 2010

MULIAWAN, S.Y Effect of *Dillenia suffruticosa* extract on *Dengue virus* type 2 replication. **Universa medicina**, v.27, n.1, p.1-5, 2008

MURRAY, C. L.; JONES, C. T.; RICE, C. M. Architects of assembly: Roles of flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. **Nature reviews microbiology**, v.6, p.7-16, 2008.

NAVARRO-SÁNCHEZ, E; ALTMAYER, R; AMARA, A; SCHWARTZ, O; FIESCHI, F; VIRELIZIER, J.L; ARENZANA- SEISDEDOS, F; DESPRÈS, P. Dendritic-cell-specific icam3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived Dengue viruses. **European Molecular Biology Organization** v.4, n.7, p.723-728. 2005.

NIJVELDT, R. J; Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, n.74, p.418–425, 2001.

OLSEN D.B; ELDRUP, A.B; BARTHOLORNEW, L; BHAT, B; BOSSERMAN, M.R; CECCACCI, A; COLWELL, L.F; FAY, J.F; FLORES, O.A; GETTY, K.L; GROBLER, J.A; LAFEMINA, R.L; MARKEL, E.J; MIGLIACCIO, G; PRHAVC, M; STAHLHUT, M.W; TORNASSINI, J.E; MACCOSS, M; HAZUDA, D.J; CARROL, S.S. A 7-deaza-adenosine analog is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic properties. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p. 3944–3953, 2004.

PONTES, R. J. S. & RUFFINO-NETTO, A. Dengue em localidade urbana da região sudeste do Brasil: aspectos epidemiológicos, **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 28, n.3, p. 218-27, 1994.

PUPO, M.T; GALLO, M.B.C; VIEIRA, P.C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais, **Quim. Nova** Vol. 30, No. 6, p. 1446-1455, 2007

RAY, D & SHI, P-Y. Recent Advances in Flavivirus Antiviral Drug Discovery and Vaccine Development. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v.1, n.1, p.45-55.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology Journal**, [S.I.], v. 172, n. 2, p.479-793, Feb. 1990.

SAMPATH, A & PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Res**, v.81, n.1, p.1-21, 2010.

SANTOS, R.L.C dos. Atualização da distribuição de *Aedes albopictus* no Brasil(1997-2002), **Rev.Saúde Pública**, Brasília, v.37, n.5, p. 671-673, 2003

SANTOS, K.M.P **Identificação química de flavonoides, taninos e verificação da presença de saponinas nas folhas de mamona branca (*Ricinus communis* L.)**. 2007. Monografia (conclusão de curso)- Centro universitário das faculdades metropolitanas unidas, Faculdade de Farmácia.

SILVA, A.A da; MIRANDA, C.F; FERREIRA, J.R; ARAÚJO, E.J de A. Fatores sociais e ambientais que podem ter contribuído para a proliferação da dengue em Umuarama, estado do Paraná, **Acta Scientiarum. Health Sciences** Maringá, v. 25, no. 1, p. 81-85, 2003

SILVA, M. S; ANTONIOLLI, A.R; BATISTA, J.S; MOTA, C.N da. Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrintestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. **Acta bot. Bras**, v. 20, n.4, p. 815-829, 2006.

SIMÕES, C.M.O & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed da UFSC, 2000.

SHU, P.Y & HUANG, J.H Current Advances in Dengue Diagnosis, **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Taiwan, v.11, n.4, p. 642–650, July 2004

SHUM, D; SMITH, J.L; HIRSCH, A.J; BHINDER, B; RADU, C; STEIN, D.A; NELSON, J.A; FRÜH, K; DJABALLAH, H. High-Content Assay to Identify Inhibitors of *Dengue virus* Infection, **ASSAY and Drug Development Technologies**, v.8,n.5, p.553-570, 2010

SUBRAMANYAS, S; KIM, S.S; ABRAHAM,S; YAO,J; KUMAR, M; KUMAR,P; HARIDAS,V; LEE,S.K; SHULTZ, L.D; GREINER, D.N.M; SHANKAR,P. Targeted delivery of small interfering RNA to human dendritic cells to suppress *Dengue virus* infection and associated proinflammatory Cytokine production. **Journal of virology**, v.84, n.5, p.2490-2501

TANG, L.I; LINK, A.P; KOH, R.Y; CHYE, S.M; VOON, K.G Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, n.3, 2012.

Takhampunya R; UBOL, S; HOUNG, H-S; CAMERON, C.E; PADMANABHAN, R. Inhibition of *Dengue virus* replication by mycophenolic acid and ribavirin. **J Gen Virol**,v. 87, p. 1947-1952, 2006.

TAUIL,P.L Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil, **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.18, n.3, p.867-871, Mai-Jun, 2002

TEIXEIRA, M da G. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue, **Informe Epidemiológico do SUS**, Bahia v.8, n.4, p.5-33, 1999

TWIDDY, S. S; FARRAR, J.J; VINH, C.N; WILLS, B; GOULS, E.A; GRITSUN, T; LLOYD,G; HOLMES,E.C. Phylogenetic relationships and differential selection pressures among genotypes of dengue-2 virus. **Virology**, v. 298, n. 1, p. 63-72, June 2002.

VLIETINCK, A.J; BRUYNE, T.D; BERGHE, D.V; COS,P. A. Plant substances as antiviral agents. **Current Organic Chemistry**, v. 1, p. 307-344, 1997.

WANG, E; NI, H; XU,R; BARRETT, A.D; WATOWICH, S.J; GUBLER, D.J; WEAVER, S.C. Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **Journal of Virology**, [S.I.], v. 74, n. 7, p. 3227-3234, Apr. 2000.

WHITBY K; PIERSON, T.C; GEISS,B; LANE, K; ENGLE, M; ZHOU,Y; DOMS, R.W; DIAMOND, M.S. Castanospermine, a potent inhibitor of *Dengue virus* infection *in vitro* and *in vivo*. **J Virol**, v.79, p. 8698–8706, 2005

WITTKER, V; ROBB,T.E; THU, H.M; NISALAK, A; NIMMANNITYA, S; KALAYANROOJ,S; VAUGHN, D.W; ENDY, T.P; HOLMES, E.C; AASKOV, J.G. Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. **Virology**, v. 301, n. 1, p. 146-156, Sept. 2002.

WU,R; SMIDANSKY, E.D; OH, H.S; TAKHAMPUNYA, R; PADMANABHAN, R; CAMERON, C.E; PETERSON, B.R. Synthesis of a 6-Methyl-7-Deaza Analogue of Adenosine that Potently Inhibits Replication of Polio and Dengue Viruses. **J Med Chem**, v.53,n.22, p. 1-23, 2011

WU, S-F; LEE, C-J; LIAO, C-L; DWEK, R.A; ZITZMANN, N; LIN, Y-L . Antiviral effects of an iminosugar derivative on flavivirus infections. **J Virol**, v.76, p.3596-3604, 2002

YIN,Z; CHEN, Y.L; SCHUL,W; WANG, Q.Y; GU,F; DURAISWAMY, J; KONDREDDI, R.R; NIYOMRATTANAKIT, P; LAKSHMINARAYANA, S.B; GOH, A; XU, H.Y; LIU, W; LIU, B; LIM, J.Y; NG, C.Y; QING,M; LIM,C.C; YIP, A; WANG, G; CHAN, W.L; TAN, H.P; LIN, K; ZHANG, B; ZOU, G; BERNARD, K.A; GARRETT, C; BELTZ, K; DONG, M; WEAVER, M; HE, H; PICHOTA, A; DARTOIS, V; KELLER, T.H; SHI,P.Y. An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. **PNAS**, v.106, n.48, p. 20435–20439, 2009

YUNES, R.A; PEDROSA, R.C; FILHO, V.C . Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil, **Quim. Nova**, Santa Catarina, vol. 24, No. 1, p.147-152, 2001.

ZANDI,K; TEOH, B-T; SAM, S-S; WONG, P-F; MUSTAFA, M.R; ABUBAKAR, S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against *Dengue virus* type-2, **Virology journal**, v.8 p.1-11

ZHANG, X.G; MASON, P.W; DUBOVI, E.J; XU,X; BOURNE,N; RENSHAW, R.W; BLOCK,T.M; BIRK,A.V. Antiviral activity of geneticin against *Dengue virus*, **Antiviral Res**, v.83, n.1, p.21-27, 2009