

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE *Maytenus imbricata*  
CONTRA *Flavivírus***

**PAULA EILLANNY SILVA MARINHO**

BELO HORIZONTE - MG  
2015

**PAULA EILLANNY SILVA MARINHO**

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE *Maytenus imbricata*  
CONTRA *Flavivírus***

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia da Universidade Federal  
de Minas Gerais como requisito para  
obtenção de título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien  
Kroon

BELO HORIZONTE - MG  
2015

## EPÍGRAFE

*"Não faças do amanhã  
o sinônimo de nunca,  
nem o ontem te seja o mesmo  
que nunca mais.  
Teus passos ficaram.  
Olhes para trás...  
mas vá em frente  
pois há muitos que precisam  
que chegues para poderem seguir-te."*

*Charles Chaplin*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, a quem eu sempre entreguei minha vida, para que guiasse meus passos e que eu sei que sua vontade nunca vai me levar a lugares em que sua graça não possa me proteger.

À professora Erna, que me aceitou, me acolheu, mesmo sem eu ter experiência, sem referências. Saiba que eu serei eternamente grata pela oportunidade e lhe tenho o mais profundo respeito e admiração.

Ao Prof. Paulo, o PP, que é pura experiência e sabedoria e que vive puxando minhas orelhas. Prefiro acreditar que quem ele mais dá bronca é porque ele gosta mais.

Aos profs Jonatas, Cláudio e Giliane pela convivência que é sempre de muito aprendizado.

Aos amigos do LabVírus, que me receberam nessa família, me ajudaram a construir minha base em pesquisa em virologia. Tudo que eu sei de laboratório eu devo um pouquinho a cada um de vocês. De IC's a pós-doc's, muito obrigada!

Ao Rodrigo e Ale, por terem me ensinado, com muita paciência, sobre esse mundinho trabalhoso que é pesquisa com antiviral.

À Alice, Luis, Gaby e Deborah que entraram na minha vida meio que do nada e não saíram mais. Companheiros de "imagem e ação", de comilança, de passeios inesperados nas feiras da vida, né Gaby? Vocês sempre vão ser o *creme de la creme* das minhas bagunças lá em casa.

À P-zita, Galila e Ketyllene, pela amizade, por cuidarem de mim, se preocuparem, por me conhecer e perceber que eu não estou bem, mesmo quando minha fachada diz o contrário. Vocês são muito mais que amigos de trabalho, são amigos que escolhi pra fazer parte da minha vida. Amo vocês.

À minha família mineira, "Querol", Marcelita, Mi e Thais. Tive muita sorte em ter vocês na minha vida. Vocês fizeram a distância do Maranhão mais fácil, sendo as melhores companheiras de AP que eu poderia desejar. Por causa de vocês eu tenho um cantinho em BH que eu posso chamar de LAR!....ah...e ao o Alvinzinho, por ser o único gato que fui capaz de gostar. Deve ser porque tá mais pra gatachorro.

À minha família, por me apoiar, por me amar, terem tanto orgulho de mim. Michael e Tio Luis, podem se gabar agora vocês tem uma parenta quase mestra.

Aos meus avós, "Loisa" e Chico, meus velhinhos, e a minha vó Zezé, *in memoriam*. Vocês fazem parte da minha formação, muito do que eu sou eu devo ao que aprendi com vocês. Seja na Patolândia, seja no céu, eu sei que estão sempre orando e intercedendo por mim.

Às outras duas criaturas que meus pais botaram no mundo, Tianny e Claudinho. Apesar do trabalho que me vocês me dão mesmo à distância eu amo vocês demais.

Ao meu Xuxuzinho, Daniel, por estar comigo em todos os momentos dessa jornada. Por cuidar de mim, ser minha melhor distração, me ensinar a ser uma pessoa mais paciente, por ter chorado comigo no dia que passei no mestrado, por me aguentar esses 4 anos, por tudo. Se a pessoa certa pra você é aquela que te faz uma pessoa melhor, com certeza já encontrei a minha. Te amo!

Aos meus pais, Benta e Paulo (Kirida e Papys). Eu nunca desejei nada na vida que considere impossível de conquistar, pois sempre tive vocês ao meu lado dizendo que eu ia conseguir. Vocês são meu exemplo, meu orgulho, meu porto seguro. Obrigado por me amarem, por me financiarem, por dizerem que estão com saudade e que me amam todo dia, por serem meus maiores fãs e meus melhores amigos. Tudo que eu faço na vida é pra que vocês possam se orgulhar e o maior orgulho que eu tenho nessa vida é ser filha de vocês. Amo vocês mais que tudo!

À todos vocês meu MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

MARINHO, P. E. S. Atividade antiviral de extratos de *Maytenus imbricata* contra *Flavivírus*. 2015. Dissertação. Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Diferentes famílias de vírus fazem parte de um grupo conhecido por serem transmitidos por artrópodes, são os arbovirus. O gênero *Flavivírus*, pertencente à família *Flaviviridae*, possuem arbovirus que são problemas de saúde pública mundial com o *Dengue virus* (DENV) e o *Yellow fever virus* (YFV), e vírus emergentes como o *St. Louis encephalitis virus* (SLEV). Apesar dos esforços de vários grupos de estudos, ainda não há vacina contra dengue, diferentemente para febre amarela, em que há uma vacina segura e eficaz. Mas não está disponível nenhuma droga antiviral aprovada contra nenhum flavivírus. O tratamento consiste em tratamento de suporte com atenção a hidratação do paciente e o emprego de antitérmicos. Consequentemente existe uma clara necessidade de medicamentos seguros e eficazes contra essas viroses. Nesse contexto, as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído para a obtenção de vários fármacos até hoje amplamente utilizados na clínica. A espécie *Maytenus imbricata* é uma planta endêmica no Brasil que ainda não teve sua atividade antiviral investigada. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiviral de *M. imbricata* contra DENV-4, SLEV e YFV. Foi feita a triagem dos extratos FSEAT, SEM e SEAT obtidos de raízes de *M. imbricata* contra DENV-4, SLEV e YFV empregando a técnica de MTT. Foram obtidos índices de seletividade (IS) que variavam 7,67 a 10,32 para DENV-4; 3,82 a 6,87 para SLEV; e entre 5,4 a 8,31 contra YFV. Nos testes de atividade virucida contra esses vírus foi possível obter IS que variavam entre 13,56 a 20,93 para DENV-4; 9,07 a 19,41 contra SLEV; e 11,17 a 13,49 contra YFV, demonstrando a ação virucida desses extratos. Quando os extratos foram incubados com os  $10^6$  pfu dos vírus por 5, 15, 30min e 1h, houve uma diminuição de até 3log (SEAT contra YFV) no título viral quando comparados com o controle não tratado, sendo essa ação crescente com ação virucida máxima após 1h de incubação. Os extratos não apresentaram atividade no pré e pós-tratamento de infecções in vitro. Nenhum dos extratos apresentou atividade antiviral significativa contra outros vírus de DNA e RNA, envelopados ou não. Essa triagem nos permitiu especular também que a atividade virucida dos extratos contra DENV, SLEV e YFV não é apenas pela presença do envelope, visto que, com exceção do EMC, todos os outros vírus testados apresentavam envelope. Isso sugere que substâncias ativas dos extratos podem ter ação seletiva no envelope viral de *Flavivírus*. O mecanismo de ação da atividade antiviral dos extratos ainda precisa ser elucidado, mas pode-se concluir que *M. imbricata* tem potencial para continuar sendo estudada e com a vantagem de ter apresentado atividade relevante não apenas contra DENV, mas também contra outros flavivírus que não apresentam terapia antiviral.

**Palavras-chave:** Antiviral, *Flavivírus*, *Maytenus imbricata*

## ABSTRACT

MARINHO, P. E. S. Antiviral activity of *Maytenus imbricata* extracts against flavivírus. 2015. Dissertation Institute of Biological Sciences – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Different families of viruses belong to the arboviruses group known to be transmitted by arthropods. Members of the *Flavivirus* genus which belongs to the Flaviviridae family, as *Dengue virus* (DENV) and the *Yellow fever virus* (YFV), and emerging viruses as *St. Louis encephalitis virus* (SLEV), are arboviruses with high burden in global public health. Despite the efforts, there is no dengue vaccine, unlike yellow fever, whose vaccine is safe and effective. Antiviral drugs approved against any flaviviruses are unavailable. The treatment consists in supportive care with patient hydration and use of antipyretics. Consequently, there is a clear necessity for safe and effective drugs against these viruses. In this context, plants, and their therapeutic use in popular medicine, have provided the development of several drugs today widely used in the clinic. The *Maytenus imbricata* species is an endemic plant in Brazil and its antiviral activity was not investigated yet. This study aimed to evaluate the antiviral activity of *M. imbricata* against DENV-4, SLEV and YFV. Screening of FSEAT, SEM and SEAT extracts obtained from *M. imbricata* roots against DENV-4, SLEV and YFV was carried out by means of the MTT technique. Selectivity indexes (SI) were obtained ranging from 7,67 to 10,32 for DENV-4; 3.82 to 6.87 for SLEV; and from 5.4 to 8.31 for YFV. In virucidal activity tests against these viruses SI ranging from 13,56 to 20,93 against DENV-4; 9.07 to 19.41 against SLEV; and 11.17 to 13.49 against YFV were obtained. When the extracts were incubated with  $10^6$  pfu of virus for 5, 15, 30 minutes and 1 hour, there was a decrease of up to 3 log<sub>10</sub> (SEAT against YFV) in viral titer compared to the untreated control, and this action increased to maximum virucidal action after 1h of incubation. The extracts showed no activity in the pre- and post-treatment of *in vitro* infections. None of the extracts showed significant antiviral activity against other DNA and RNA viruses, enveloped or not. This screening allowed us to also argue that the virucidal activity of the extracts against DENV, SLEV and YFV is not only due the envelope presence since, with the exception of EMC, all other viruses tested presented an envelope. This suggests that active substances of the extracts may have selective action on the *Flavivirus*' viral envelope. The mechanism of action of the antiviral activity of the extracts remains to be elucidated, but it can be concluded that *M. imbricata* has a potential to continue to be studied. It is advantageous because it presents relevant activity not only against DENV, but also against other flaviviruses without antiviral therapy.

**Keywords:** Antiviral, *Flavivirus*, *Maytenus imbricata*.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1.1. Partícula viral .....	17
1.1.2. Ciclo de multiplicação .....	18
1.1.3. Proteínas virais .....	20
1.1.4. Vetores e transmissão .....	22
1.1.5 Tratamento .....	25
1.2. Dengue .....	26
1.2.1. Patogênese e Aspectos Clínicos .....	26
1.2.2. Epidemiologia .....	28
1.3. Febre Amarela .....	29
1.3.1. Patogênese e Aspectos Clínicos .....	29
1.3.2. Epidemiologia .....	30
1.4. Encefalite de St. Louis .....	31
1.4.1. Patogênese e Aspectos Clínicos .....	31
1.4.2. Epidemiologia .....	31
1.5. Drogas antivirais .....	32
1.5.1. Atividade antiviral de extratos vegetais.....	33
1.6. <i>Maytenus imbricata</i> .....	36
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>38</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
3.1. Geral .....	40
3.2. Específicos.....	40
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1. Estratégia de trabalho .....	41
4.2. Extratos de <i>Maytenus imbricata</i> .....	41
4.3. Culturas celulares .....	42

4.4. Vírus.....	42
4.4.1. Estoque viral .....	42
4.4.2 Multiplicação viral DENV-4 .....	43
4.4.3 Multiplicação viral de SLEV e YFV.....	43
4.4.4. Titulação viral.....	44
4.5. Confirmação da espécie viral .....	44
4.5.1. Extração de RNA .....	44
4.5.2. Produção de DNA complementar .....	45
4.5.3 Detecção de RNA viral.....	45
4.5.4. Sequenciamento nucleotídico .....	46
4.5.5. Alinhamento das sequências nucleotídicas .....	46
4.6. Avaliação da citotoxicidade (CC <sub>50</sub> ) em Vero .....	46
4.7. Avaliação da atividade antiviral - MTT .....	47
4.8. Avaliação da atividade virucida- ensaio de placa.....	47
4.9. Determinação da concentração virucida- CV <sub>50</sub> .....	48
4.10. Avaliação do tempo de ação virucida- ensaio de placa .....	49
4.11. Avaliação da ação profilática dos extratos vegetais - pré-tratamento .....	49
4.12. Pós-tratamento.....	50
4.13. Avaliação da especificidade da atividade antiviral dos extratos de <i>M. imbricata</i> contra flavivírus.....	50
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1. Titulação e confirmação das espécies virais .....	51
5.2. Avaliação da citotoxicidade dos extratos .....	52
5.3. Avaliação da atividade antiviral dos extratos empregando a técnica colorimétrica .....	53
5.4. Avaliação da atividade virucida .....	54
5.4.1. DENV-4.....	54
5.4.2. SLEV.....	56
5.4.3. YFV .....	57
5.5. Determinação da concentração virucida .....	58

5.6. Avaliação da ação profilática dos extratos vegetais - Pré-tratamento.....	61
5.7. Pós-tratamento.....	62
5.8. Avaliação da especificidade da atividade antiviral dos extratos de <i>M. imbricata</i> contra flavivírus. ....	62
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Representação da partícula viral de *Dengue virus*
- FIGURA 2 Representação esquemática da organização do genoma de flavivírus e processamento da poliproteína
- FIGURA 3 Ciclo de multiplicação dos flavivírus
- FIGURA 4 Ciclo de transmissão de *Dengue virus*
- FIGURA 5 Ciclo de transmissão de YFV
- FIGURA 6 Ciclo de transmissão de SLEV
- FIGURA 7 Mapa dos países ou áreas do mundo em risco de infecções pelo DENV em 2011
- FIGURA 8 Fotografia de raízes, folhas e frutos de *Maytenus imbricata*
- FIGURA 9 Curva de dissociação para a amplificação de DENV-4
- FIGURA 10 Viabilidade celular após tratamento com extratos de *M. imbricata*
- FIGURA 11 : Atividade virucida de extratos de *M. imbricata* contra DENV-4
- FIGURA 12 Atividade virucida de extratos de *M. imbricata* contra SLEV
- FIGURA 13 Atividade virucida de extratos de *M. imbricata* contra YFV
- FIGURA 14 Curva dose-resposta para atividade virucida dos extratos de *M.imbricata* contra DENV-4 representada pela infectividade residual determinada por ensaio de placa

FIGURA 15 Curva dose-resposta para atividade virucida dos extratos de *M.imbricata* contra SLEV representada pela infectividade residual determinada por ensaio de placa

FIGURA 16 Curva dose-resposta para atividade virucida dos extratos de *M.imbricata* contra YFV representada pela infectividade residual determinada por ensaio de placa

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Sequência dos nucleotídeos utilizados na qPCR.
TABELA 2	Vírus testados com extratos de <i>M. imbricata</i>
TABELA 3	Título dos estoques virais em células Vero.
TABELA 4	Concentração citotóxica em 50% das células Vero após 48h.
TABELA 5	Avaliação da atividade antiviral por método colorimétrico.
TABELA 6	Índices de seletividade dos extratos de <i>M. imbricata</i> determinadas por ensaio virucida
TABELA 7	Especificidade dos extratos de <i>M. imbricata</i> para flavivírus

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius
Ac	Anticorpo
AcOEt	Acetato de etila
ADE	Antibody-dependent enhancement
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APEUV	<i>Apeu virus</i>
BLAST	Basic local alignment search tool
BOD	Biodisponibilidade de oxigênio
BUSV	<i>Bussuquara virus</i>
BHV-5	<i>Bovine herpes virus 5</i>
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica para 50% da monocamada celular
cDNA	DNA complementar
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva para 50% da monocamada celular
CMC	Carboximetil celulose
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPCV	<i>Cacipacoré virus</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
DENV-1	<i>Dengue virus 1</i>
DENV-2	<i>Dengue virus 2</i>
DENV-3	<i>Dengue virus 3</i>
DENV-4	<i>Dengue virus 4</i>
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin)
MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EMC	<i>Encephalomyocarditis virus</i>
EUA	Estados Unidos da América
FD	Febre do dengue
FHD	Febre hemorrágica do dengue
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>

HHV1	<i>Human herpesvirus 1</i>
Hex-Et <sub>2</sub> O	Hexânico-éter etílico
ICTV	Internacional Committee on Taxonomy of Viruses
IFN	Interferon
IGUV	<i>Iguape virus</i>
IL-6	Interleucina -6
IL-10	Interleucina-10
ILHV	<i>Ilhéus virus</i>
IS	Índice de seletividade
ITQV	<i>Itaqui virus</i>
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
Kb	Quilo bases
kDa	Quilo Dalton
Log	Logarítmo
MeOH	Metanol
min.	Minuto
moi	Multiplicidade de infecção
MS	Ministério da Saúde
MTT	3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
NK	Natural killer
NA	Não ativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open reading frame
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
ROCV	<i>Rocio virus</i>
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase.
SCD	Síndrome do choque do dengue
SFB	Soro fetal bovino

SLEV	<i>St. Louis encephalitis virus</i>
SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
sp	Espécie
TBEV	<i>Tickborne encephalitis virus</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGN	Rede trans-Golgi
TM	Temperatura de dissociação
TNF	Fator de necrose tumoral
μ	Micro
UFP	Unidade formadora de placa
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UTR	Untranslated regions
VACV-WR	<i>Vaccinia virus</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis Indiana virus</i>
WNV	<i>West Nile virus</i>
YFV	<i>Yellow fever virus</i>

## 1. INTRODUÇÃO

O *Dengue virus* (DENV), *Yellow fever virus* (YFV) e *St. Louis encephalitis virus* (SLEV) pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, sendo essa família também composta por outros 3 gêneros: *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Pestivirus*. O gênero *Flavivirus* apresenta o maior número de espécies, 53 no total, e tem o YFV como espécie tipo (*INTERNACIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES-ICTV*, 2013).

Os flavivírus são transmitidos por artrópodes hematófagos e são classificados em três grandes grupos: os vírus transmitidos por carrapatos que compreendem vírus como o *Tickborne encephalitis virus* (TBEV); os vírus transmitidos por mosquitos como o DENV, YFV, *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV), SLEV; e ainda um grupo de espécies sem vetor artrópode conhecido (GUBLER *et al*, 2007). No Brasil já foram identificados 11 espécies de flavivírus: *Bussuquara virus* (BUSV), *Cacipacoré virus* (CPCV), DENV 1 a 4, *Iguape virus* (IGUV), *Ilhéus virus* (ILHV), *Rocio virus* (ROCV), SLEV e YFV (FIGUEIREDO, 2000; FIGUEIREDO, 2008).

Os vírus transmitidos por artrópodes são conhecidos como arbovírus, que vem da expressão da língua inglesa *arthropod borne viruses*. Com esse nome classificam-se vírus de diferentes famílias, como *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*, segundo critério epidemiológico (FIGUEIREDO, 2010). Os arbovírus mantêm-se na natureza em ciclos envolvendo vetores artrópodes (principalmente mosquitos), como o *Aedes aegypti* e o *Culex*. Os vírus multiplicam-se e produzem viremia nos vertebrados, multiplicam-se nos tecidos de artrópodes e são transmitidos para outros vertebrados pelas picadas de artrópodes, após um período de incubação (DEFOLIART, 1987; SILVA, 2010).

O DENV possui quatro sorotipos antigenicamente distintos: *Dengue virus 1* (DENV-1), *Dengue virus 2* (DENV-2), *Dengue virus 3* (DENV-3) e *Dengue virus 4* (DENV-4). A diversidade antigênica do DENV é de suma importância, pois a falta de imunidade cruzada de longo prazo entre os quatro tipos de vírus permite múltiplas infecções sequenciais (SIMMONS *et al*, 2012). Dentro de cada sorotipo do DENV existem vários genótipos com similaridade de 94% entre os genótipos do mesmo sorotipo (RICO-HESSE, 1990; LANCIOTTI *et al*, 1994).

Os sorotipos de DENV compartilham 65% de similaridade nas sequências nucleotídicas do genoma, que é aproximadamente a mesma similaridade compartilhada pelo WNV com o JEV. Apesar destas diferenças, cada sorotipo causa sintomas semelhantes em seres humanos e circulam no mesmo nicho ecológico (GUZMAN *et al*, 2010).

## 1.1. *Flavivírus*

### 1.1.1. Partícula viral

A partícula dos flavivírus tem um diâmetro em torno de 50 nm, forma esférica e o capsídeo apresenta simetria icosaédrica e contém um genoma de RNA fita simples de polaridade positiva com 11000 nucleotídeos. O nucleocapsídeo é envolto por uma bicamada lipídica que constitui o envelope viral, onde estão ancoradas as glicoproteínas de superfície (WESTAWAY, 1985).

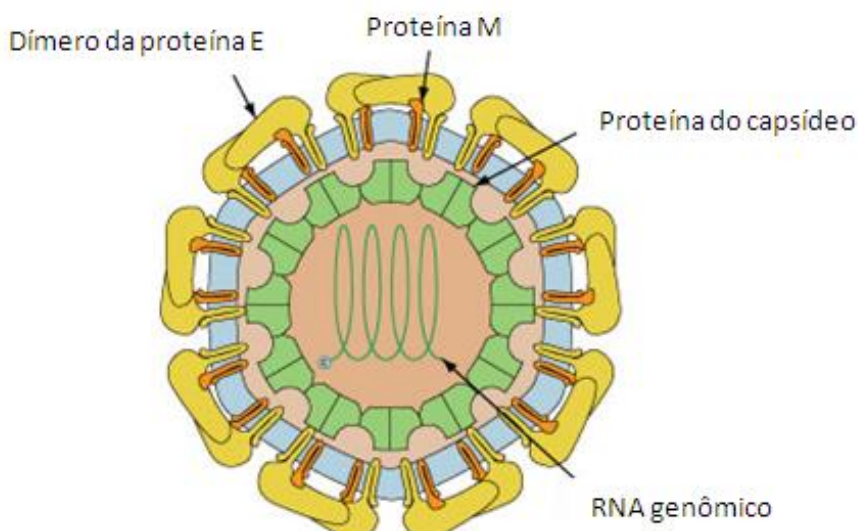


FIGURA 1: **Representação da partícula viral de *Dengue virus***. A representação inclui as três proteínas estruturais e o material genético. Fonte: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_protein/24.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/24.html), 2013 – modificado.

O genoma apresenta apenas uma janela aberta de leitura (*open reading frame* - ORF) que codifica proteínas estruturais e proteínas não estruturais (Figura 2). A poliproteína produzida é clivada pós-traducionalmente por proteases celulares e virais em três proteínas estruturais: capsídeo (C), precursor de membrana/membrana (prM/M) e envelope (E); e sete proteínas não estruturais: NS1,

NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (HENCHAL, PUTNAK, 1990; LINDENBACH, THIEL, RICE, 2007).

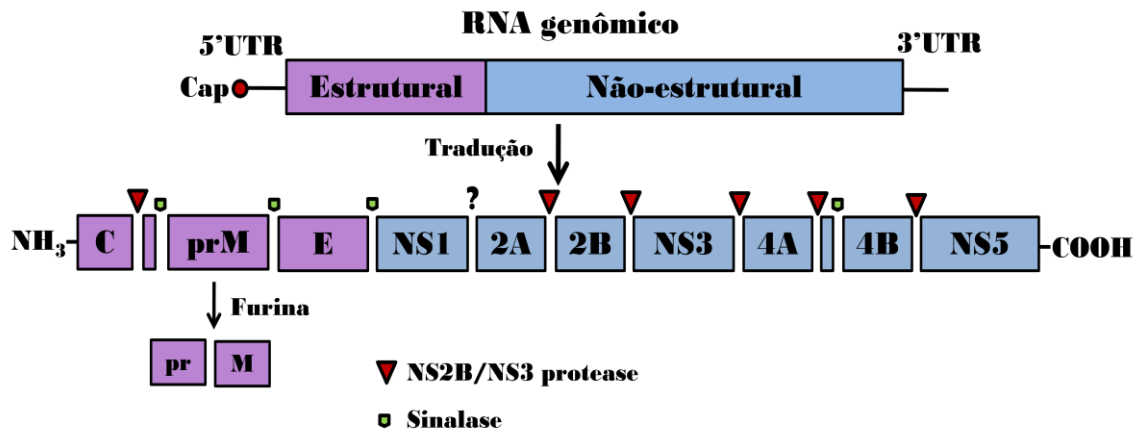


FIGURA 2: Representação esquemática da organização do genoma de *flavivírus* e processamento da poliproteína. Sítios de clivagem da poliproteína utilizadas pela protease viral NS2B/NS3, sinalase da célula hospedeira e furina são mostradas (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009 – modificado).

O genoma de RNA possui regiões não traduzidas (UTR- *untranslated regions*) nas porções 5' e 3', com estruturas secundárias que são essenciais para a iniciação da tradução e replicação (LINDENBACH *et al.*, 2007). A extremidade 5' possui *cap* mas a região 3' carece de cauda poli-A.

### 1.1.2. Ciclo de multiplicação

As células hospedeiras suscetíveis à infecção por flavivírus incluem monócitos, macrófagos e células dendríticas (revisado por SAMPATH; PADMANABHAN, 2009). O vírus adsorve-se à superfície celular, mediada pela proteína E, e é internalizado na célula por endocitose mediada por clatrina (Figura 3). O baixo pH do compartimento endossomal desencadeia a fusão da membrana da célula hospedeira com a membrana viral mediada pela reorganização estrutural da proteína E, o que leva ao desnudamento do vírus e liberação do RNA e nucleocapsídeo viral no citoplasma. A tradução do RNA gera uma poliproteína que é

clivada pela serina-protease codificada pelo vírus, NS2B/NS3, e pelas proteases sinalase e furina, codificadas pelas células hospedeiras (LINDENBACH *et al*, 2007; PERERA *et al*, 2008).

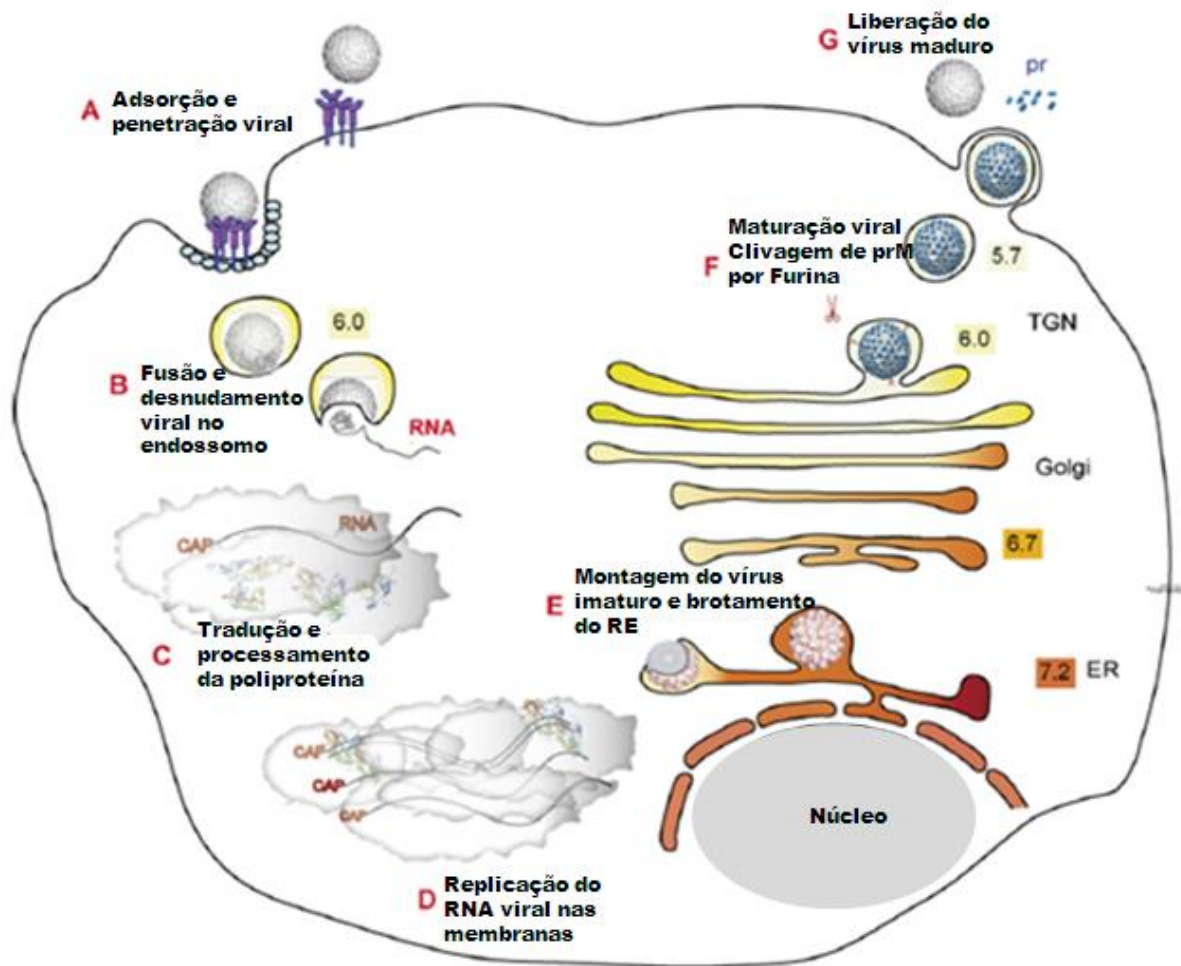


FIGURA 3: **Ciclo multiplicação dos flavivírus.** (A) Vírus adsorvem a receptores na superfície celular e são internalizados por endocitose. (B) No pH baixo do endossomo formado, ocorre a fusão das membranas viral e celular, permitindo o desnudamento do vírus e liberação de RNA para o citoplasma. (C) O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada pelas proteases virais e celulares. (D) As proteínas não estruturais virais auxiliam na replicação do genoma de RNA. (E) A montagem do vírus ocorre na membrana do RE, onde a proteína do capsídeo e o RNA viral são envolvidos pela membrana do RE e glicoproteínas para formar partículas de vírus imaturo. (F) As partículas de vírus imaturo são transportadas através da via secretora. No pH baixo da rede trans-Golgi (TGN) ocorre a clivagem de prM mediada por furina. (G) O vírus maduro é liberado para o citoplasma. Os números indicados nas caixas coloridas referem-se ao pH dos respectivos compartimentos. Fonte: PERERA *et al*, 2008 - modificado.

As proteínas não estruturais participam da replicação do RNA viral nos complexos de replicação associados a membranas celulares (MACKENZIE *et al*,

2001). Uma vez que a polimerase viral NS5 (RNA polimerase RNA dependente) foi sintetizada e liberada a partir do precursor de poliproteína, o RNA viral pode ser replicado, a partir da porção 5', em um RNA intermediário de cadeia negativa, que é então transcrito em fita positiva. Uma fita dupla de RNA intermediário transitório é formada durante este processo, que deve ser separada em fitas individuais, a fim de dar acesso a NS5 polimerase para outros ciclos de replicação do genoma viral (LESCAR *et al*, 2008).

A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (RE) conduzindo à formação de partículas imaturas não infecciosas, que são transportadas através da via exocítica da célula. O pH ácido na rede trans-Golgi (TGN) provoca um rearranjo das proteínas do envelope e a clivagem proteolítica de prM em “pr” e “M” pela protease furina celular. A porção peptídica “pr” continua associada à partícula para evitar que a proteína E sofra uma fusão prematura antes de ser exocitada, havendo então a liberação da porção “pr” após o brotamento da partícula viral no citoplasma onde o pH é neutro (LINDENBACH *et al*, 2007; revisado por HEINZ; STIASNY, 2012).

### **1.1.3. Proteínas virais**

As proteínas estruturais são necessárias para a formação de partículas do vírus, enquanto as proteínas não estruturais não são detectáveis na partícula viral, e estão diretamente envolvidas na replicação do RNA através da sua associação com as membranas intracelulares (MACKENZIE *et al*, 2001; TAKAHASHI *et al*, 2012).

A proteína do capsídeo (C) é uma pequena proteína muito básica de 12 kDa, sendo um fator essencial durante montagem viral. Esta proteína está envolvida na encapsidação adequada do genoma de RNA, resultando no nucleocapsídeo esférico com uma única cópia simples de RNA (BHUVANAKANTHAM; NG, 2013). A proteína C pode ser encontrada no núcleo de células infectadas embora a importância biológica desse achado durante a infecção ainda não é totalmente entendida (COLPITTS *et al*, 2011; BHUVANAKANTHAM; NG, 2013).

A glicoproteína E é responsável pela adsorção e penetração do vírus nas células, e é um alvo de anticorpos (Ac) neutralizantes (MURREL, 2011). É uma glicoproteína de aproximadamente 55 kDa sendo a maior proteína da superfície

viral. Apresenta três domínios distintos: o domínio I, que tem uma estrutura secundária em forma de  $\beta$  barril; o domínio II contém uma região de dimerização e o peptídeo de fusão, projetando-se ao longo da superfície do vírus entre as regiões transmembrana das subunidades do homodímero (LINDENBACH; RICE, 2003; CLYDE *et al*, 2006); e o domínio III corresponde à região de ligação aos receptores celulares. Em um vírus maduro, a proteína E apresenta-se como homodímero, com o peptídeo de fusão inacessível (MODIS *et al*, 2004; CLYDE *et al*, 2006).

A prM possui 22 kDa e após sofrer clivagem proteolítica durante a maturação viral origina a proteína M, com 8 kDa. A proteína prM funciona como chaperona para proteína E sendo necessária para o dobramento correto dessa proteína (LORENZ *et al*, 2002). A proteína prM também induz a produção de anticorpos altamente sorotipo específico(s), mas no vírus maduro após a clivagem apenas a proteína M é encontrada. A importância de anticorpos anti-prM na montagem da resposta imune frente à infecção de DENV ainda esta sendo avaliada (HERRERO *et al*, 2013).

A proteína NS1 ( $\approx$ 46 kDa) é translocada para o retículo endoplasmático (RE) durante a síntese e clivagem da proteína E pela sinalase do hospedeiro, enquanto uma enzima do hospedeiro, ainda desconhecida, cliva na junção NS1/2A (FALGOUT, MARKOFF, 1995; LINDENBACH *et al*, 2007). A proteína NS1 existe sob três formas – associada à célula, na superfície da célula e no meio extracelular. Essa proteína secretada, que é normalmente detectada no início de uma infecção de flavivírus, é atualmente utilizada no diagnóstico de dengue e febre amarela (ALCON *et al*, 2002; HENRIQUES *et al*, 2013, MONATH, VASCONCELOS, 2014).

A proteína NS2 é primeiramente clivada em duas subunidades, NS2A e NS2B. A proteína NS2A é pequena e hidrofóbica com aproximadamente 22 KDa sendo necessária na coordenação da replicação do RNA e auxiliando no empacotamento do genoma ( MADRID, 2007).

A proteína NS2B (14kDa) está associada à membrana e possui atividade proteolítica. Essa proteína forma um complexo com NS3 e é um cofator necessário para a atividade de serina protease em NS3 (LINDENBACH *et al*, 2007).

As proteínas NS4A e NS4B ainda não foram bem caracterizadas. São proteínas pequenas com 16 e 27 kDa, respectivamente (LINDENBACH; RICE, 2003). Suas estruturas, funções e interações com outras proteínas ainda precisam ser melhor entendidas ( ZOU *et al*, 2015).

NS3 (70 KDa) e NS5 (104 kDa) são as proteínas não estruturais melhor caracterizadas, com várias atividades enzimáticas necessárias para a multiplicação viral, e altamente conservadas entre os vírus do gênero *Flavivirus* (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009). NS3 tem três atividades distintas: serina-protease, juntamente com o co-fator NS2B, necessária para o processamento da poliproteína; atividade helicase / NTPase, necessária para desenrolar a forma intermediária de cadeia dupla de RNA; RNA trifosfatase, necessária para adicionar *cap* aos RNA virais nascentes (ZHANG *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1999; revisado por TAKAHASHI *et al.*, 2012).

A proteína NS5 dos flavivírus no geral serve como a polimerase viral (RNA polimerase RNA dependente), bem como uma metiltransferase, outra enzima essencial na via de *capping* do RNA. Esta proteína também é encontrada abundantemente no núcleo de células infectadas e parece reprimir a transcrição específica de genes importantes na resposta antiviral do hospedeiro, como interleucina-8 (PRYOR *et al.*, 2007; CALY *et al.*, 2012), embora sejam necessárias mais pesquisas para desvendar o verdadeiro papel dessa importação nuclear de NS5 (SELISKO *et al.*, 2014). Por sua atividade enzimática indispensável à replicação dos flavivírus, a proteína NS5 tem sido estudada como alvo para o descobrimento de novas drogas antivirais (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009; TAKAHASHI *et al.*, 2012).

#### **1.1.4. Vetores e transmissão**

Os seres humanos são infectados com DENV pela picada de um mosquito infectado. O *A. aegypti* é o principal vetor, sendo um pequeno mosquito tropical altamente adaptado ao ambiente urbano e doméstico, que prefere colocar seus ovos em recipientes artificiais comumente encontrados dentro e em torno das casas, por exemplo, vasos de flores, pneus de automóveis, baldes que coletam a água da chuva, ou seja, em locais com água limpa e parada na região peridomiciliar (GUBLER, 1998; SALEEZA *et al.*, 2011).

Um segundo vetor potencial é o *Aedes albopictus*, que é adaptado às regiões temperadas (América do Norte e Europa), onde podem ocorrer surtos ocasionais de dengue (ANDRAUD *et al.*, 2012), e às regiões tropicais, onde é vetor de dengue, febre amarela e de outras arboviroses, como o chikungunya (LI *et al.*, 2014). Apesar

de *A. albopictus* mostrar-se menos eficiente para a transmissão de dengue que o *A. aegypti*, o seu papel foi claramente estabelecido em alguns surtos de dengue em áreas livres do vetor primário, como no Havaí em 2001 (revisado por GRATZ, 2004).

Um ciclo silvestre de transmissão existe em florestas da Ásia e da África entre primatas não humanos e mosquitos *Aedes*, mas a contribuição deste ciclo de transmissão em epidemias urbana acredita-se ser mínima (GUBLER, 1989; WHITEHEAD *et al*, 2007). Atualmente DENV é um arbovírus que não necessita de um ciclo enzoótico para a manutenção da transmissão epidêmica nos seres humanos, assim como o ciclo “humano – mosquito – humano” de transmissão não responde mais como o DENV se mantém na natureza em períodos interepidêmicos (Figura 4). Thoisy e colaboradores (2009) demonstraram que mamíferos neotropicais, como roedores, marsupiais e morcegos, estavam infectados com o DENV. Vilela (2013) pela análise dos genes ribossomais 12S e 16S do sangue de repasto sanguíneo conseguiu identificar outras espécies de mamíferos onde os mosquitos *A.aegypti* se alimentaram, como o camundongo doméstico *Mus musculus* e em bovinos da espécie *Bos taurus*. Estes achados podem auxiliar no entendimento da manutenção da circulação do vírus em ciclos urbanos.

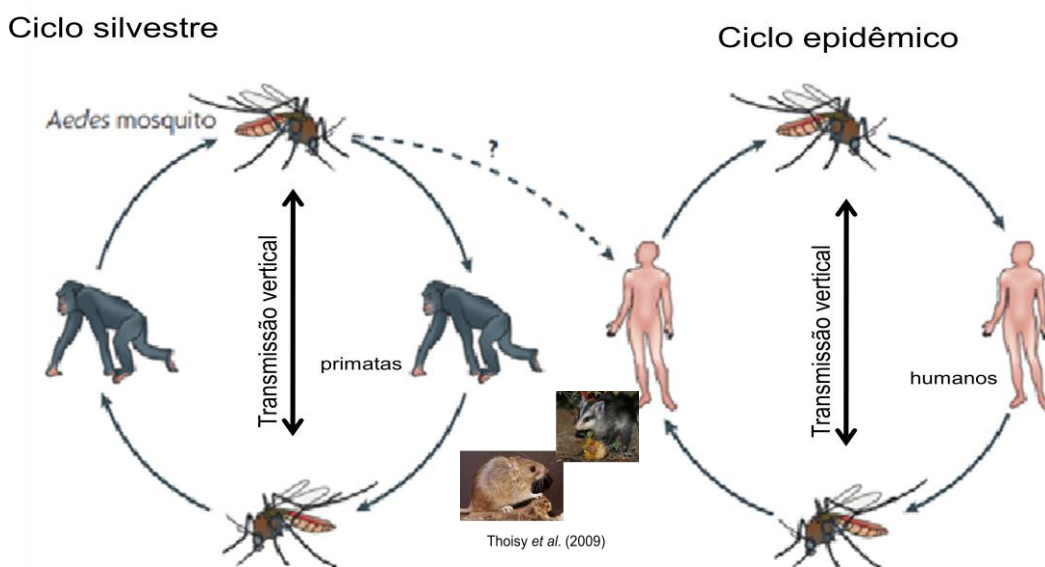


FIGURA 4: **Ciclo de transmissão de DENV.** O vírus é mantido em ciclo epidêmico urbano através da picada do mosquito infectado, assim como o ciclo silvestre é mantido por primatas não-humanos. O envolvimento de pequenos mamíferos no ciclo de manutenção do DENV tem sido discutido e ajudaria a explicar a manutenção do vírus em períodos interepidêmicos. (WHITEHEAD *et al.*, 2007-modificado).

No caso da transmissão do YFV, observa-se 2 ciclos: um silvestre e um urbano (figura 5). No ciclo urbano, o vírus é transmitido da mesma forma que o DENV, através da picada da fêmea do mosquito *A. aegypti* infectada pelo YFV. Até onde se sabe, não ocorre participação de animais silvestres ou domésticos e o homem é o hospedeiro responsável pela infecção do mosquito (MONATH, 2011). No ciclo silvestre, o YFV é mantido entre os macacos pelas picadas de mosquitos de várias espécies do gênero *Aedes* na África, e na América do Sul pelas espécies dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* (revisado por HANLEY *et al*, 2013).

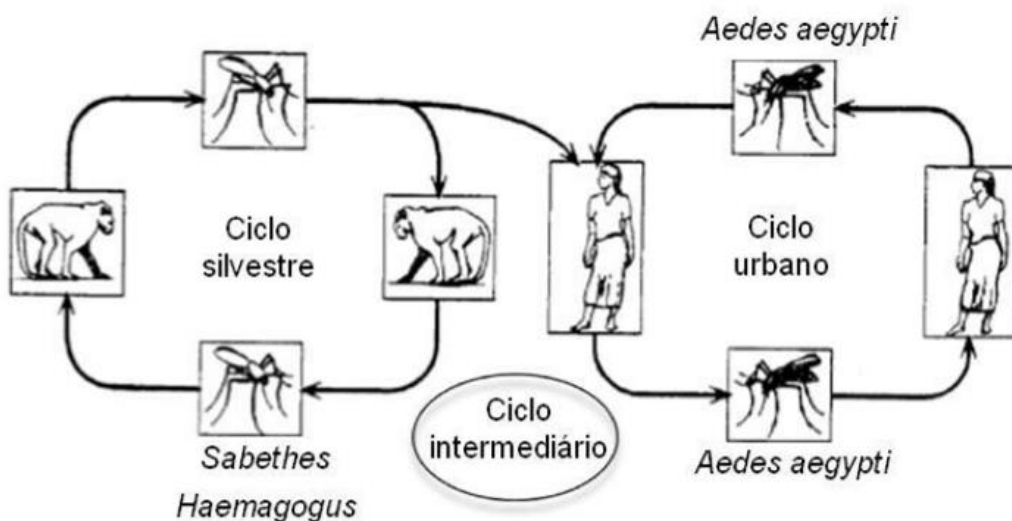


FIGURA 5: Ciclo de transmissão de YFV (GUBLER, 2004 - modificado).

Ciclo de transmissão viral do SLEV ainda é pouco estudado, mas se sabe que também é enzoótica e aves são os hospedeiros naturais de amplificação, sendo os mosquitos do gênero *Culex*, os mais comuns vetores de transmissão descritos. Outros vertebrados, como animais selvagens, cavalos e seres humanos, são consideradas acidentais (DÍAZ *et al*, 2012; ROSA *et al*, 2013; KOPP *et al*, 2013) (FIGURA 6). Mas assim como no ciclo do DENV, suspeita-se que outros mamíferos, primatas e marsupiais, possam ser reservatório do SLEV, além dos pássaros (FIGUEIREDO, 2000).

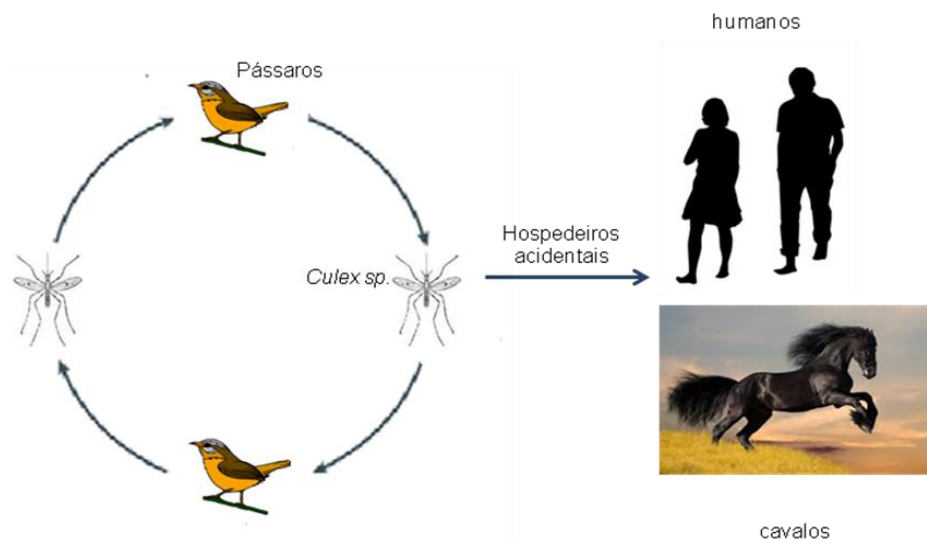


FIGURA 6: **Ciclo de transmissão de SLEV**

O melhor mecanismo conhecido de transmissão dos flavivírus é a transmissão horizontal (homem-mosquito), porém, a transovariana ou transmissão vertical, onde o mosquito fêmea infectado é capaz de transmitir o vírus a sua progênie, pode proporcionar um mecanismo para compreender como os flavivírus persistem na natureza, na ausência de hospedeiros vertebrados ou sob condições ambientais desfavoráveis a atividade do mosquito, mantendo o vírus na natureza e em períodos interepidêmicos (KHIN; THAN K, 1983; ROSEN *et al*, 1983; MONATH, 2001; MARTINS *et al*, 2012). A transmissão transovariana permite ao DENV persistir em gerações sucessivas de mosquitos, a taxas de 5% a 26% em laboratório, embora na natureza não deva ocorrer taxa maior que 20%. (JOSHI *et al*, 2002).

### 1.1.5 Tratamento

Não há tratamento específico disponível contra DENV, SLEV ou YFV, assim como contra outros flavivírus. O tratamento consiste em tratamento de suporte com atenção à hidratação do paciente e o emprego de antitérmicos (MONATH, 2001, OMS, 2009; PUJOL *et al*, 2012; RODRIGUEZ-ROCHE, GOULD, 2013; BEASLEY *et al*, 2014; OMS, 2014).

Um dos desafios enfrentados na terapia anti-dengue inclui a identificação de um composto seguro, com alvo nos 4 sorotipos e eficaz mesmo após o aparecimento da doença clínica grave (JULANDER *et al*, 2011).

## 1.2. Dengue

### 1.2.1. Patogênese e Aspectos Clínicos

A infecção pelo vírus da dengue clinicamente está associada com uma gama de manifestações. Após a picada do mosquito infectado, o vírus potencialmente pode encontrar várias células do sistema imunológico, como células dendríticas (CD), macrófagos e mastócitos (St. JOHN *et al*, 2013a), sendo que o DENV se liga ao receptor de manose em macrófagos e DC-SIGN (receptores de lectina tipo-C) em CD (Figura 4) (St. JOHN *et al*, 2013b).

Estudos em camundongos mostraram que as proteases de mastócitos, como a quimase, são liberadas durante a infecção aguda por DENV, e estas promovem a permeabilidade vascular. Animais que não possuíam mastócitos reduziram a permeabilidade vascular a níveis basais durante a infecção por DENV, comprovando a importância dessas células para o início de doença vascular característica de casos graves de dengue em pacientes humanos (St. JOHN *et al*, 2013a). Durante a inflamação localizada *in vivo*, a permeabilidade vascular induzida por mastócitos promove a entrega de fatores humorais e recrutamento das células imunes, tais como as células NK e células T para os locais de infecção por DENV (St JOHN *et al*, 2011).

Estas células infectadas migram para os linfonodos, resultando em infecção de mais células da linhagem monócito-macrófago. Isto amplifica a infecção, que é então difundida através do sistema linfático e sistema vascular (WHITEHORN, SIMMONS, 2011), resultando em viremia que pode ser detectável de 24 a 48 horas antes do início dos sintomas clínicos, podendo, então, o DENV ser isolado a partir do sangue durante a fase aguda da doença (St. JOHN *et al*, 2013a).

Após viremia primária, monócitos em circulação no sangue e macrófagos no fígado, no baço e na medula óssea são infectados (MARTINA, 2009; WHITEHORN; SIMMONS, 2011). Outra gama de tecidos e tipos de células pode ser infectada com o DENV, sugerindo que esse vírus utiliza vários receptores para ligação na célula, como receptor de ligação à manose, sulfato de heparano, sulfato de condroitina e a DC-SIGN (AVIRUTNAN *et al*, 2007; MILLER *et al*, 2008; WANG *et al*, 2011).

O estudo do tropismo viral *in vivo* do DENV tem sido dificultado pela falta de um modelo animal que apresente uma doença semelhante à encontrada em casos mais graves de dengue (WHITEHORN; SIMMONS, 2011; St. JOHN *et al*, 2013b).

Dengue apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas e pacientes infectados apresentam sintomas que variam de acordo com a gravidade e idade (HADINEGORO, 2012). Enquanto a maioria dos pacientes se recupera após um curso clínico não grave auto-limitante, uma pequena proporção progride para doença grave, caracterizada principalmente por extravasamento de plasma com ou sem hemorragia (OMS, 2009). Não há como definir o grupo que progredirá de doença não grave para doença grave, mas o tratamento adequado pode prevenir estes pacientes de desenvolvimento de condições clínicas mais graves (OMS, 2009; ALEXANDER *et al*, 2011). Os mecanismos que conduzem às manifestações graves ainda não estão completamente entendidos, mas é provável que seja multifatorial (WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

A OMS, em 1997, classificou clinicamente a dengue em três categorias: febre indiferenciada, febre do dengue (FD) e febre hemorrágica do dengue (FHD). Casos mais graves de FHD são classificados como síndrome do choque do dengue (SCD). Apesar da classificação de 1997 ainda ser muito utilizada, a atual classificação utilizada pela OMS (2009) considera: dengue sem ou com sinais de alertas; e dengue grave. Por causa da falta de especificidade dos sinais e sintomas clínicos apresentados pela dengue, exames laboratoriais e/ou evidência epidemiológica são necessários para a confirmação do diagnóstico (ALEXANDER *et al*, 2011; HADINEGORO, 2012; MS, 2013b).

Características clínicas atípicas de dengue estão sendo mais frequentemente relatadas, mas são, provavelmente, ainda subestimadas. Estes incluem encefalite, miocardite, hepatite, pancreatite, retinite, síndrome do desconforto respiratório agudo e rabdomiólise (GULATI; MAHESHWARI, 2007; revisado por WHITEHORN; SIMMONS, 2011; MOK *et al*, 2013).

Um fenômeno que ajuda a explicar casos mais graves de dengue é o ADE, *antibody-dependent enhancement* ou anticorpos potencializadores de infecção. Isso ocorre quando anticorpos pré-existentes presentes no corpo a partir de uma primeira infecção por DENV ligam-se a uma partícula viral infectante durante uma infecção subsequente com um sorotipo diferente. Os anticorpos da infecção primária não conseguem neutralizar o vírus. Em vez disso, o complexo Ac-vírus liga-se a receptores chamados receptores Fcγ (FcγR) em monócitos circulantes. Os anticorpos ajudam o vírus a infectar monócitos de forma mais eficiente. O resultado

é um aumento da replicação do vírus e um maior risco de dengue grave (HALSTEAD, 2003; WHITEHEAD, 2003).

Os estudos epidemiológicos demonstraram que uma infecção secundária com um sorotipo heterólogo ou infecção primária de recém-nascidos de mães imunes contra dengue aumentam significativamente o risco de desenvolver doença grave (RODENHUIS-ZYBERT *et al*, 2010).

Apenas o ADE não explicaria como as formas mais graves da doença podem ocorrer em uma primeira infecção. Outros fatores como sorotipo e genótipo específico, doenças crônicas, sexo e idade estão associados com risco de manifestações mais severas da doença, demonstrando a complexidade da interação vírus-hospedeiro (NISALAK *et al*, 2003; HALSEY *et al*, 2012). Altas concentrações de citocinas como interferons (IFN), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL6) e interleucina 10 (IL-10) têm sido observadas em soro de pacientes com dengue grave, comprovando o envolvimento do sistema imune do hospedeiro em complicações clínicas importantes causadas pelo DENV (GREEN; ROTHMAN, 2006; WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

### **1.2.2. Epidemiologia**

A dengue é um grande problema de saúde pública em todas as regiões subtropicais e tropicais do mundo (Figura 7), sendo provavelmente a doença viral transmitida por artrópodes de maior importância em termos de morbidade e mortalidade humana (HALSTEAD, 1980; GUZMAN *et al*, 2010; SIMMONS *et al*, 2012).

Estima-se que 50 milhões de infecções por dengue ocorrem anualmente e cerca de 2,5 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos de dengue (Figura 7) (OMS, 2013b), onde é comum ocorrer co-circulação dos 4 sorotipos virais, como no Brasil (FIGUEIREDO, 2000; WHITEHEAD *et al*, 2007; FIGUEIREDO, 2008). Oscilações na prevalência de cada sorotipo são comuns em áreas endêmicas. Tipicamente após um período de 2-4 anos ocorre um declínio do sorotipo prevalente e este é substituído por um novo sorotipo (WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

Segundo dados do Ministério da Saúde em 2013, no Brasil, foram registrados 1,4 milhão de casos de dengue em decorrência de uma maior circulação de DENV-

4, que respondeu por 60% dos casos (MS, 2013b). Em 2014, foram mais de 500 mil casos de dengue no país, com 379 óbitos registrados (MS, 2015).

Controle de vetores, por meio químico ou biológico e remoção de seus locais de reprodução, são a base da prevenção da dengue, mas esta abordagem não foi capaz de interromper a transmissão da doença em quase todos os países onde a dengue é endêmica (SIMMONS *et al*, 2012).



FIGURA 7. Mapa dos países ou áreas do mundo em risco de infecções pelo DENV em 2011, de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Fonte: OMS, 2013a.

Apesar dos esforços do Governo brasileiro em tentar reduzir o mosquito vetor da dengue, principal elo da cadeia de transmissão, ainda não foi alcançado um controle efetivo que reduza a densidade vetorial capaz de limitar ou reduzir a expansão da dengue, mesmo com investimento de mais de meio bilhão de dólares (cerca de R\$900 milhões) por ano (BARRETO *et al*, 2011).

### 1.3. Febre Amarela

#### 1.3.1. Patogênese e Aspectos Clínicos

Assim como para dengue, as complexas interações entre o YFV e o sistema imune do hospedeiro ainda não estão completamente elucidadas, não sabendo

ainda, o que leva a casos mais graves de febre amarela (STAPLES; MONATH, 2008; ENGELMANN *et al*, 2014).

Sabe-se que, após a picada do mosquito, o vírus alcança os linfonodos regionais, onde irá se replicar em linfócitos e macrófagos, desaparecendo, assim, da circulação por 24 horas (FERREIRA *et al*, 2011; QUARESMA *et al*, 2013). Após amplificação, os vírus circulam na corrente linfática até atingirem a corrente sanguínea, caracterizando o período de viremia e atingindo finalmente o fígado. Este é o principal órgão acometido na febre amarela, onde as células de Kupffer e os hepatócitos são infectados (QUARESMA *et al*, 2013). Neste período, o indivíduo apresenta febre e o sangue torna-se infectante para os vetores, podendo os vírus chegar ao coração, rim, timo e, em casos raros, cérebro, órgãos pelos quais o vírus possui tropismo tecidual (MONATH, 2001; QUARESMA *et al*, 2013).

O período de incubação após picada de mosquito é, geralmente, entre 3 e 6 dias, seguida pelo início de sinais clínicos, tais como dor de cabeça, febre, perda de apetite, vômitos, bem como dores musculares e articulares. O período de remissão da doença começa 3-4 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas (MONATH, 2001; MONATH; BARRETT, 2003). Icterícia característica devido ao excesso de bilirrubina, como resultado de danos às células do fígado pode se tornar aparente, sinal clínico que deu origem ao nome da doença. Entre os casos graves, a letalidade da febre amarela está entre 20 a 50% (MONATH; BARRETT, 2003).

Nos anos de 1930 uma vacina atenuada contra febre amarela foi desenvolvida (revisado por BEASLEY *et al*, 2014), e a vacina atenuada da linhagem 17D é utilizada até os dias de hoje, com milhares de doses produzidas e administradas anualmente, sendo considerada uma vacina segura e altamente efetiva. Contra febre amarela a vacinação ainda é a melhor forma de prevenção da doença (OMS, 2015).

### **1.3.2. Epidemiologia**

A África e a América Latina apresentam 45 países endêmicos para febre amarela, estando em risco uma população de aproximadamente 1bilhão de pessoas (VERMA *et al*, 2014). Estima-se que ocorram anualmente 200.000 casos de febre amarela em todo mundo, causando 30.000 mortes, com 90% deles ocorrendo na África (OMS, 2015).

Controle do vetor e a vacinação fizeram a febre amarela praticamente desaparecer de América do Norte e Europa, permanecendo endêmica em muitas partes da África e América do Sul, onde co-circula com outros flavivírus, como os vírus da dengue (BEASLEY *et al*, 2014). Para pessoas que viajam, essas áreas são consideradas pela OMS áreas de risco e a vacinação prévia é recomendada com o intuito de proteger o viajante e que o viajante importe o vírus o este se dissemine internacionalmente (JENTES *et al.*, 2011; OMS, 2015).

Segundo boletim epidemiológico de 2014 do Ministério da Saúde, foram confirmados 2 casos de febre amarela silvestre no Brasil, ambos do estado do Amazonas, área de mata considerada endêmica para a doença.

#### **1.4. Encefalite de St. Louis**

##### **1.4.1. Patogênese e Aspectos Clínicos**

Em um país onde co-circulam os 4 sorotipos de DENV, os sintomas da encefalite de St Louis podem ser facilmente confundidos com dengue ou outra arbovirose (MAIA *et al*, 2014). Grande parte das infecções causadas por SLEV são assintomáticas. Os sintomas clássicos são febre dor de cabeça, tosse, coriza, náuseas, vômito, diarreia e calafrios (GOULD; SOLOMON, 2008), sintomas semelhantes aos causados por outras flavivirose, podendo também causar doença grave com comprometimento do sistema nervoso central (SNC).

Entre os casos graves, a letalidade da encefalite de St. Louis pode chegar a 20%, relacionado principalmente com o dano ao SNC (DAY, 2001). Os mecanismos de acesso ao SNC e de patogênese ainda são desconhecidos (PASTORINO *et al*, 2010).

##### **1.4.2. Epidemiologia**

O SLEV foi isolado pela primeira vez em 1933 durante uma grande epidemia em St Louis, Missouri, EUA (BREDECK, 1933). Atualmente está amplamente distribuído nas Américas, do Canadá à Argentina (FIGUEIREDO, 2000). Nos EUA já foi o principal arbovírus, antes da introdução do WNV, tendo sido responsável por mais de 100 casos anuais de encefalite. Em 2010 foram confirmados 10 casos de

SLEV com oito casos que apresentaram neuroinvasão (MCCARTHY, 2001; OTTENDORFER *et al*, 2009; CDC, 2014)

No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez de um paciente humano suspeito de dengue, em São Pedro (SP) (ROCCO *et al*, 2005). Desde então outros casos foram reportados, mas sempre em pacientes suspeitos de dengue e até mesmo casos de infecção simultânea entre DENV- 3 e SLEV (MONDINI *et al*, 2007; TERZIAN *et al*, 2011), ainda sendo casos raros e pontuais.

Já foi descrito a circulação de cavalos soropositivos para SLEV no Brasil (SILVA *et al*, 2014), o que demonstra uma circulação silenciosa desse vírus no país, que provavelmente não está sendo detectado porque os exames de rotinas contra flavivírus são apenas para detecção de dengue.

A epidemiologia do SLEV ainda é desconhecida, precisando-se de mais estudos, principalmente no Brasil, onde o vírus pode emergir como um problema de saúde pública, visto que já foi comprovada a soroprevalência de anticorpos anti-SLEV em cavalos e humanos brasileiros (revisado por ROCCO *et al*, 2005; DIAZ *et al*, 2012; MAIA *et al*, 2014; SILVA *et al*, 2014).

## **1.5. Drogas antivirais**

Diferentemente dos antibióticos que podem ser altamente seletivos e específicos, visto que as bactérias se multiplicam independente da célula hospedeira, os vírus são patógenos intracelulares obrigatórios, o que dificulta a seletividade dos antivirais que na atualidade são poucos e com certo grau de citotoxicidade.

A história dos antivirais começa em 1977 com o desenvolvimento do aciclovir capaz de inibir a multiplicação dos herpesvírus sem comprometer o DNA celular. Nos anos 80 com o aumento dos casos de HIV, houve um grande número de grupos de pesquisadores tentando encontrar outras drogas capazes de inibir o ciclo do vírus sem comprometer o funcionamento da célula (revisado por ANTONELLI; TURRIZIANI, 2012).

O desenvolvimento de novas terapias antivirais requer conhecimento sobre o ciclo de multiplicação viral. Um alvo potencial para estratégias de intervenção é a via de penetração na célula infectada, assim como outras etapas do ciclo viral, ou até

mesmo proteínas produzidas durante a infecção viral (VAN DER SCHAAR *et al*, 2008; JULANDER *et al*, 2011).

Até 2012 havia 45 drogas aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso clínico como antiviral, mais da metade para tratamento do HIV e as outras para o tratamento de *Human herpes virus 1, 2, 3 5*, *Hepatitis B virus*, *Hepatitis C virus*, *Respiratory syncytial virus* e *Influenza virus* (ANTONELLI; TURRIZIANI, 2012). Essas drogas atuam em sítios específicos das etapas do ciclo de multiplicação, como adsorção (zintevir) e penetração (enfuvirtide), síntese de RNA ou DNA (zidovudine e aciclovir), ou até mesmo são direcionadas a outras enzimas virais (zanamivir) (De CLERCQ, 2002; De CLERCQ, 2004).

Julander (2013) cita o envelope viral como um bom alvo para o desenvolvimento de drogas antivirais voltadas a flavivírus, visto que bloquearia o ciclo de multiplicação na sua fase inicial, assim como NS3 e NS5, também seriam bons alvos antivirais, pois são proteínas não estruturais de suma importância para o ciclo de multiplicação desse gênero.

Em regiões endêmicas onde há co-circulação dos quatros sorotipos, é importante a avaliação da atividade antiviral de compostos contra todos os sorotipos de DENV para evitar o desenvolvimento de formas graves da doença (TALARICO *et al*, 2005).

Não há nenhuma droga antiviral em fase de testes clínicos contra YFV ou SLEV, mas contra dengue há uma droga chamada CELADEN, um alcaloide extraído de folha de *Castanospermum australe*, que se encontra em fase 1B de testes clínicos. Especula-se que seu mecanismo de ação seja na morfogênese viral (LOW *et al*, 2014).

### **1.5.1. Atividade antiviral de extratos vegetais**

Devido ao pouco ou nenhum efeito adverso oriundo do uso de plantas medicinais, a utilização destas para tratar muitas doenças está crescendo em todo o mundo (KADIR *et al*, 2013). Segundo a OMS (2013) em muitos países da Ásia e África aproximadamente 80% da população utiliza-se da medicina tradicional para os cuidados básicos com a saúde.

Desde 1978, quando foi realizada a Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde em Alma-Ata (Genebra), a Organização Mundial da Saúde

(OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) já demonstravam seu interesse em aliar a medicina tradicional com a medicina do sistema de saúde. Isso foi reafirmado em 1987 na Assembléia Mundial de Saúde onde foi recomendado aos estados-membros iniciar programas amplos relativos à identificação, avaliação, preparo, cultivo e conservação de plantas usadas em medicina tradicional, assegurando a qualidade das drogas derivadas de medicamentos tradicionais extraídas de plantas (MS, 2006).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de infecções virais sem dúvida tem sido amplamente baseado em evidências históricas e medicina tradicional (JASSIM; NAJI, 2013). Plantas e seus derivados permanecem sendo uma fonte importante para a descoberta e o desenvolvimento de novas drogas antivirais. Isso ocorre devido aos seus esperados baixos efeitos colaterais e à sua elevada acessibilidade na natureza, sendo amplamente aceito que os fitoquímicos são atóxicos quando usado em quantidades pequenas e manifestam uma ampla gama atividades biológicas (NAITHANI *et al*, 2008; KUMAR *et al*, 2012).

Segundo Kadir e colaboradores (2013) existem 31 espécies com potencial atividade contra o DENV. Muitas outras ainda não foram provadas cientificamente, apenas citadas por conhecimento popular.

Entre essas espécies encontram-se plantas, utilizando extratos de folhas, flores, caule, raízes e óleos essenciais (KADIR *et al*, 2013), assim como substâncias extraídas de algas como polissacarídeos sulfatados e carrageninas, que já foram descritas por inibir as etapas iniciais do ciclo de multiplicação do DENV, como adsorção e penetração (TALARICO *et al*, 2005; TALARICO, DAMONTE, 2007; PUJOL *et al*, 2012), conseguindo inibir até 100% dessa etapa do ciclo viral. Substâncias isoladas do metabolismo secundário de diversas plantas como castanospermina (WHITBY *et al*, 2005) e flavonoides (MUHAMAD *et al*, 2010; ZANDI *et al*, 2011a; ZANDI *et al*, 2011b; ZANDI *et al*, 2012; ) também já tiveram sua atividade antiviral contra DENV descritas, mas ainda não foram elucidados seus mecanismos de ação.

Alguns extratos e substâncias extraídas de plantas como extrato aquoso de *Houttuynia cordata* (LEARDKAMOLKARN *et al*, 2010), óleo essencial de *Colombian lippia* (OCAZIONEZ *et al*, 2010) e o extrato diclorometano de *Piper retrofractum* (KLAWIKKAN *et al*, 2011) têm uma potencial atividade antiviral a ser explorada, visto

que age diretamente sobre a partícula do vírus, tendo sido demonstrado nos trabalhos sua atividade contra DENV-2.

Plantas encontradas no Brasil como *Phyllanthus sp.*, *Distictella elongata* e *Arrabidaea pulchra* mostraram ter atividade antiviral promissora contra DENV quando testadas contra DENV-2 (SIMÕES *et al*, 2011; BRANDÃO *et al*, 2013; LEE *et al*, 2013;). Ainda não foi comprovado como essas plantas interferem no ciclo de multiplicação do vírus, mas Lee e colaboradores (2013) especulam que essas espécies de plantas, conhecidas no Brasil como “quebra-pedra”, interferem na adsorção, penetração, ou regulação de alguma proteína que interfiram na multiplicação viral.

Parida e colaboradores (2002) mostraram a atividade antiviral contra DENV-2 de uma planta de origem indiana, mas que é encontrada no Brasil, chamada *Azadirachta indica*. O extrato de diversas partes dessa planta também foi descrita por ter atividade larvicida (NOUR *et al*, 2012) e ovicida (MAHESWARAN, IGNACIMUTHU, 2012) contra o *A.aegypti*, principal vetor do vírus.

Não há nada na literatura sobre substâncias de origem natural ou sintéticas descritas como potenciais agentes antivirais contra SLEV. E contra YFV há também escassez de relatos sobre compostos antivirais de origem vegetal. Esimone e colaboradores (2007) descrevem em seu trabalho a atividade virucida de *Parmelia perlata* contra alguns vírus de RNA, incluindo o YFV, assim como Ono e colaboradores (2003) publicaram sobre a atividade anti-DENV-1 e anti-YFV de galactomananas extraídas de *Mimosa scabrella* e *Leucaena leucocephala*.

A pesquisa de compostos que apresentam atividade antiviral é realizada usando várias abordagens, inicialmente testando a toxicidade do extrato no sistema escolhido, seja ele *in vitro* ou *in vivo*, e desafiando o vírus com o extrato e analisando sua atividade antiviral por vários métodos, como ensaio de redução de placa ou método colorimétrico com MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) (GREEN *et al*, 2008). O MTT é um sal hidrossolúvel que é incorporado pelas mitocôndrias de células viáveis onde é reduzido pelas desidrogenases a sal de formazana. Este sal é armazenado no citoplasma celular e solubilizado após adição de dimetilsulfóxido (DMSO) ocorrendo formação de um produto de coloração roxa, cuja intensidade de cor é lida em espectrofotômetro a

540 nm. A absorvância obtida é diretamente proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

### 1.6. *Maytenus imbricata*

A espécie *Maytenus imbricata* (figura 8) pertence ao gênero *Maytenus*, família Celastraceae, que contém espécies que habitam áreas tropicais e subtropicais do mundo, tendo a espécie *M. imbricata* distribuição ampla em todo território brasileiro, sendo nativa e endêmica do Brasil (SIMMONS *et al.*, 2008; LOMBARDI *et al.*, 2014). Essa espécie é encontrada em áreas de cerrado e caatinga dos estados de Minas Gerais, Bahia e Pernambuco, apresentando-se na forma de arbusto ou subarbusto (LOMBARDI *et al.*, 2014), tendo sua descrição botânica realizada há apenas 20 anos (RODRIGUES *et al.*, 2011).



Figura 8: **Fotografia de raízes, folhas e frutos de *Maytenus imbricata*** (RODRIGUES, 2011)

O gênero *Maytenus* é usado popularmente pela sua variada atividade biológica incluindo anti-inflamatória, antiasmático, doenças gástricas, antitumoral, antimicrobiana, atividade antiprotozoária (revisado por RODRIGUES, 2011; MOMTAZ *et al.*, 2013). Kohn e colaboradores (2012) demonstraram o efeito antiviral *in vitro* de *Maytenus ilicifolia* contra *Bovine herpes virus 5* (BHV-5). Em 2013 a atividade antiprotozoária contra *Leishmania sp.*, também do extrato de *M. ilicifolia*,

mostrou resultados significativos, sugerindo que essa espécie tem um potencial para desenvolvimento de novas drogas contra leishmaniose (dos SANTOS *et al*, 2013).

Outras espécies de *Maytenus* também têm mostrado atividade anti-HIV (*Human immunodeficiency virus*). Estudos de 1999 já apontavam o potencial de biomoléculas encontradas nesse gênero contra protease do HIV (HUSSEIN *et al*, 1999), assim como Rukunga e colaboradores (1992) demonstraram que extratos de raízes da espécie *M. senegalensis* inibe 99,83% da atividade da transcriptase reversa do HIV.

Trabalhos recentes apontam uma gama de atividades biológicas de extratos extraídos de raízes de *Maytenus imbricata*, como efeito antinociceptivo (VELOSO *et al*, 2014), inibição de acetilcolinesterase (RODRIGUES *et al*, 2014) e atividade antimicrobiana (RODRIGUES *et al*, 2012), sendo que a espécie em questão ainda não teve sua atividade contra vírus avaliada.

Rodrigues e colaboradores (2012) isolaram triterpenos pentacíclicos de extratos de raízes de *M. imbricata*, sendo esta da mesma classe de metabólito secundário que foi isolada de folhas de *Syzigium claviflorum* e impediu a maturação do HIV (FUJIOKA, KASHIWADA, 1994). Atualmente esse triterpeno é produzido comercialmente com o nome de BEVIRIMAT (*Panacos Pharmaceuticals*) e encontra-se em fase de testes clínicos (SMITH *et al*, 2007), e muitos derivados também estão sendo testados contra o HIV no intuito de melhorar sua eficiência (CORIC, *et al*, 2013).

Muito pouco foi descrito para essa espécie até agora, necessitando de mais estudo fitoquímicos para isolamento dos seus princípios ativos e, posterior análise das suas atividades biológicas.

## 2. JUSTIFICATIVA

Desde o início do século XXI a dengue tem sido a arbovirose mais importante em seres humanos tendo sido responsável por grandes epidemias nos trópicos, desde o século XVII (GUBLER, 2001), e assim como a febre amarela, ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais onde mais de 2,5 bilhões de pessoas correm o risco de infecção (OMS, 2013b).

O DENV, YFV e SLEV causam doença grave, sendo o único método atual de controlar ou prevenir a transmissão desses arbovírus é combater eficazmente os mosquitos vetores, uma vez que, há vacina apenas contra febre amarela e não há drogas antivirais aprovadas para o tratamento de pacientes humanos contra nenhuma doença causada por esses vírus (OMS, 2009; JULANDER *et al*, 2011). O tratamento consiste em hidratação e emprego de antitérmicos (OMS, 2009; PUJOL *et al*, 2012).

Com presença de YFV, a emergência de SLEV e a rápida expansão da dengue nos países tropicais e subtropicais, as pesquisas para desenvolvimento de uma vacina e drogas antivirais efetivas são cruciais para a contenção dessas arboviroses (TANG *et al*, 2012). Nesse contexto, a *M. imbricata* se apresenta como uma planta nativa do Brasil e que não teve sua atividade antiviral estudada podendo apresentar grande potencial para o desenvolvimento de um medicamento antiviral capaz de tratar essas arboviroses.

Atualmente, 12 medicamentos fitoterápicos são disponibilizados na rede pública de saúde no Brasil e autorizados pela ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) para dores, inflamações, disfunções e outras doenças de baixa gravidade, não havendo nenhum com atividade antiviral relatada (MS, 2013a). Além disso, ainda não existem medicamentos antivirais sendo testados contra a maioria do flavivírus em qualquer fase de ensaios clínicos (TANG *et al*, 2012), apenas contra dengue (LOW *et al*, 2014).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais (MS, 2006), possuindo então potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas que resultarão no descobrimento de novos fitoterápicos, eficazes, principalmente contra doenças que são problema de saúde pública, como a dengue e a febre amarela. E apesar de muitos grupos

estudarem possíveis drogas antivirais contra dengue, SLEV e YFV carecem de pesquisas nessa área.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

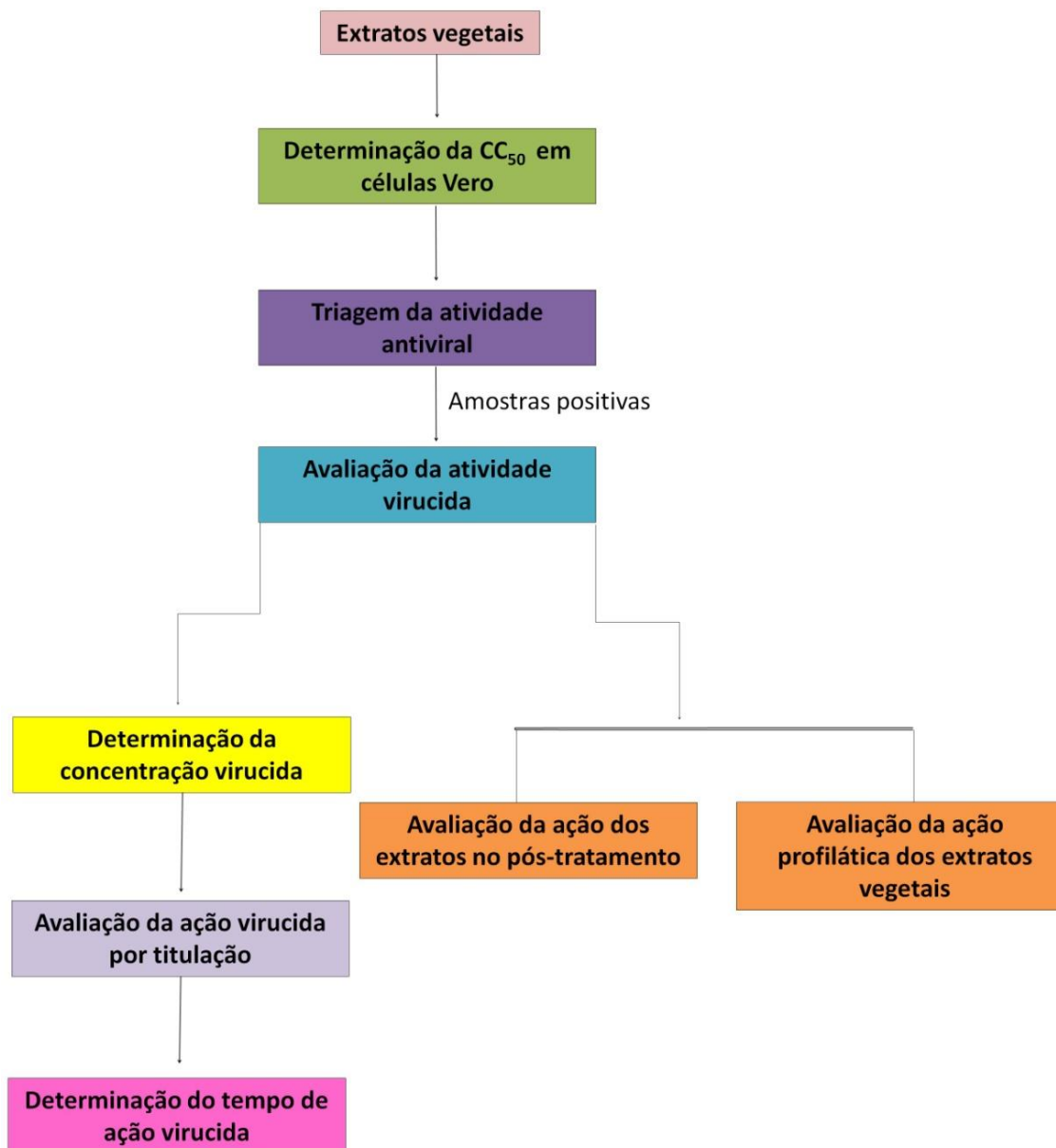
Avaliar a atividade antiviral de extratos FSEAT, SEM e SEAT de *Maytenus imbricata*, *in vitro* contra flavivírus.

#### **3.2. Específicos**

1. Avaliar a atividade antiviral dos extratos de *M. imbricata* contra *Dengue virus 4* (DENV-4), *Yellow Fever Virus* (YFV) e *St. Louis encephalitis virus* (SLEV).
1. Determinar a atividade virucida de extratos de *M. imbricata* contra *Dengue virus 4* (DENV-4), *Yellow Fever Virus* (YFV) e *St. Louis encephalitis virus* (SLEV).
2. Avaliar a capacidade dos extratos de *M. imbricata* de induzir estado antiviral contra flavivírus em células Vero
3. Avaliar a ação dos extratos de *M. imbricata* na etapa pós-infecção de flavivírus
4. Avaliar a especificidade da atividade antiviral dos extratos de *M. imbricata* contra flavivírus.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Estratégia de trabalho



### 4.2. Extratos de *Maytenus imbricata*

Os extratos das raízes de *M. imbricata* foram preparados e cedidos pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, tendo sua metodologia de coleta e preparo descrita por Rodrigues e colaboradores (2012).

Após a secagem e moagem em moinho de martelos, obteve-se 1,5 kg de raízes da planta. A amostra foi submetida a extrações exaustivas em aparelho Soxhlet, com solventes em ordem crescente de polaridade: Hex-Et<sub>2</sub>O (hexânico-éter etílico-1:1), AcOEt (acetato de etila) e MeOH (metanol). Após filtração e remoção do solvente por destilação a pressão reduzida, foram obtidos os respectivos sólidos e extratos: SEAT, FSEAT e SEM.

Os materiais testes foram pesados em balança analítica e diluídos em DMSO 100% (Sigma) para concentração final de 10 mg/mL. Os tubos foram armazenados a 4°C até a realização dos ensaios.

### **4.3. Culturas celulares**

#### **Células C6/36**

As células C6/36 são derivadas de larvas do mosquito *Aedes albopictus* e foram cultivadas em meio L15 suplementado com 7% SFB contendo gentamicina (50 µg/mL), penicilina (100 UI/mL) e anfotericina B (5 µg/mL), em estufa incubadora B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio) a 28 °C. Estas células foram utilizadas na produção do estoque viral de DENV-4.

#### **Células Vero**

Para preparação dos estoques virais de SLEV e YVF e realização dos experimentos foram utilizadas células Vero, que são culturas contínuas de rim de macaco verde Africano (*Cercopithecus aethiops*). As células foram cultivadas em meio MEM suplementado com 5% SFB contendo gentamicina (50 µg/mL), penicilina (100 UI/mL) e anfotericina B (5 µg/mL), em estufa CO<sub>2</sub> a 37°C.

### **4.4. Vírus**

#### **4.4.1. Estoque viral**

O DENV-4 utilizado foi obtido a partir de amostra clínica de Boa Vista cedida pelo Dr. Mauricio Nogueira. O vírus foi amplificado em células C6/36 e titulado em célula Vero.

O Virus da Febre Amarela utilizado foi a linhagem vacinal 17D, tendo sido multiplicado e titulado em células Vero.

Os estoques virais de SLEV-Be-H355964 são de amostra clínica, e foram cedidas pela Dr. Mauricio Nogueira. O vírus foi multiplicado e titulado em células Vero.

#### **4.4.2 Multiplicação viral DENV-4**

Frascos de cultura de células de 75 cm<sup>2</sup>, com monocamada de aproximadamente 80% de confluência, foram preparados 24 horas antes, sendo então infectados com multiplicidade de infecção (moi) de 0,01 do estoque viral de vírus semente de DENV-4. A adsorção foi realizada por 1h30min, em estufa incubadora B.O.D, sendo as garrafas homogeneizadas a cada 10 minutos. Após o tempo de adsorção foi adicionado 12 mL de meio L15 suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) nas garrafas e as mesmas foram incubadas em estufa incubadora B.O.D. a 28°C, sendo observadas diariamente em microscópio óptico para observação da formação de efeito citopático característico: formações de sincícios. Após a visualização do efeito citopático em aproximadamente 90% das células, o meio das garrafas foi centrifugado por 5 min., a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado em tubos estéreis, congelado a -70°C e, posteriormente, titulado.

#### **4.4.3 Multiplicação viral de SLEV e YFV**

Frascos de cultura de células de 150 cm<sup>2</sup>, com monocamada de aproximadamente 90% de confluência, foram preparados 24 horas antes, sendo então infectados com moi de 0,01 do estoque viral semente SLEV ou YFV. A adsorção foi feita por 1h, sendo as garrafas homogeneizadas a cada 10 minutos. Após o tempo de adsorção foi adicionado 25 mL de meio MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) nas garrafas e as mesmas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, sendo observadas diariamente. Após 3 dias, o meio das garrafas foi coletado e centrifugado por 5 min., a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado em tubos estéreis, congelado a -70°C e, posteriormente, titulado.

#### **4.4.4. Titulação viral**

Células Vero foram cultivadas em placas de 6 poços ( $2 \times 10^5$  células/poços) e incubadas a 37°C por 24h. Essas placas foram infectadas com 400µL de diluições seriadas do vírus na base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ). Após 1h de adsorção a 37°C, com homogeneização das placas a cada 15 minutos, o meio foi desprezado e foi adicionado 3 mL de meio 199 suplementado com antibióticos e 2% de SFB, contendo 1,5 % de carboximetilcelulose (CMC). As placas foram incubadas por 7 (DENV-4), 5 (SLEV) ou 6 (YFV) dias em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> e, após esse tempo, as placas foram fixadas com formol 10% *overnight* seguido por coloração com cristal violeta 1% por 20 minutos. Após esse tempo as placas foram lavadas e colocadas para secar, sendo contadas a olho nu as placas de lise formadas. Foram contadas as placas obtidas no poço contendo a diluição do vírus que apresenta entre 50 a 100 placas de lise, sendo o título viral expresso em unidades formadoras de placas por mL (UFP/mL).

O título foi calculado pela fórmula  $T = \text{NPL} \times \text{ID} \times V$ , onde T corresponde ao título viral; NPL ao número de placas de lise; ID ao inverso da diluição em que foram contadas as placas; V ao volume utilizado para adsorção corrigido para mL.

#### **4.5. Confirmação da espécie viral**

##### **4.5.1. Extração de RNA**

A extração do RNA viral foi feita utilizando o kit de extração QIAampR Viral RNA (Valencia Inc.) seguindo-se as instruções do fabricante. Resumidamente, 140µL da amostra (sobrenadante ou monocamada celular) foram adicionados a 560µL do tampão AVL (acrescido do carreador de RNA), incubado a temperatura ambiente por 10min e então foram adicionados 560µL de etanol absoluto. A solução foi homogeneizada, aplicada o volume total da amostra (em duas vezes de 630µL) a coluna de sílica que foi centrifugada. Foram feitas duas lavagens com os tampões AW1 e AW2 para retirada de outros componentes celulares e possíveis resíduos. O RNA viral foi eluído com 60µL de tampão AVE e armazenado a -80°C. O RNA extraído serviu de molde para a síntese de cDNA para detecção de RNA viral e RNA intermediário.

#### 4.5.2. Produção de DNA complementar

Para a produção de DNA complementar (cDNA), 5µl de RNA extraído foi incubado a 70 °C, por 5 minutos, juntamente com 2 µL do oligonucleotídeo iniciador senso (2F-5mM). Após incubação no gelo, foram adicionados à reação: 5 µl de tampão de RT-PCR 5X (250 mM Tris pH 8.9, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 375mM KCl, 50mM DTT), 1,5 µl de dNTPs (10mM), 0,5 µl (20U) de RNAsin (ribonuclease inhibitor-Promega) e 1 µl (200U) de enzima M-MLV RT (200U/µl) (Promega Corporation-EUA), para um volume total de 25µL. Essa mistura foi incubada por 60 minutos à 37°C. Os cDNAs obtidos foram, então, submetidos à amplificação por qPCR.

#### 4.5.3 Detecção de RNA viral

Para confirmação da espécie viral a estratégia utilizada foi PCR em tempo real (qPCR) com iniciadores específicos para DENV-4 e qPCR com iniciadores desenhados para a detecção de membros do gênero *Flavivirus* seguida de sequenciamento para SLEV e YFV.

Para o qPCR, foram utilizados iniciadores descritos na Tabela 1 e foi utilizado o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), iniciadores específicos (4 mM de cada), 1µl de amostra e água totalizando 10µl de reação. As condições térmicas utilizadas para a amplificação foram as especificadas pelo programa padrão da máquina StepOne (Applied Biosystems, EUA), com temperatura de pareamento de 60°C.

**TABELA 1:** Sequência dos nucleotídeos utilizados na qPCR.

Vírus	Região	Sequência (5' - 3')
<b>DENV-4 (VILELA, 2015-dados não publicados)</b>	5'UTR	TCGGAAGCTTGCTTAACACA
		TTCGTTGGTTCATTTTTCCAG
<b>Flavivirus (CHAO et al, 2006)</b>	NS5	TACAACATGATGGGAAAGCGAGAGAAAA
		GTGTCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC

#### 4.5.4. Sequenciamento nucleotídico

Para determinação das sequências dos vírus SLEV e YFV o produto de PCR amplificado foi utilizado para obtenção das sequências em sequenciador automático modelo ABI 377 (Applied Biosystems) empregando o método de terminação de cadeia descrito por Sanger e colaboradores (1977).

Na reação de sequenciamento foram utilizados 2 µL do produto de PCR e 3,2 pmoles de oligonucleotídeos, ajustados com água livre de RNase e DNase para um volume final de 6,5µL e obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

#### 4.5.5. Alinhamento das sequências nucleotídicas

Para cada fragmento foram feitas duas reações de sequenciamento. As sequências obtidas foram sobrepostas e a obtenção do consenso foi feita utilizando a plataforma Asparagin-Cenargen (EMBRAPA, 2014). As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” através do programa BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- Basic Local Alignment Tool) (ALTSUCHL *et al*, 1990). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelo programa BLASTN.

#### 4.6. Avaliação da citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) em Vero

O ensaio colorimétrico com MTT posposto por Mosmann (1983) foi utilizado para testar a citotoxicidade dos extratos sobre a linhagem celular Vero.

Placas de 96 poços contendo  $2 \times 10^4$  células/poços foram preparadas e incubadas a 37°C por 24h (100 µL/poço). Foram preparadas diluições seriadas da amostra em meio MEM contendo 2% de SFB, utilizando o DMSO (diluyente das amostras) como controle. Foi então removido o meio das placas de células e 100 µL das diluições das amostras e 100 µL de meio MEM 2% SFB foi adicionado aos poços simultaneamente. As placas foram incubadas por 48 horas em estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C. O meio foi, então, removido e foram adicionados 28 µL de uma solução de MTT (2mg/mL) aos poços, que foram incubadas por 90 minutos. Foram adicionados aos poços 130 µL de DMSO, seguida de agitação das

mesmas em um agitador de placas por 15 min. e posterior leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores obtidos da absorbância das amostras foram comparados com os valores obtidos para o controle celular. A concentração de cada material testado que reduzir 50% da viabilidade celular é o valor de  $CC_{50}$  e foi obtido por análise de regressão linear referente às diferentes concentrações do material teste, considerando a equação da reta adequada quando o valor de  $R^2$  for igual ou superior a 0,95.

#### **4.7. Avaliação da atividade antiviral - MTT**

A triagem da atividade antiviral das amostras foi feita pelo método de MTT (MOSMANN, 1983), sendo avaliadas concentrações não citotóxicas das amostras, partindo da  $CC_{50}$ .

Células foram cultivadas em placas de 96 poços ( $2 \times 10^4$  células/poços) em meio MEM 5% SFB. Após 24 horas de incubação, a  $37^\circ\text{C}$ , o meio de cultura foi removido e 100  $\mu\text{l}$  das diluições das amostras feitas em meio MEM com 2% de SFB, foram adicionados em cada poço, juntamente com 100  $\mu\text{l}$  da suspensão viral do DENV-2 com  $\text{moi}$  de 1, também preparado com meio MEM com 2% de SFB. Em seguida, as culturas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ , por 72 horas. Após o tempo previsto, foi feita a coloração por MTT como descrito no item 4.5.

A concentração eficaz, isto é, a concentração efetiva a 50% ( $CE_{50}$ ), é expressa como a concentração que protege 50% das células tratadas do efeito citopático causado pelo vírus, também sendo calculada por regressão linear.

Com os valores de  $CC_{50}$  e  $CE_{50}$  calculou-se o Índice de seletividade ( $IS = CC_{50}/CE_{50}$ ) de cada amostra. Amostras que apresentaram um índice de seletividade ( $IS$ )  $\geq 4$  foram consideradas com atividade antiviral e quanto maior esse valor, mais promissor é considerado o extrato (AMOROS *et al*, 1992). Os extratos positivos foram submetidos a outros ensaios para detecção da sua ação nas etapas do ciclo de multiplicação viral.

#### **4.8. Avaliação da atividade virucida- ensaio de placa**

Células Vero foram cultivadas em placas de 6 poços ( $2 \times 10^5$  células/poço) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24h. Os extratos na sua  $CC_{50}$  foram incubados com os vírus

por 1h a 37°C, usando como controle o vírus incubado apenas com meio e o vírus incubado com DMSO 100%, diluente das amostras, em um volume final de 100µL. Essas amostras foram então diluídas seriadamente na base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) e então 400µL foram plaqueadas por poço. Após 1h de adsorção a 37°C, com homogeneização das placas a cada 10 minutos, o meio foi desprezado e foi adicionado 3 mL de meio 199 suplementado com antibióticos e 2% de SFB, contendo 1,5 % de carboximetilcelulose (CMC). As placas foram incubadas entre 5 a 7 dias (dependendo do vírus) em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> e, após esse tempo, as placas foram fixadas com formol 10% *overnight* seguido por coloração com cristal violeta 1% por 20 minutos. Após esse tempo as placas foram lavadas e colocadas para secar, sendo contadas a olho nu as placas de lise formadas. O título foi determinado como descrito no item 4.4.4

#### **4.9. Determinação da concentração virucida- CV<sub>50</sub>**

Para avaliação da ação dos extratos vegetais diretamente sobre as partículas virais, placas de 24 poços com  $7 \times 10^4$  células/poço de VERO foram preparadas e incubadas a 37°C por 24h. Diluições seriadas das amostras, partindo da CC<sub>50</sub>, foram feitas em placas de 24 poços, totalizando sete diluições. Foram adicionadas às amostras diluídas 60 UFP/poço de DENV-4, SLEV ou YFV, totalizando 200µL. A solução foi incubada por 1h a 37°C. Em seguida, foi feita a adsorção dos vírus por 1h a 37°C nas monocamadas celulares. Posteriormente uma solução de CMC (Synth) 1,5% em meio 199 2% SFB foi adicionada às mesmas. Após incubação entre 5 a 7 dias seguiu fixação e coloração como descrito no item 4.4.3.

O cálculo do valor de CV<sub>50</sub> foi feito utilizando a seguinte fórmula:  $\% I = (1 - [NP_{mt} / NP_{cv}]) \times 100$ , onde %I corresponde a porcentagem de inibição da infecção viral; NP<sub>mt</sub> ao número de placas em células tratadas com extratos teste; NP<sub>cv</sub> ao número de placas em células infectadas mas não tratadas com extratos teste.

Em seguida, os percentuais encontrados foram analisados por regressão linear e então foi possível a determinação dos valores de CV<sub>50</sub>, e então obter os valores de IS (CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>) para cada amostra.

#### **4.10. Avaliação do tempo de ação virucida- ensaio de placa**

Células Vero foram cultivadas em placas de 6 poços ( $2 \times 10^5$  células/poços) e incubadas a 37°C por 24h. Os extratos na concentração de  $CC_{50}$  foram incubados com os vírus por 5, 15, 30 min e 1h a 37°C, usando como controle o vírus incubado apenas com meio, em um volume final de 100µL. Essas amostras foram então diluídas seriadamente na base 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) e então plaqueadas. Após 1h de adsorção a 37°C, com homogeneização das placas a cada 10 minutos, o meio foi desprezado e foi adicionado 3 mL de meio 199 suplementado com antibióticos e 2% de SFB, contendo 1,5 % de carboximetilcelulose (CMC). As placas foram incubadas entre 5 a 7 dias em estufa contendo 5% de  $CO_2$  e, após esse tempo, as placas foram fixadas com formol 10% *overnight* seguido por coloração com cristal violeta 1% por 20 minutos. Após esse tempo as placas foram lavadas e colocadas para secar, sendo contadas a olho nu as placas de lise formadas. O título foi determinado como descrito no item 4.4.4.

#### **4.11. Avaliação da ação profilática dos extratos vegetais - pré-tratamento**

Células Vero ( $7 \times 10^4$ /poço) foram cultivadas em placas de 24 poços, preparadas 24h antes da utilização. Em seguida o meio foi retirado das placas e foi adicionado 200µL de meio de cultura contendo diluições seriadas de extratos partindo da  $CC_{50}$ , ficando em contato com as células por 1h e 20h a 37°C. Decorrido esse tempo, o meio foi retirado e aos poços foram adicionados 400µL de meio contendo 60 UFP de DENV-4, SLEV ou YFV. Células não tratadas foram infectadas com vírus como controle da infecção.

Após 1h de adsorção a 37°C, com homogeneização das placas a cada 15 minutos, o meio foi desprezado e foi adicionado 1 mL de meio 199 suplementado com antibióticos e 2% de SFB, contendo 1,5 % de CMC. Após incubação de 5 a 7 dias seguiu-se fixação e coloração como descrito no item 4.4.3.

O cálculo de  $CE_{50}$  para pré-tratamento foi realizado como descrito no item 4.6, sendo possível obter os valores de IS para todas as amostras testadas.

#### 4.12. Pós-tratamento

Células Vero ( $7 \times 10^4$ /poço) foram cultivadas em placas de 24 poços, preparadas 24h antes da utilização. O meio foi retirado das placas e foram adicionados aos poços 150 $\mu$ L de meio de cultura contendo 60 UFP de DENV-2. A adsorção foi feita por 1h a 37°C. Em seguida o meio foi descartado e aos poços foram adicionadas diluições seriadas dos extratos partindo da CC<sub>50</sub>, no volume de 150 $\mu$ L. Células não tratadas foram infectadas com vírus como controle viral. Após 1h a 37°C, o meio foi desprezado e foi adicionado 1 mL de meio 199 suplementado com antibióticos e 2% de SFB, contendo 1,5% de carboximetilcelulose (CMC). Após incubação entre 5 a 7 dias, seguiu-se a fixação e coloração como descrito no item 4.4.3.

O cálculo de CE<sub>50</sub> para pós-tratamento foi realizado como descrito no item 4.6, sendo possível obter os valores de IS para todas as amostras testadas.

#### 4.13. Avaliação da especificidade da atividade antiviral dos extratos de *M. imbricata* contra flavivírus.

Utilizando-se a técnica de MTT, outros vírus foram desafiados com os extratos de *M. imbricata*. Entre os vírus testados estão representantes de DNA e RNA, envelopados ou não (TABELA 2) para avaliar se avaliar a especificidade da ação antiviral contra flavivírus.

**Tabela 2:** Vírus testados com extratos de *M. imbricata*

	Família	Genoma	Envelopado
<b><i>Apeu virus</i> (APEUV)</b>	<i>Bunyaviridae</i>	Segmentado ssRNA	Sim
<b><i>Encephalomyocarditis virus</i> (EMC)</b>	<i>Picornaviridae</i>	ssRNA+	Não
<b><i>Itaqui virus</i> (ITQV)</b>	<i>Bunyaviridae</i>	Segmentado ssRNA	Sim
<b><i>Human herpesvirus 1</i> (HHV1)</b>	<i>Herpesviridae</i>	dsDNA	Sim
<b><i>Vaccinia virus</i> (VACV-WR)</b>	<i>Poxviridae</i>	dsDNA	Sim
<b><i>Vesicular stomatitis Indiana virus</i> (VSV)</b>	<i>Rhabdoviridae</i>	ssRNA-	Sim

## 5. RESULTADOS

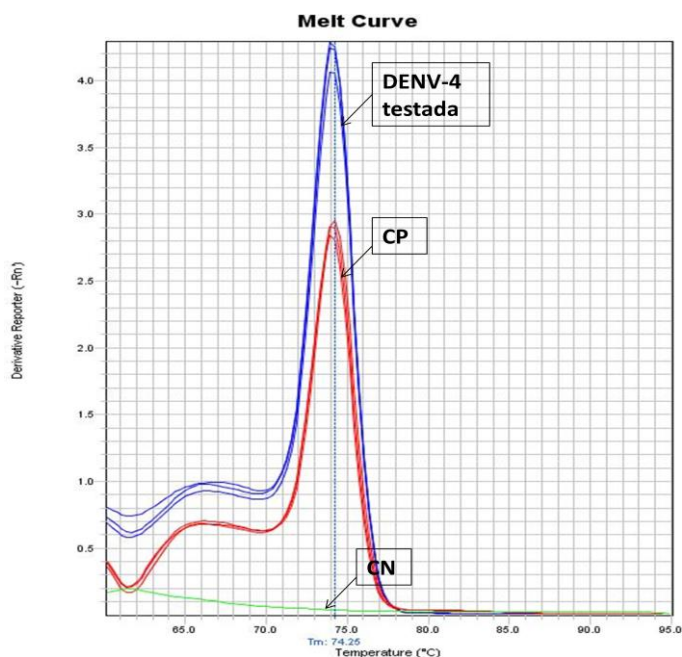
### 5.1. Titulação e confirmação das espécies virais

Após multiplicação e titulação dos vírus, os títulos obtidos estão discriminados abaixo foram de  $3 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  UFP/mL (TABELA 3):

**TABELA 3:** Título dos estoques virais em células Vero.

Vírus	Título viral (UFP/mL)
DENV-4	$5 \times 10^6$
SLEV	$3,5 \times 10^6$
YFV	$3 \times 10^6$

Com a utilização de iniciadores específicos para DENV-4, pode ser comprovada a espécie viral por qPCR, pois a temperatura de dissociação ( $T_m$ ),  $74,25^\circ\text{C}$ , na curva para a amostra testada de DENV-4 e o controle positivo de DENV-4 (RNA de mosquito infectado com DENV-4) foram as mesmas (figura 9).



**FIGURA 9:** Curva de dissociação para a amplificação de DENV-4 – O cDNA, obtido após transcrição reversa de RNA extraído de DENV-4 e de amostra controle, foi amplificado por qPCR, empregando iniciadores para região 5'UTR.

As sequências de nucleotídeos geradas no sequenciamento foram analisadas pelo programa BLASTN, onde se pode então constatar que o SLEV utilizado no trabalho apresenta 99% de identidade com outros isolados dessa espécie, inclusive com isolado brasileiro original desse estoque viral SLEV-Be-H355964, confirmando assim a espécie viral (ANEXO 1).

O estoque viral de YFV é procedente da vacina atenuada 17D depois de passagens em células Vero, e apresentou 98% de identidade com outros isolados também de origem vacinal, demonstrando assim a autenticidade do estoque viral (ANEXO 2).

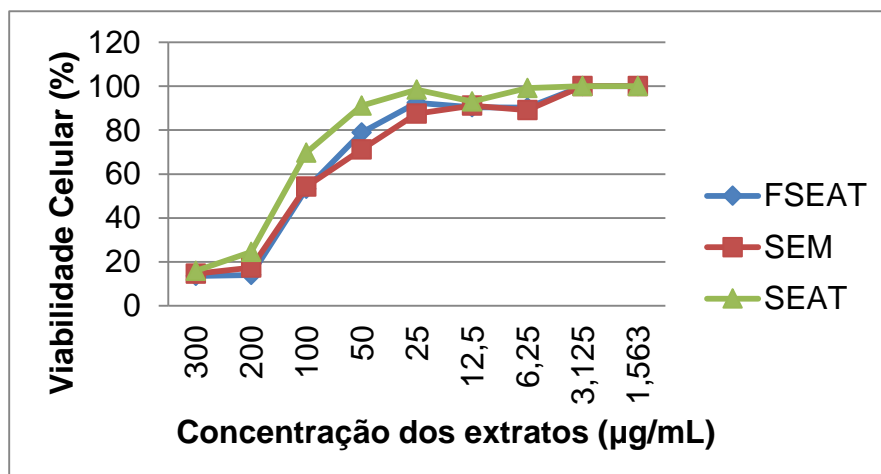
## 5.2. Avaliação da citotoxicidade dos extratos

Com o intuito de estabelecer a dose citotóxica em células Vero, foram testadas as concentrações dos extratos que variavam de 1,56 µg/mL a 300 µg/mL e incubadas com as células por 48h. A CC<sub>50</sub> obtida por análise de regressão linear referente às diferentes concentrações do material teste nas células tratadas em comparação às células não tratadas foi de 90,44±1,52 para FSEAT, 86,35±6,85 para SEM e 116,85±3,97 para SEAT (TABELA 4).

**TABELA 4:** Concentração citotóxica em 50% das células Vero após 48h.

Extratos	CC <sub>50</sub> (µg/mL ± desvio padrão)
FSEAT	90,44±1,52
SEM	86,35±6,85
SEAT	116,85±3,97

A redução da viabilidade celular promovida por todos os extratos avaliados mostrou-se concentração – dependente, sendo que na concentração de 300 µg/mL a citotoxicidade foi máxima e em 6µg/mL não houve nenhuma toxicidade significativa para todas as amostras (figura 10).



**FIGURA 10:** Viabilidade celular após tratamento com extratos de *M. imbricata* é concentração-dependente. Células Vero foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos e incubadas por 48h.

### 5.3. Avaliação da atividade antiviral dos extratos empregando a técnica colorimétrica

A triagem inicial dos extratos foi feita pela técnica colorimétrica empregando MTT, onde foram testadas oito diluições seriadas de cada extrato a partir da  $CC_{50}$ . A concentração eficaz foi calculada por regressão linear, isto é, a concentração efetiva a 50% ( $CE_{50}$ ) é expressa como a concentração que protege 50% das células tratadas dos efeitos causados pela infecção viral. Com os valores de  $CC_{50}$  e  $CE_{50}$ , os índices de seletividade foram calculados para cada amostra (TABELA 5).

**TABELA 5:** Avaliação da atividade antiviral por método colorimétrico.

Vírus	Extrato	$CE_{50}$ (µg/mL ± desvio padrão)	IS
DENV-4	FSEAT	10,02± 3,6	9,02
	SEM	11,25± 2,89	7,67
	SEAT	11,32± 3,71	10,32
SLEV	FSEAT	23,62±0,92	3,82
	SEM	19,19±4,88	4,49
	SEAT	16,99±1,86	6,87

YFV	FSEAT	14,80±1,26	6,11
	SEM	15,98±2,83	5,4
	SEAT	14,06±1,06	8,31

Contra DENV-4 os extratos apresentaram IS que variam de 7,67 a 10,32, tendo o extrato SEAT o maior IS encontrado, 10,32. Contra SLEV os extratos apresentaram IS que variou de 3,82 a 6,87, tendo o extrato SEAT o melhor IS observado (6,87). Quando os extratos foram testados contra YFV, apresentaram os melhores valores de IS sendo 6,11 para FSEAT; 5,4 para SEM; e 8,31 para SEAT.

Segundo a definição de Amoros e colaboradores (1992) as amostras que apresentarem um índice de seletividade (IS)  $\geq 4$  são consideradas com atividade antiviral. Todos os extratos testados contra DENV-4, SLEV e YFV apresentaram atividade antiviral, exceto a amostra FSEAT quando testada contra SLEV (IS= 3,82). Mas apesar da sua baixa atividade antiviral, ela foi utilizada em experimentos posteriores.

#### 5.4. Avaliação da atividade virucida

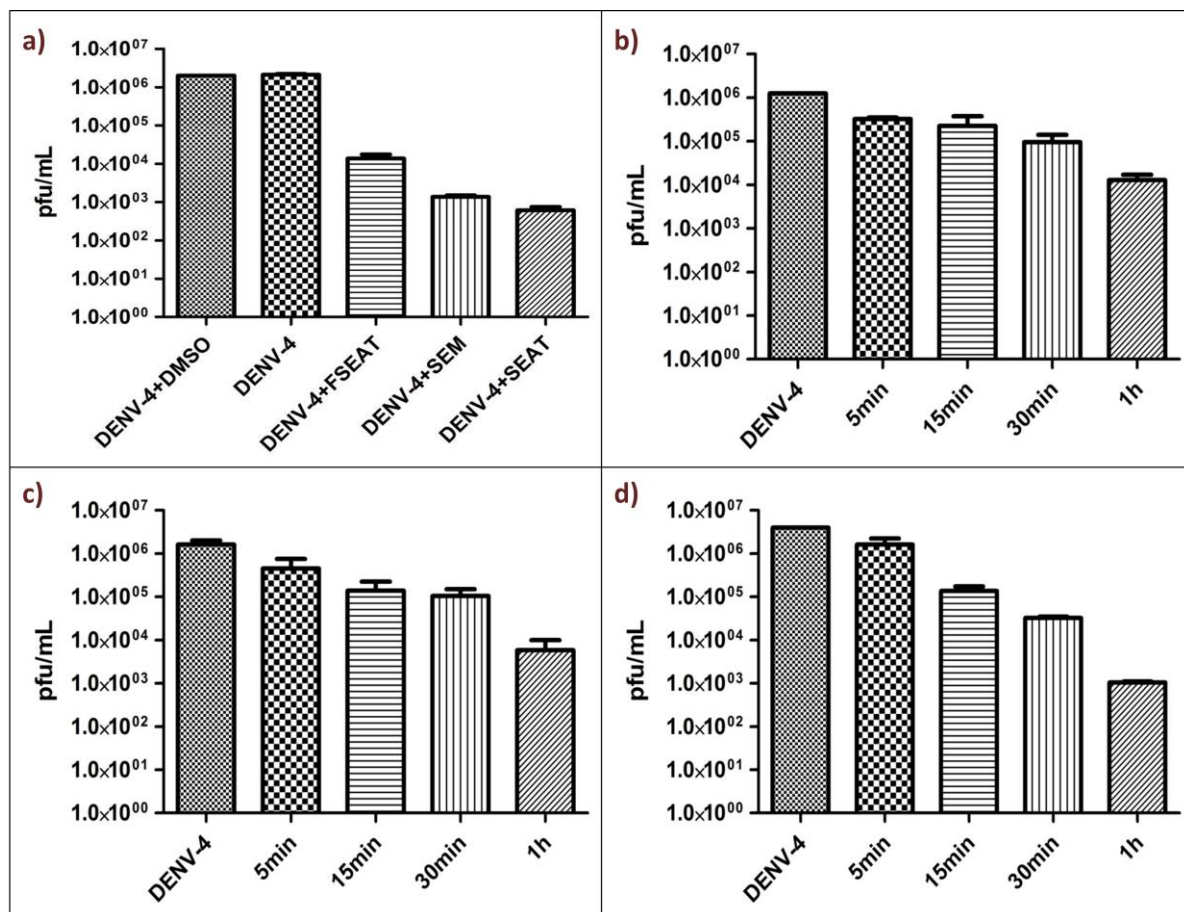
Foi avaliada a ação dos extratos com um potencial virucida pelo método ensaio de placa. Como todos os extratos apresentavam potencial atividade virucida com uma hora de incubação, eles foram submetidos à variação do tempo de ação. Foram testados tempos de 5min, 15min, 30 min, 1h de incubação vírus com extrato.

Como o diluente dos extratos, quando liofilizados, é o DMSO, ele foi utilizado como controle no experimento virucida na mesma quantidade utilizada dos extratos de *M.imbricata*, não apresentando qualquer diferença entre o controle viral tratado com DMSO e controle viral não tratado, demonstrando assim que a ação virucida encontrada deve-se a substâncias ativas nas amostras em questão.

##### 5.4.1. DENV-4

Os extratos de *M. imbricata* em contato com o DENV-4 durante uma hora apresentaram uma diminuição de 3 log<sub>10</sub> no título viral quando o vírus foi tratado com o extrato SEAT, mas com uma redução menor mas também significativa dos

extratos FSEAT (2 log<sub>10</sub> de redução) e SEM ( 2,5 log<sub>10</sub> de redução). Não foi observada diferença no título viral em presença do diluente dos extratos, DMSO, e o controle viral de DENV-4 (figura 11a).

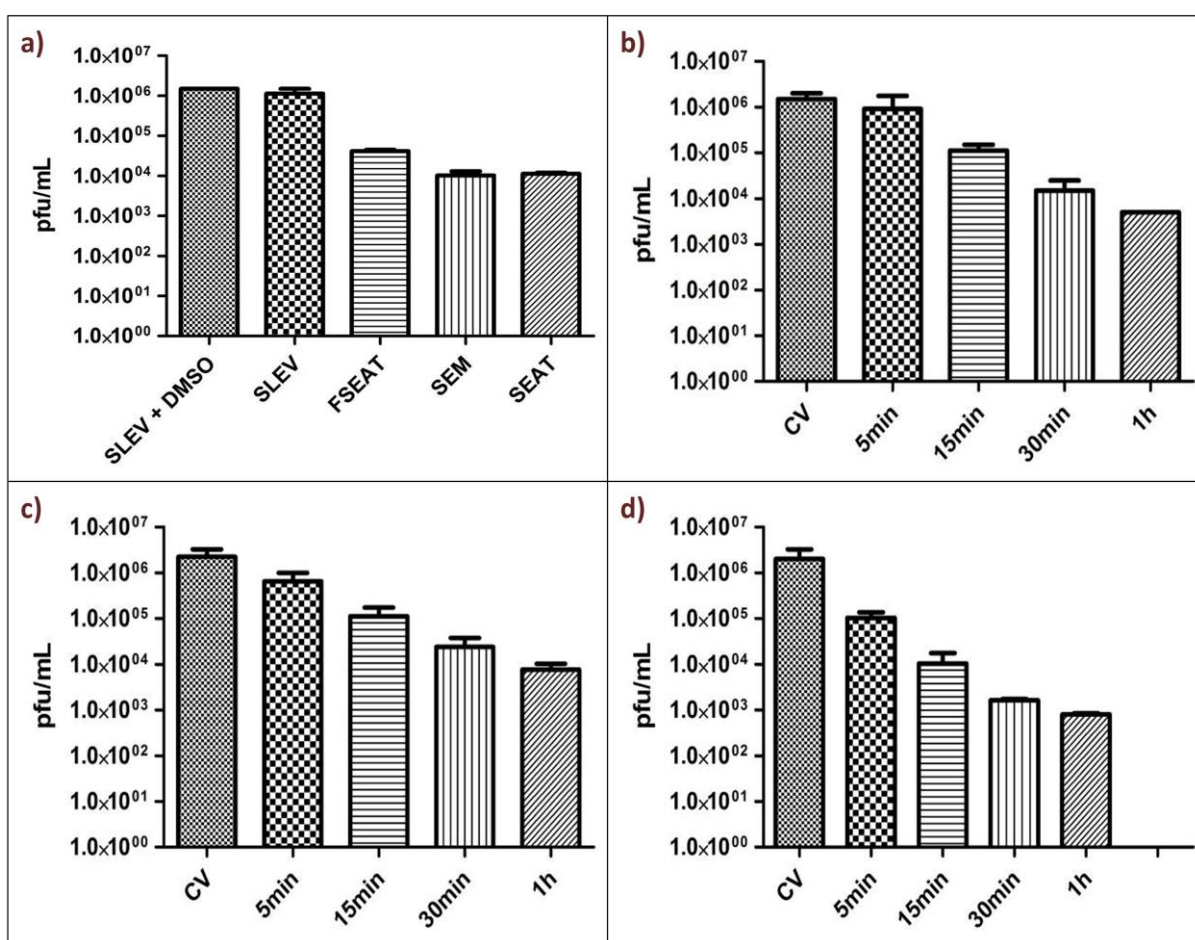


**FIGURA 11: Atividade virucida de extratos de *M. imbricata* contra DENV-4.** a) os extratos foram incubados por 1h com DENV-4 e em seguida titulados em células vero. Os vírus incubados com meio e DMSO foram utilizados como controles; O vírus foi incubado com os extratos por 5, 15, 30min e 1h em seguida titulados em células Vero: b) FSEAT; c) SEM; d) SEAT.

O tempo necessário para ação virucida dos extratos foi investigado sendo os vírus foram incubados presença dos extratos por períodos de 5 min a 1 hora e em seguida titulados. Os extratos testados apresentaram a ação máxima após 1h de incubação, mas pode-se observar atividade virucida a partir dos 5min. (figura 11b, c, d), sendo essa uma atividade crescente com o decorrer do contato entre vírus e extrato.

### 5.4.2. SLEV

Para avaliação da atividade virucida dos extratos contra SLEV, os mesmos foram incubados com os vírus por 1h a 37°C. Em seguida foram titulados, utilizando o vírus não tratado e o vírus incubado com DMSO como controle. Pode-se observar então uma diminuição de até 3 log<sub>10</sub> no título viral quando o vírus é tratado com o extrato SEAT, mas com uma redução menor mas também significativa do extrato FSEAT (1 log<sub>10</sub>). O controle viral e DMSO não apresentam diferença no título viral (figura 12a).



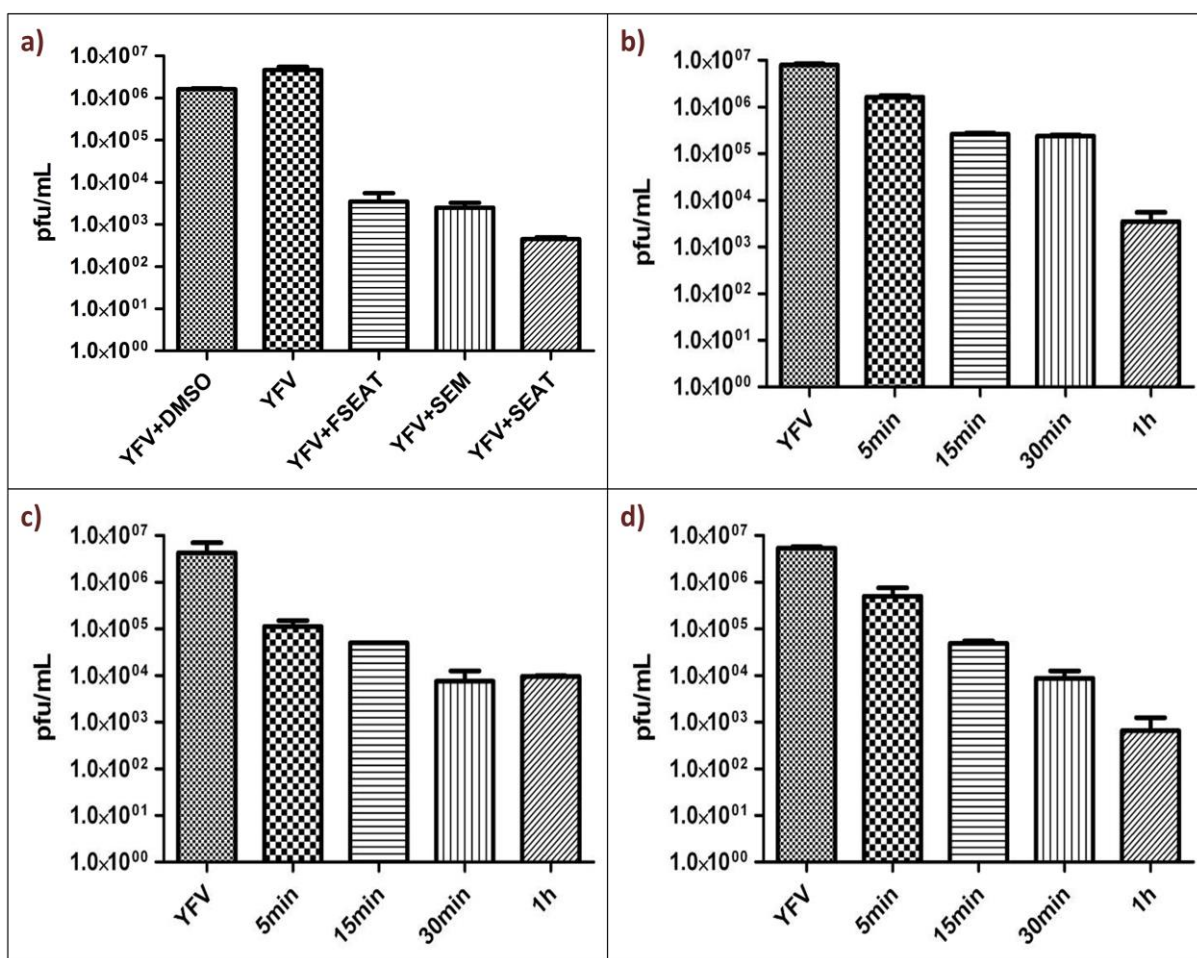
**FIGURA 12: Atividade virucida de extratos de *M. imbricata* contra SLEV.** a) os extratos foram incubados por 1h com SLEV e em seguida titulados em células Vero. Os vírus incubados com meio e DMSO foram utilizados como controles; O vírus foi incubado com os extratos por 5, 15, 30min e 1h em seguida titulados em células Vero: b) FSEAT; c) SEM; d) SEAT.

O tempo necessário para ação virucida dos extratos foi determinado. Para tanto, os vírus foram incubados por diferentes tempos pré-determinados e em seguida titulados. As amostras testadas apresentam sua ação máxima após 1h de

incubação, mas pode-se observar nas frações SEM e SEAT uma atividade virucida a partir de 5min de tratamento, com redução de até  $1\log_{10}$  (SEAT) (figura 12b, c, d), sendo essa uma atividade virucida crescente com o decorrer do contato entre vírus e extrato.

### 5.4.3. YFV

Assim com para DENV-4 e SLEV para avaliar a atividade virucida dos extratos contra YFV, os mesmos foram incubados com os vírus por 1h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida foram titulados, utilizando o vírus não tratado e o vírus incubado com DMSO como controle. Pode-se observar então uma diminuição de até  $3\log_{10}$  no título viral quando o vírus é tratado com o extrato SEAT e de  $2\log_{10}$  quando tratado com os extratos FSEAT e SEM (figura 13a).



**FIGURA 13: Atividade virucida de extratos de *M. imbricata* contra YFV.** a) os extratos foram incubados por 1h com YFV e em seguida titulados em células Vero. Os vírus incubados com meio e DMSO foram utilizados como controles. O vírus foi incubado com os extratos por 5, 15, 30min e 1h em seguida titulados em células Vero: b) FSEAT; c) SEM; d) SEAT.

A ação virucida dos extratos após serem incubados por períodos pré-determinados e em seguida titulados, mostraram que os mesmos apresentaram atividade virucida a partir de 5min de contato vírus-extrato, podendo ser essa ação de até 1 log<sub>10</sub> (figura 13c), sendo essa uma atividade crescente com o decorrer do tempo de contato entre vírus e extrato, com ação virucida máxima após 1h de incubação, exceto para o extrato SEM, que em 30min já apresenta redução praticamente igual a de 1h de incubação (figura 13c).

### 5.5. Determinação da concentração virucida

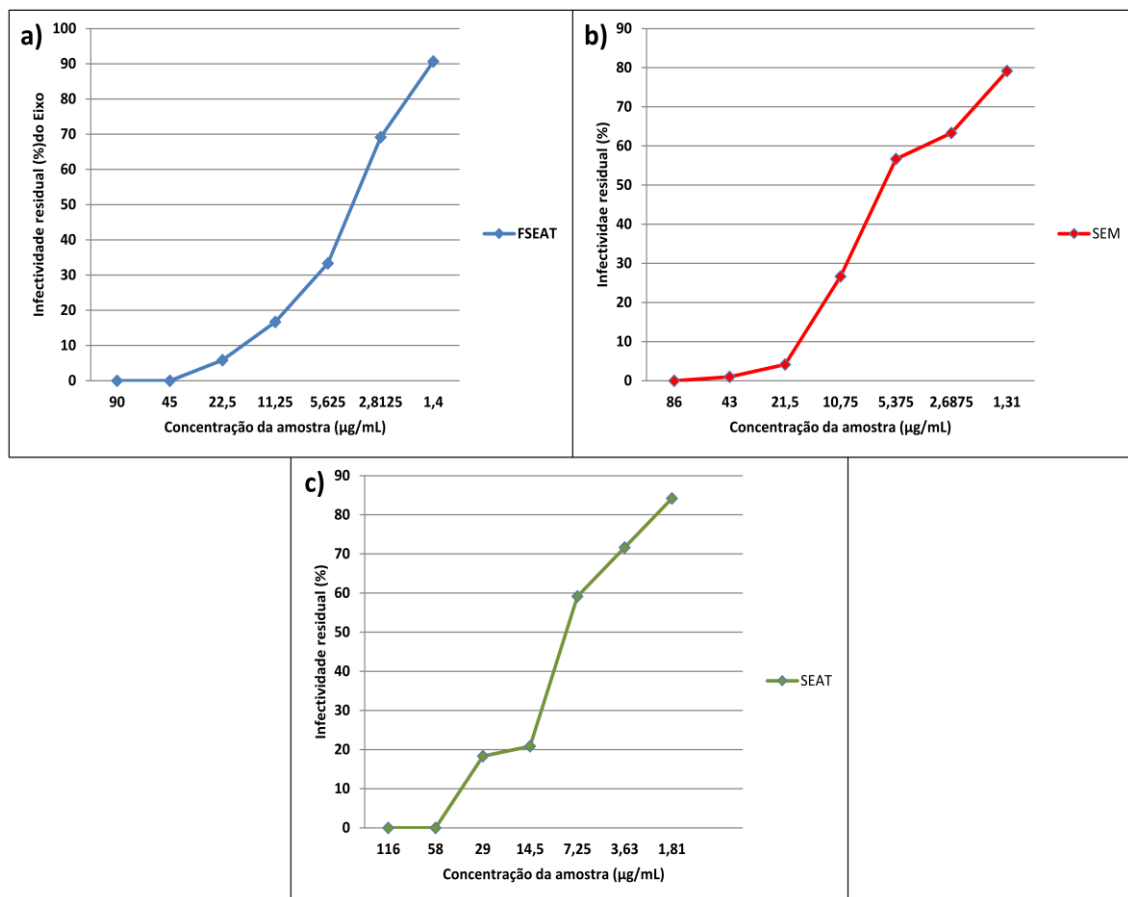
A concentração dos extratos que é capaz de inibir 50% da formação de placas de lise foi determinada. Uma quantidade de UFP conhecida de vírus foi incubada com diluições seriadas dos extratos testes, a partir da concentração da CC<sub>50</sub>, por 1h. Foram feitas 6 ou 7 diluições seriadas dos extratos, e então pode-se calcular a porcentagem de inibição da infecção viral com auxílio do programa Excel (Microsoft) e por conseguinte o cálculo do IS (TABELA 6).

**TABELA 6:** Índices de seletividade dos extratos de *M. imbricata* determinadas por ensaio virucida

Vírus	Extrato	CC <sub>50</sub> (µg/mL ± desvio padrão)	Concentrações testadas (µg/mL)	CV <sub>50</sub> (µg/mL ± desvio padrão)	IS
<b>DENV-4</b>	FSEAT	90,44±1,52	1,42 a 91	4,32 ±0,02	20,93
	SEM	86,35±6,85	1,31 a 86	6,14 ±1,4	14,06
	SEAT	116,85±3,97	1,8 a 116	8,63 ±0,38	13,53
<b>SLEV</b>	FSEAT	90,44±1,52	1,42 a 91	5,79 ± 2,77	15,89
	SEM	86,35±6,85	1,31 a 86	9,52 ± 0,68	9,07
	SEAT	116,85±3,97	1,8 a 116	6,20 ± 1,88	19,41
<b>YFV</b>	FSEAT	90,44±1,52	1,42 a 91	6,7 ±0,15	13,49
	SEM	86,35±6,85	1,31 a 86	7,71 ±0,79	11,19
	SEAT	116,85±3,97	1,8 a 116	10,46 ±0,93	11,17

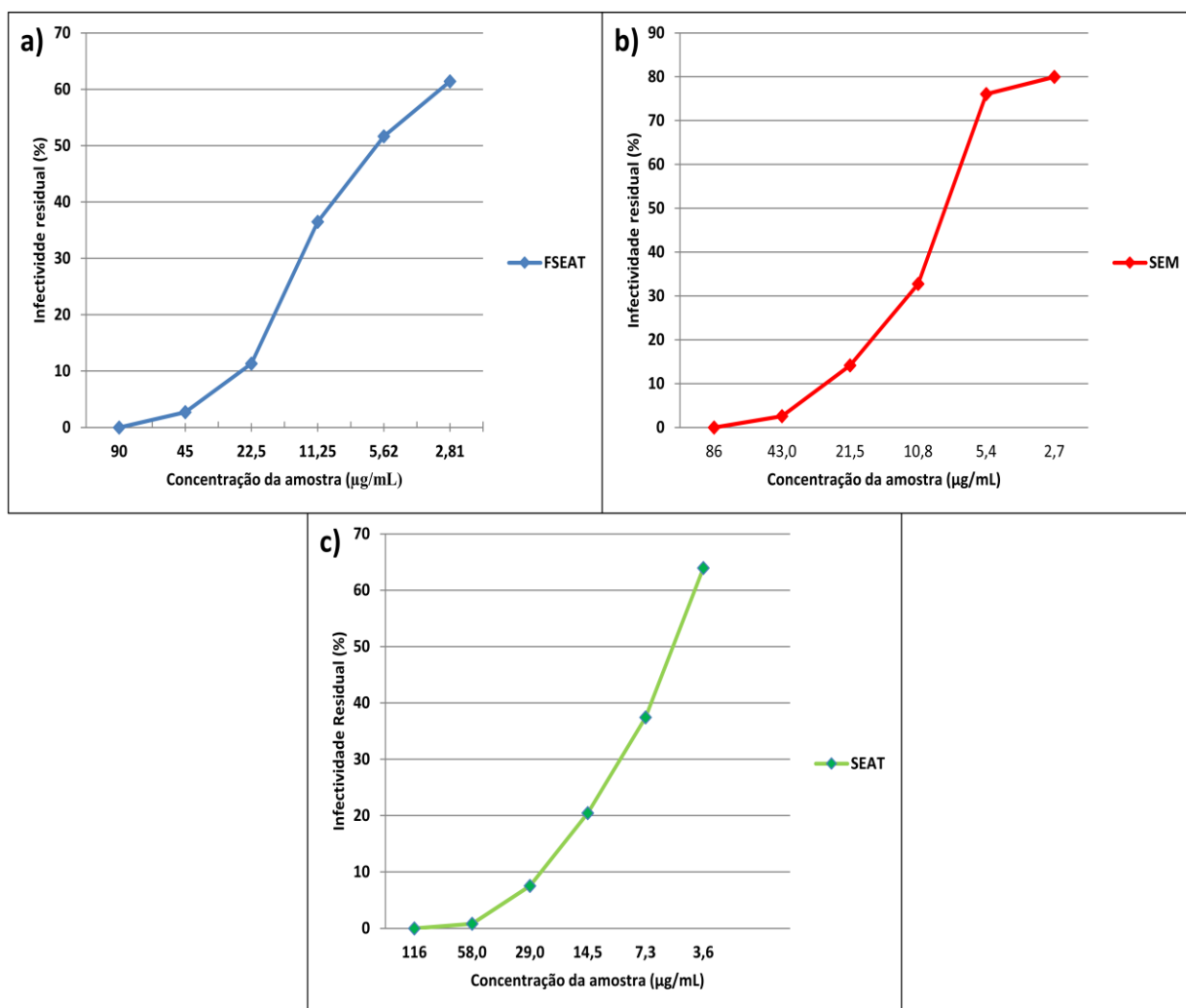
Após análise pode-se, então, observar altos valores de IS variando de 13,56 a 20,93 contra DENV-4; 9,07 a 19,41 contra SLEV; e 11,17 a 13,49 contra YFV, que comprovam a especificidade de ação dos extratos na sua ação virucida, sendo que a atividade foi dose-dependente, isto é, quanto maior a concentração utilizada, mais efetiva é a ação do extrato sobre a partícula viral e menor é sua infectividade residual, como é possível observar para o DENV-4 (FIGURA 14a, b, c), SLEV (FIGURA 15a, b, c) e YFV (FIGURA 16a, b, c), assim como na menor dose testada, os extratos foram capazes de inibir a formação de placa viral.

Observa-se que os extratos FSEAT, SEM e SEAT na sua concentração  $CC_{50}$ , respectivamente 90, 86 e 116  $\mu\text{g/mL}$ , apresentam uma ação sobre a partícula viral capaz de inibir 100% da infectiosidade viral, sendo que para todos os extratos (FIGURA 14a, b e c) essa ação se estende até a concentração de 45,43 e 58  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.



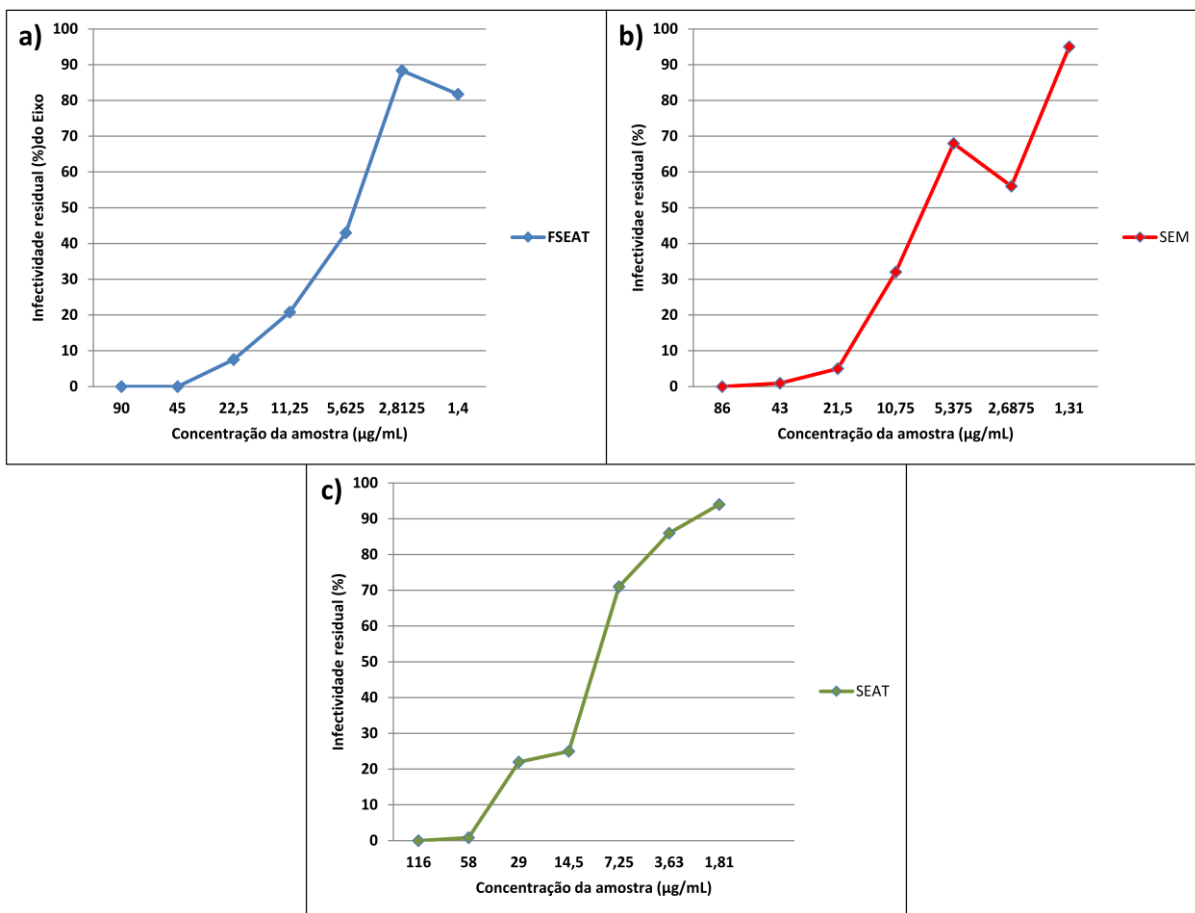
**FIGURA 14: Curva dose-resposta para atividade virucida dos extratos de *M.imbricata* contra DENV-4 representada pela infectividade residual determinada por ensaio de placa; a) FSEAT; b) SEM, c) SEAT.**

Contra SLEV observa-se que os extratos FSEAT, SEM e SEAT na sua concentração  $CC_{50}$ , respectivamente, 90, 86 e 116  $\mu\text{g/mL}$ , apresentam uma ação sobre a partícula viral capaz de inibir 100% da infecciosidade viral, sendo que para o extrato SEAT (FIGURA 15c) essa ação se estende até a concentração de 58  $\mu\text{g/mL}$ .



**FIGURA 15: Curva dose-resposta para atividade virucida dos extratos de *M.imbricata* contra SLEV representada pela infectividade residual determinada por ensaio de placa; a) FSEAT; b) SEM, c) SEAT.**

Nos testes contra YFV observa-se que os extratos FSEAT, SEM e SEAT na sua concentração  $CC_{50}$ , respectivamente, 90, 86 e 116  $\mu\text{g/mL}$ , apresentam uma ação sobre a partícula viral capaz de inibir 100% da infecciosidade viral, sendo que para todos os extrato (figura 15a, b, c) essa ação se estende até a concentração de 45,43 e 58  $\mu\text{g/mL}$ .



**FIGURA 16:** Curva dose-resposta para atividade virucida dos extratos de *M.imbricata* contra YFV representada pela infectividade residual determinada por ensaio de placa; a) FSEAT; b) SEM, c) SEAT.

## 5.6. Avaliação da ação profilática dos extratos vegetais - Pré-tratamento

Para avaliar se os extratos seriam capazes de induzir células Vero a um estado antiviral, ficando, assim, resistente à infecção por DENV-4, SLEV ou YFV, as mesmas foram tratadas com diluições seriadas dos extratos, com concentrações iguais ou inferiores à  $CC_{50}$ , e incubadas por 1h e 20h. Os extratos foram então retirados e a células foram então infectadas com os vírus a ser analisado.

Não foi observada nenhuma diferença significativa entre as células tratadas com os extratos e o controle viral não tratado em nenhuma das concentrações analisadas.

## 5.7. Pós-tratamento

Com o objetivo de avaliar se as amostras testes eram capazes de diminuir a infecção viral pós-infecção, células Vero foram infectadas com DENV-4, SLEV ou YFV e então tratadas por 1h com diluições seriadas dos extratos, a partir da concentração da CC<sub>50</sub>.

Ao compararmos a quantificação de UFP no controle viral não tratado com o tratado, não houve diferença significativa, não apresentando, então, atividade antiviral de pós-tratamento, em nenhuma das concentrações dos extratos testados.

## 5.8. Avaliação da especificidade da atividade antiviral dos extratos de *M. imbricata* contra flavivírus.

A atividade antiviral dos extratos de *M. imbricata* também foi testada contra diferentes vírus, entre representantes de DNA e RNA, envelopados ou não (TABELA 2) para avaliar a especificidade da ação antiviral contra flavivírus.

Nenhum dos extratos apresentou atividade antiviral contra os vírus testados durante a triagem por MTT, exceto para flavivírus (TABELA 7).

**Tabela 7:** Especificidade dos extratos de *M. imbricata* para flavivírus

Vírus	Extrato	CE <sub>50</sub> (µg/mL ± desvio padrão)	IS
APEUV	FSEAT	38,73±2,41	2,33
	SEM	40,42±2,81	2,13
	SEAT	73,08±0,71	1,59
EMC	FSEAT	NA	-
	SEM	NA	-
	SEAT	NA	-
ITQV	FSEAT	55,17±1,48	1,63
	SEM	54,26±1,69	1,59
	SEAT	46,35±2,19	2,52
HHV1	FSEAT	NA	-

	SEM	NA	-
	SEAT	NA	-
VACV-WR	FSEAT	NA	-
	SEM	44,71±1,28	1,93
	SEAT	60,53±1,93	1,93
VSV	FSEAT	NA	-
	SEM	NA	-
	SEAT	NA	-
YFV	FSEAT	14,80±1,26	6,11
	SEM	15,98±2,83	5,4
	SEAT	14,06±1,06	8,31

---

(NA: não ativo)

## 6. DISCUSSÃO

O gênero *Flavivirus* apresenta muitos arbovírus, entre eles, DENV e YFV, que podem causar importantes viroses em humanos, e SLEV, que apesar do número de casos relatados serem relativamente pequenos, também pode causar doença grave e até mesmo letal em humanos (HEINZ; STIASNY, 2012).

Milhões de pessoas se infectam anualmente com essas arboviroses e apesar de esforços para desenvolvimento de uma vacina contra o DENV, ainda não existe uma vacina eficaz. E mesmo existindo a disponibilidade de uma vacina segura e eficaz contra YFV, em países africanos, por exemplo, a febre amarela ainda é uma importante causa de mortalidade (MONATH, 2008).

Não há drogas antivirais aprovadas contra dengue, febre amarela ou encefalite de St. Louis. O tratamento é feito com cuidados de suporte, com o intuito de minimizar os sintomas do paciente. Consequentemente existe uma clara necessidade de medicamentos seguros e eficazes contra essas viroses.

Nesse contexto, as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído para a obtenção de vários fármacos até hoje amplamente utilizados na clínica, como a atropina (alcaloide), ácido acetil salicílico e quinina (alcaloides).

Como teste inicial, foi determinada a citotoxicidade das amostras de extratos através do ensaio colorimétrico com MTT, com uma curva dose-resposta. O teste com MTT é um ensaio de viabilidade celular frequentemente usado para determinar a citotoxicidade após a exposição a determinadas substâncias (FOTAKIS, TIMBRELL, 2005). A viabilidade celular é expressa como uma porcentagem de células viáveis em presença da substância testada em relação ao controle não tratado, representada pela  $CC_{50}$ . Quanto maior o valor o valor de  $CC_{50}$ , menos tóxica é a substância testada. As amostras de extratos apresentaram concentração citotóxica que variaram de 86 a 116  $\mu\text{g/mL}$ . Valores próximos de concentração citotóxica foram encontrados por Ahmed e colaboradores (2013) ao testar extratos de folhas secas de outras espécies do gênero *Maytenus* em células Vero, com valores variando de 87 a 187  $\mu\text{g/mL}$ . As concentrações encontradas para citotoxicidade de extratos de *Maytenus* em células Vero são compatíveis com os de drogas comerciais, como a ribavirina, utilizada no tratamento de herpes e hepatites,

que segundo Arthanari e colaboradores (2012) é de 112 µg/mL no mesmo sistema celular.

Para uma triagem inicial da atividade antiviral dos extratos contra DENV-4, SLEV e YFV foi utilizada, também a técnica de MTT, através da qual o percentual de inibição da multiplicação viral em presença dos extratos foi calculado em relação ao controle de células não infectado e ao controle de vírus infectado e não tratado, por regressão linear com o auxílio do programa Excel (Microsoft). Todos os extratos testados contra DENV-4, SLEV e YFV apresentaram atividade antiviral, exceto a amostra FSEAT quando testada contra SLEV (IS= 3,82). Nosso resultados refutam os definição de Amoros e colaboradores (1992) que afirmam que apenas amostras que apresentarem um índice de seletividade (IS)  $\geq 4$  são consideradas com atividade antiviral, visto que, o extrato FSEAT apresentou um baixo IS durante a triagem (3,82), mas se mostrou um extrato com atividade virucida muito forte com IS de 15,89. Isso nos sugere aprofundar os testes com os outros vírus testados neste trabalho empregando pela técnica do MTT que apresentaram um IS baixo a ponto de ser descartada a atividade antiviral dos extratos contra eles, como é o caso do APEUV, ITQV e VACV (TABELA 7) para confirmar a especificidade.

Essa diferença entre os IS na triagem antiviral e nos testes de ação virucida também é esperada, visto que, o teste virucida é um teste mais específico. Essa diferença de IS também foi observada em outros trabalhos, como de Romero e colaboradores (2003), que investigando extratos de *Phyllanthus orbicularis* contra HHV-1, encontraram uma diferença de IS do ensaio virucida de até 68 vezes maior quando comparado o IS da triagem antiviral com MTT em células Vero.

Considerando todas as amostras de extratos com atividade antiviral contra DENV-4, SLEV e YFV, as mesmas foram testadas para avaliação do seu potencial virucida após 1h de incubação dos extratos, na sua  $CC_{50}$ , com os vírus, utilizando o vírus não tratado e tratado com DMSO como controles. Pode-se perceber que as suspensões virais tratados com o diluente das amostras de extratos, o DMSO, apresentaram um título viral semelhante ao controle de vírus, podendo-se, então, nas concentrações testadas, afirmar que foi um solvente inerte, sem interferir na ação antiviral e virucida dos extratos. Os extratos de *M. imbricata* contra todos os vírus testados foram capazes de diminuir em até 3  $\log_{10}$  a multiplicação viral dos três flavivírus testados.

Faz-se ainda necessária uma avaliação contra outros sorotipos de dengue, pois essa atividade antiviral pode ser variada entre os sorotipos de DENV (TALARICO *et al*, 2005; PUJOL *et al*, 2012). Ocazonez e colaboradores (2010) encontraram diferenças significativas entre o IS para atividade virucida de óleo essencial de *Lippia alba* contra DENV-2 (IS=349), enquanto para outros sorotipos os IS não passavam de 14, o que reafirma a necessidade de investigação de atividade antiviral contra todos os quatro sorotipos de DENV.

Sabendo-se da ação virucida das amostras de *M. imbricata*, foi estabelecida a concentração virucida dos extratos após 1h de incubação com os vírus. A CV<sub>50</sub> é a concentração do extrato necessária para reduzir 50% da formação de placa de lise virais. Intervalos maiores de incubação, como 3, 5, 7 e 12h, também foram avaliados, mas não foi possível a determinação da concentração virucida devido à instabilidade dos vírus testados, que após longos períodos de incubação perdem infecciosidade. Todos os extratos testados contra os três flavivírus (DENV-4, SLEV e YFV) foram capazes de reduzir 100% da infecciosidade viral no ensaio de placa quando testada na concentração a CC<sub>50</sub> (FIGURA 15 e 16). Esse resultado é compatível com muitos relatos na literatura, quando quantidades entre 50 a 200 PFU são incubados com extratos vegetais ou substâncias isoladas (TALARICO *et al*, 2007; JAIN *et al*, 2008, OCAZIONEZ *et al*, 2010; ZANDI *et al*, 2011, ZANDI *et al*, 2012). Mas na literatura não encontramos referências suficientes para comparação com nossos dados de redução do título viral quando testados extratos vegetais, mas encontra-se citação para substâncias isoladas com a diminuição de até 6 log<sub>10</sub> do título de DENV-2 (MUHAMAD *et al*, 2010; LOW *et al*, 2011).

Para avaliar a capacidade dos extratos em induzir as células um estado antiviral e responder a infecção, as células foram tratadas por 1h ou 20h com diluições dos extratos e depois infectadas com o DENV-4, SLEV e YFV. Pouco é descrito na literatura sobre drogas advindas de extratos vegetais que induzam a produção de interferon ou outras substâncias antivirais. O pouco que é descrito dessa atividade de pré-tratamento contra vírus, até mesmo contra *Flavivírus*, é sobre substâncias de origem sintética ou o próprio interferon (revisado por LEYSSEN *et al*, 2003).

O pós-tratamento foi feito para avaliação da eficiência dos extratos vegetais após a infecção viral. Nenhuma das amostras mostrou atividade antiviral contra

DENV, SLEV ou YFV quando as células já infectadas foram tratadas por 1h. O tempo de 1h de tratamento com diluições dos extratos talvez não tenha sido suficiente para uma ação efetiva dos extratos. Um tempo mais longo, como incubação até revelação da placa, como realizado por Muller e colaboradores (2012) nos testes de pós-tratamento contra DENV e YFV, seja mais apropriada para essa avaliação do que a metodologia utilizada nesse trabalho de tratamento de apenas 1h.

Os extratos também tiveram sua ação antiviral avaliada para outros vírus de DNA e RNA, envelopados ou não para avaliar a especificidade da ação. Nenhum dos extratos apresentou atividade antiviral significativa contra esses vírus (APEUV, EMC, ITQV, HHV-1, VACV-WR e VSV). Essa triagem nos permitiu avaliar também que a atividade virucida dos extratos contra DENV, SLEV e YFV não é apenas pela presença do envelope, visto que, com exceção do EMC, todos os outros vírus testados apresentam envelope. Isso nos leva a pensar que as substâncias ativas dos extratos de *M. imbricata* poderiam ter ação seletiva no envelope viral de *Flavivirus*.

O mecanismo de ação da atividade antiviral dos extratos de *M. imbricata* ainda precisa ser elucidado. Para isso seus princípios ativos precisam ser isolados e terem sua ação antiviral avaliada isolada ou simultaneamente. Mas pode-se afirmar que *M. imbricata* tem potencial para continuar sendo estudada e com a vantagem de ter apresentado atividade antiviral não apenas contra DENV, mas também contra outros flavivírus que não apresentam terapia antiviral.

## 7. CONCLUSÕES

- 1) Os extratos de raiz de *M. imbricata*, FSEAT, SEM e SEAT apresentam atividade antiviral contra DENV, SLEV e YFV, vírus de importância médica que não possuem qualquer medicamento antiviral aprovado.
- 2) Os extratos FSEAT, SEM e SEAT apresentam ação virucida a partir de 5 min. de contato com os vírus, sendo essa ação crescente com o decorrer do tempo, sendo seu ápice em 1h pós-contato.
- 3) A atividade virucida mostrou-se dose-dependente, apresentando  $IS > 9$  para todos os extratos contra todos o flavivírus testados.
- 4) Os extratos FSEAT, SEM e SEAT não demonstraram ação antiviral contra o APEUV, EMC, ITQV, HHV-1, VACV e VSV, apresentando  $IS < 3$  para todos os extratos, demonstrando uma ação que parece ser específica contra *Flavivírus*.
- 5) O mecanismo molecular da atividade antiviral dos extratos de raiz de *M imbricata* permanece desconhecido, necessitando de estudos mais aprofundados para sua elucidação.

## **8. PERSPECTIVAS**

Os resultados deste estudo demonstram a importância da continuidade da pesquisa de antivirais, buscando confirmar a atividade antiviral dos compostos *in vitro* no seu estado bruto e substâncias isoladas. O isolamento e purificação dos componentes biologicamente ativos dos extratos vegetais responsáveis pela atividade virucida encontrada nesse trabalho é de fundamental importância para continuidade dos estudos, já que os extratos avaliados se mostraram promissores como antivirais.

## REFERÊNCIAS

ABD KADIR, S. L.; YAAKOB, H.; MOHAMED ZULKIFLI, R. Potential anti-dengue medicinal plants: a review. **J Nat Med**, v. 67, n. 4, p. 677-89, 2013.

AHMED, A. S.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Evaluation of pharmacological activities, cytotoxicity and phenolic composition of four *Maytenus* species used in southern African traditional medicine to treat intestinal infections and diarrhoeal diseases. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 100, 2013.

ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 376-81, 2002

ALEXANDER, N.; BALMASEDA, A.; COELHO, I. C.; DIMAANO, E.; HIEN, T. T.; HUNG, N. T.; JÄNISCH, T.; KROEGER, A.; LUM, L. C.; MARTINEZ, E.; SIQUEIRA, J. B.; THUY, T. T.; VILLALOBOS, I.; VILLEGAS, E.; WILLS, B.; EUROPEAN UNION. Multicentre prospective study on dengue classification in four South-east Asian and three Latin American countries. **Trop Med Int Health**, v. 16, n. 8, p. 936-48, 2011.

AMOROS, M.; SIMÕES, C. M.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **J Nat Prod**, v. 55, n. 12, p. 1732-40, 1992.

ANDRAUD, M.; HENS, N.; MARAIS, C.; BEUTELS, P. Dynamic epidemiological models for dengue transmission: a systematic review of structural approaches. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49085, 2012.

ARTHANARI, S. K.; VANITHA, J.; GANESH, M.; VENKATESHWARAN, K.; CLERCQ, D. Evaluation of antiviral and cytotoxic activities of methanolic extract of *S. grandiflora* (Fabaceae) flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, Supplement, p. S855-S858, 2012.

AVIRUTNAN, P.; ZHANG, L.; PUNYADEE, N.; MANUYAKORN, A.; PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; MALASIT, P.; ATKINSON, J. P.; DIAMOND, M. S. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 11, p. e183, 2007.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G.; BASTOS, F. I.; XIMENES, R. A. A.; BARATA, R. B.; RODRIGUES, L. C. Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa. **The Lancet**. 3: 14 p. 2011.

BEASLEY, D. W.; MCAULEY, A. J.; BENTE, D. A. Yellow fever virus: Genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. **Antiviral Res**, v. 115C, p. 48-70, 2014.

BHUVANAKANTHAM, R.; NG, M. L. West Nile virus and dengue virus capsid protein negates the antiviral activity of human Sec3 protein through the proteasome pathway. **Cell Microbiol**, v. 15, n. 10, p. 1688-706, 2013.

BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; SOUZA, D. E.; SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B. Chemistry and Antiviral Activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae). **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9919-32, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **SUS oferece fitoterápicos na rede pública como alternativa de tratamento**. 2013a. Disponível em <<http://www2.planalto.gov.br/excluir-historico-nao-sera-migrado/sus-oferece-fitoterapicos-como-alternativa-de-tratamento-na-rede-publica> > Acesso em: 01/08/2013.

\_\_\_\_\_. **Saúde libera mais de R\$ 360mi para combate a dengue**. 2013b. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2013/11/saude-libera-mais-de-r-360-mi-para-combate-a-dengue> > Acesso em 17/03/2014.>.

\_\_\_\_\_. **Boletim Epidemiológico**.v 45, Issue 7, 2014. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/27/BE-V45-n---07-FebreAmarela.pdf> > Acesso em 22/01/2015.

\_\_\_\_\_. **Dengue: 117 município sem situação de risco e 533 em alerta**. 2015. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/15477-ms-atualiza-dados-sobre-infestacao-do-mosquito-em-municipios> > Acesso em 27/01/2015.

\_\_\_\_\_. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: 60 p. 2006.

BREDECK, J. F. The Story of the Epidemic of Encephalitis in St. Louis. **Am J Public Health Nations Health**, v. 23, n. 11, p. 1135-40, 1933.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Saint Louis Encephalitis home**. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/sle/technical/epi.html> >. Acesso em: 24/01/2015.

CALY, L.; WAGSTAFF, K. M.; JANS, D. A. Nuclear trafficking of proteins from RNA viruses: potential target for antivirals? **Antiviral Res**, v. 95, n. 3, p. 202-6, 2012.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **J Virol**, v. 80, n. 23, p. 11418-31, 2006.

COLPITTS, T. M.; BARTHEL, S.; WANG, P.; FIKRIG, E. Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24365, 2011.

CORIC, P.; TURCAUD, S.; SOUQUET, F.; BRIANT, L.; GAY, B.; ROYER, J.; CHAZAL, N.; BOUAZIZ, S. Synthesis and biological evaluation of a new derivative of

bevirimat that targets the Gag CA-SP1 cleavage site. **Eur J Med Chem**, v. 62, p. 453-65, 2013.

DAY, J. F. Predicting St. Louis encephalitis virus epidemics: lessons from recent, and not so recent, outbreaks. **Annu Rev Entomol**, v. 46, p. 111-38, 2001.

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 1, p. 13-25, 2002.

\_\_\_\_\_. Antivirals and antiviral strategies. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 9, p. 704-20, 2004.

DE THOISY, B.; LACOSTE, V.; GERMAIN, A.; MUÑOZ-JORDÁN, J.; COLÓN, C.; MAUFFREY, J. F.; DELAVAL, M.; CATZEFLIS, F.; KAZANJI, M.; MATHEUS, S.; DUSSART, P.; MORVAN, J.; SETIÉN, A. A.; DEPARIS, X.; LAVERGNE, A. Dengue infection in neotropical forest mammals. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 9, n. 2, p. 157-70, 2009.

DEFOLIART, G. R.; GRIMSTAD, P. R.; WATTS, D. M. Advances in mosquito-borne arbovirus/vector research. **Annu Rev Entomol**, v. 32, p. 479-505, 1987.

DOS SANTOS, V. A.; LEITE, K. M.; DA COSTA SIQUEIRA, M.; REGASINI, L. O.; MARTINEZ, I.; NOGUEIRA, C. T.; GALUPPO, M. K.; STOLF, B. S.; PEREIRA, A. M.; CICALLELLI, R. M.; FURLAN, M.; GRAMINHA, M. A. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 1053-62, 2013.

DÍAZ, L. A.; ALBRIEU LLINÁS, G.; VÁZQUEZ, A.; TENORIO, A.; CONTIGIANI, M. S. Silent circulation of St. Louis encephalitis virus prior to an encephalitis outbreak in Cordoba, Argentina (2005). **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 1, p. e1489, 2012.

ENGELMANN, F.; JOSSET, L.; GIRKE, T.; PARK, B.; BARRON, A.; DEWANE, J.; HAMMARLUND, E.; LEWIS, A.; AXTHELM, M. K.; SLIFKA, M. K.; MESSAOUDI, I. Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic yellow fever in a rhesus macaque model. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, p. e3295, 2014.

ESIMONE, C. O.; OFOKANSI, K. C.; ADIKWU, M. U.; IBEZIM, E. C.; ABONYI, D. O.; ODAIBO, G. N.; OLALEYE, D. O. In vitro evaluation of the antiviral activity of extracts from the lichen *Parmelia perlata* (L.) Ach. against three RNA viruses. **J Infect Dev Ctries**, v. 1, n. 3, p. 315-20, 2007.

FALGOUT, B.; MARKOFF, L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. **J Virol**, v. 69, n. 11, p. 7232-43, 1995.

FIGUEIREDO, L. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect**, v. 2, n. 13, p. 1643-9, 2000.

FIGUEIREDO, M. L. G. **Identificação de flavivírus infectando culicídeos de 1990 a 2007 no Brasil**. Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FIGUEIREDO, R. M.; NAVECA, F. G.; BASTOS, M. S.; MELO, M. N.; VIANA, S. S.; MOURÃO, M. P.; COSTA, C. A.; FARIAS, I. P. Dengue virus type 4, Manaus, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 4, p. 667-9, 2008.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**, v. 160, n. 2, p. 171-7, 2006.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R. E.; COSENTINO, L. M.; BALLAS, L. M.; JIANG, J. B.; JANZEN, W. P.; CHEN, I. S.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **J Nat Prod**, v. 57, n. 2, p. 243-7, 1994.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500-9, 2008.

GRATZ, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Med Vet Entomol**, v. 18, n. 3, p. 215-27, 2004.

GREEN, N.; OTT, R. D.; ISAACS, R. J.; FANG, H. Cell-based Assays to Identify Inhibitors of Viral Disease. **Expert Opin Drug Discov**, v. 3, n. 6, p. 671-676, 2008.

GREEN, S.; ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, n. 5, p. 429-36, 2006.

GUBLER, D. J. *Aedes aegypti* and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. Charles Franklin Craig Lecture. **Am J Trop Med Hyg**, v. 40, n. 6, p. 571-8, 1989.

\_\_\_\_\_. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 480-96, 1998.

\_\_\_\_\_. Human arbovirus infections worldwide. **Ann N Y Acad Sci**, v. 951, p. 13-24, 2001.

\_\_\_\_\_. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 5, p. 319-30, 2004.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKHOFF, L. **Flaviviruses**. 5<sup>a</sup>. Philadelphia: 2007. 3091.

GULATI, S.; MAHESHWARI, A. Atypical manifestations of dengue. **Trop Med Int Health**, v. 12, n. 9, p. 1087-95, 2007.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, 2010.

HADINEGORO, S. R. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? **Paediatr Int Child Health**, v. 32 Suppl 1, p. 33-8, 2012.

HALSEY, E. S.; MARKS, M. A.; GOTUZZO, E.; FIESTAS, V.; SUAREZ, L.; VARGAS, J.; AGUAYO, N.; MADRID, C.; VIMOS, C.; KOCHER, T. J.; LAGUNA-TORRES, V. A. Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 5, p. e1638, 2012.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-81, 1988.

\_\_\_\_\_. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv Virus Res**, v. 60, p. 421-67, 2003.

HANLEY, K. A.; MONATH, T. P.; WEAVER, S. C.; ROSSI, S. L.; RICHMAN, R. L.; VASILAKIS, N. Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. **Infect Genet Evol**, v. 19, p. 292-311, 2013.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4301-6, 2012.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clin Microbiol Rev**, v. 3, n. 4, p. 376-96, 1990.

HENRIQUES, H. R.; RAMPAZO, E. V.; GONÇALVES, A. J.; VICENTIN, E. C.; AMORIM, J. H.; PANATIERI, R. H.; AMORIM, K. N.; YAMAMOTO, M. M.; FERREIRA, L. C.; ALVES, A. M.; BOSCARDIN, S. B. Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2330, 2013.

HERRERO, L. J.; ZAKHARY, A.; GAHAN, M. E.; NELSON, M. A.; HERRING, B. L.; HAPPEL, A. J.; KELLER, P. A.; OBEYSEKERA, M.; CHEN, W.; SHENG, K. C.; TAYLOR, A.; WOLF, S.; BETTADAPURA, J.; BROOR, S.; DAR, L.; MAHALINGAM, S. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. **Pharmacol Ther**, v. 137, n. 2, p. 266-82, 2013.

HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAWAHATA, T.; OTAKE, T.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inhibitory effects of Sudanese plant extracts on HIV-1 replication and HIV-1 protease. **Phytother Res**, v. 13, n. 1, p. 31-6, 1999.

ICTV. Vírus Taxonomy. Disponível em: <  
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> >. Acesso em: 27/01/2015.

JAIN, M.; GANJU, L.; KATIYAL, A.; PADWAD, Y.; MISHRA, K. P.; CHANDA, S.; KARAN, D.; YOGENDRA, K. M.; SAWHNEY, R. C. Effect of Hippophae rhamnoides leaf extract against Dengue virus infection in human blood-derived macrophages. **Phytomedicine**, v. 15, n. 10, p. 793-9, 2008.

JASSIM, S. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **J Appl Microbiol**, v. 95, n. 3, p. 412-27, 2003.

JENTES, E. S.; POUMEROL, G.; GERSHMAN, M. D.; HILL, D. R.; LEMARCHAND, J.; LEWIS, R. F.; STAPLES, J. E.; TOMORI, O.; WILDER-SMITH, A.; MONATH, T. P.; FEVER, I. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 8, p. 622-32, 2011.

JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of Aedes aegypti mosquitoes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 67, n. 2, p. 158-61, 2002.

JULANDER, J. G.; PERRY, S. T.; SHRESTA, S. Important advances in the field of anti-dengue virus research. **Antivir Chem Chemother**, v. 21, n. 3, p. 105-16, 2011.

KHIN, M. M.; THAN, K. A. Transovarial transmission of dengue 2 virus by Aedes aegypti in nature. **Am J Trop Med Hyg**, v. 32, n. 3, p. 590-4, 1983.

KLAWIKKAN, N.; NUKOOLKARN, V.; JIRAKANJANAKIT, N.; YOKSAN, S.; WIWAT, C.; THIRAPANMETHEE, K. **Effect of Thai medicinal plant extracts against Dengue virus in vitro**: Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science. 38: 13-18 p. 2011.

KOHN, L. K.; QUEIROGA, C. L.; MARTINI, M. C.; BARATA, L. E.; PORTO, P. S.; SOUZA, L.; ARNS, C. W. In vitro antiviral activity of Brazilian plants (Maytenus ilicifolia and Aniba rosaeodora) against bovine herpesvirus type 5 and avian metapneumovirus. **Pharm Biol**, v. 50, n. 10, p. 1269-75, 2012.

KOPP, A.; GILLESPIE, T. R.; HOBELSBERGER, D.; ESTRADA, A.; HARPER, J. M.; MILLER, R. A.; ECKERLE, I.; MÜLLER, M. A.; PODSIADLOWSKI, L.; LEENDERTZ, F. H.; DROSTEN, C.; JUNGLEN, S. Provenance and geographic spread of St. Louis encephalitis virus. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00322-13, 2013.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C. T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUSS, E. G.; BAKER, T. S. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-25, 2002.

KUMAR, S.; KUMAR, S.; REHMAN, I.; DHYANI, P.; KUMARI, C.; ACHARYA, S.; BORA, G.; DURGAPAL, P.; KUMAR, A. Molecular herbal inhibitors of dengue virus: an update. **Inter J of Med and Arom Plants (IJMAP)**. 2: 1-21 p. 2012.

LANCIOTTI, R. S.; LEWIS, J. G.; GUBLER, D. J.; TRENT, D. W. Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. **J Gen Virol**, v. 75 ( Pt 1), p. 65-75, 1994.

LEARDKAMOLKARN, V.; SIRIGULPANIT, W.; PHURIMSAK, C.; SUPEECHA KUMKATE, S.; LUKANA HIMAKOUN, L.; SRIPANIDKULCHAI, B. The inhibitory actions of *Houttuynia cordata* aqueous extract on *Dengue virus* and Dengue- infected cells. **J of Food Biochem**. 36: 86-92 p. 2011.

LEE, S. H.; TANG, Y. Q.; RATHKRISHNAN, A.; WANG, S. M.; ONG, K. C.; MANIKAM, R.; PAYNE, B. J.; JAGANATH, I. B.; SEKARAN, S. D. Effects of cocktail of four local Malaysian medicinal plants (*Phyllanthus* spp.) against dengue virus 2. **BMC Complement Altern Med**, v. 13, p. 192, 2013.

LESCAR, J.; LUO, D.; XU, T.; SAMPATH, A.; LIM, S. P.; CANARD, B.; VASUDEVAN, S. G. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. **Antiviral Res**, v. 80, n. 2, p. 94-101, 2008.

LEYSEN, P.; CHARLIER, N.; PAESHUYSE, J.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J.. Prospects for Antiviral Therapy. The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development. **Advances in Virus Research**, v 61, 511-541, 2003.

LI, H.; CLUM, S.; YOU, S.; EBNER, K. E.; PADMANABHAN, R.. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. **J Virol**, v. 73, n. 4, p. 3108-16, 1999.

LI, Y.; KAMARA, F.; ZHOU, G.; PUTHIYAKUNNON, S.; LI, C.; LIU, Y.; ZHOU, Y.; YAO, L.; YAN, G.; CHEN, X. G. Urbanization increases *Aedes albopictus* larval habitats and accelerates mosquito development and survivorship. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 11, p. e3301, 2014.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv Virus Res**, v. 59, p. 23-61, 2003.

LOMBARDI, J. A.; GROPPA, M.; BIRAL, L. *Celastraceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil., Disponível em: < <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB6763> >. Acesso em: 15/03/2015.

LORENZ, I. C.; ALLISON, S. L.; HEINZ, F. X.; HELENIUS, A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. **J Virol**, v. 76, n. 11, p. 5480-91, 2002.

LOW, J. G.; SUNG, C.; WIJAYA, L.; WEI, Y.; RATHORE, A. P.; WATANABE, S.; TAN, B. H.; TOH, L.; CHUA, L. T.; HOU, Y.; CHOW, A.; HOWE, S.; CHAN, W. K.; TAN, K. H.; CHUNG, J. S.; CHERNG, B. P.; LYE, D. C.; TAMBAYAH, P. A.; NG, L. C.; CONNOLLY, J.; HIBBERD, M. L.; LEO, Y. S.; CHEUNG, Y. B.; OOI, E. E.; VASUDEVAN, S. G. Efficacy and safety of celgosivir in patients with dengue fever

(CELADEN): a phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial. **Lancet Infect Dis**, v. 14, n. 8, p. 706-15, 2014.

LOW, J. S.; WU, K. X.; CHEN, K. C.; NG, M. M.; CHU, J. J. Narasin, a novel antiviral compound that blocks dengue virus protein expression. **Antivir Ther**, v. 16, n. 8, p. 1203-18, 2011.

MACKENZIE, J. M.; KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Stable expression of noncytopathic Kunjin replicons simulates both ultrastructural and biochemical characteristics observed during replication of Kunjin virus. **Virology**, v. 279, n. 1, p. 161-72, 2001.

MADRID, M. C. F. S. **Identificação de interações proteína-proteína entre NS5 do vírus da febre amarela e proteínas celulares**. 2007. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto-FAMERP, São Jose do Rio Preto.

MAHESWARAN, R.; IGNACIMUTHU, S. A novel herbal formulation against dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Parasitol Res**, v. 110, n. 5, p. 1801-13, 2012.

MAIA, F. G.; CHÁVEZ, J. H.; DE SOUZA, W. M.; ROMEIRO, M. F.; DE CASTRO-JORGE, L. A.; DA FONSECA, B. A.; FIGUEIREDO, L. T. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. **Int J Infect Dis**, v. 26, p. 96-7, 2014.

MARTINA, B. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 4, p. 564-81, 2009.

MARTINS, V. E.; ALENCAR, C. H.; KAMIMURA, M. T.; DE CARVALHO ARAÚJO, F. M.; DE SIMONE, S. G.; DUTRA, R. F.; GUEDES, M. I. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41386, 2012.

MCCARTHY, M. St. Louis Encephalitis and West Nile Virus Encephalitis. **Curr Treat Options Neurol**, v. 3, n. 5, p. 433-438, 2001.

MILLER, J. L.; DE WET, B. J.; DEWET, B. J.; MARTINEZ-POMARES, L.; RADCLIFFE, C. M.; DWEK, R. A.; RUDD, P. M.; GORDON, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, p. e17, 2008.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313-9, 2004.

MOK, Y.; QUAH, J.; SIAU, C. A rare but potentially lethal complication of dengue. **Asian Pac J Trop Med**, v. 6, n. 6, p. 500-1, 2013.

MOMTAZ, S.; HUSSEIN, A. A.; OSTAD, S. N.; ABDOLLAHI, M.; LALL, N. Growth inhibition and induction of apoptosis in human cancerous HeLa cells by *Maytenus procumbens*. **Food Chem Toxicol**, v. 51, p. 38-45, 2013.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. **Lancet Infect Dis**, v. 1, n. 1, p. 11-20, 2001.

\_\_\_\_\_. Treatment of yellow fever. **Antiviral Res**, v. 78, n. 1, p. 116-24, 2008.

MONATH, T. P.; BARRETT, A. D. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. **Adv Virus Res**, v. 60, p. 343-95, 2003.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. **J Clin Virol**, 2014.

MONDINI, A. et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. **J Clin Virol**, v. 40, n. 1, p. 84-6, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUHAMAD, M.; KEE, L. Y.; RAHMAN, N. A.; YUSOF, R. Antiviral actions of flavanoid-derived compounds on dengue virus type-2. **Int J Biol Sci**, v. 6, n. 3, p. 294-302, 2010.

MULLER, V. D.; RUSSO, R. R.; CINTRA, A. C.; SARTIM, M. A.; ALVES-PAIVA, R. E. M.; FIGUEIREDO, L. T.; SAMPAIO, S. V.; AQUINO, V. H. Crotoxin and phospholipases A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507-15, 2012.

MURRELL, S.; WU, S. C.; BUTLER, M. Review of dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnol Adv**, v. 29, n. 2, p. 239-47, 2011.

NAITHANI, R.; HUMA, L. C.; HOLLAND, L. E.; SHUKLA, D.; MCCORMICK, D. L.; MEHTA, R. G.; MORIARTY, R. M. Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. **Mini Rev Med Chem**, v. 8, n. 11, p. 1106-33, 2008.

NISALAK, A.; ENDY, T. P.; NIMMANNITYA, S.; KALAYANAROOJ, S.; THISAYAKORN, U.; SCOTT, R. M.; BURKE, D. S.; HOKE, C. H.; INNIS, B. L.; VAUGHN, D. W. Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, n. 2, p. 191-202, 2003.

NOUR, A. H.; SANDANASAMY, J.; NOUR, A. H. Larvicidal activity of extracts from different parts of Neem (*Azadirachta indica*) against *Aedes Aegypti* mosquitoes' larvae. **Scient Researc and Essays**. 7(31): 2810-2815 p. 2012.

OCAZIONEZ, R. E.; MENESES, R.; TORRES, F. A.; STASHENKO, E. Virucidal activity of Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication in vitro. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 3, p. 304-9, 2010.

OMS. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control., 1997. Disponível em: < <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/012-23.pdf> >. Acesso em: 18/06/2014.

\_\_\_\_\_. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 2009. Acesso em: 18/06/2014.

\_\_\_\_\_. Impact of dengue. 2013a. Disponível em: < <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/> >. Acesso em: 17/03/2014.

\_\_\_\_\_. Traditional medicine. 2013b. Disponível em: < [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/en/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/) >. Acesso em: 24/07/2013.

\_\_\_\_\_. Yellow fever. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/> >. Acesso em: 22/01/2015.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; ROCCO, I. M.; COIMBRA, T. L.; GORIN, P. A.; SIERAKOWSKI, M. R. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Res**, v. 60, n. 3, p. 201-8, 2003.

OTTENDORFER, C. L.; AMBROSE, J. H.; WHITE, G. S.; UNNASCH, T. R.; STARK, L. M. Isolation of genotype V St. Louis encephalitis virus in Florida. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 604-6, 2009.

PARIDA, M. M.; UPADHYAY, C.; PANDYA, G.; JANA, A. M. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. **J Ethnopharmacol**, v. 79, n. 2, p. 273-8, 2002.

PASTORINO, B.; NOUGAIREDE, A.; WURTZ, N.; GOULD, E.; DE LAMBALLERIE, X. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Res**, v. 87, n. 3, p. 281-94, 2010.

PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Res**, v. 80, n. 1, p. 11-22, 2008

PRYOR, M. J.; RAWLINSON, S. M.; BUTCHER, R. E.; BARTON, C. L.; WATERHOUSE, T. A.; VASUDEVAN, S. G.; BARDIN, P. G.; WRIGHT, P. J.; JANS, D. A.; DAVIDSON, A. D. Nuclear localization of dengue virus nonstructural protein 5 through its importin alpha/beta-recognized nuclear localization sequences is integral to viral infection. **Traffic**, v. 8, n. 7, p. 795-807, 2007.

PUJOL, C. A.; RAY, S.; RAY, B.; DAMONTE, E. B. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. **Int J Biol Macromol**, v. 51, n. 4, p. 412-6, 2012.

QUARESMA, J. A.; PAGLIARI, C.; MEDEIROS, D. B.; DUARTE, M. I.; VASCONCELOS, P. F. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. **Rev Med Virol**, v. 23, n. 5, p. 305-18, 2013.

RICO-HESSE, R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. **Virology**, v. 174, n. 2, p. 479-93, 1990.

ROCCO, I. M.; SANTOS, C. L.; BISORDI, I.; PETRELLA, S. M.; PEREIRA, L. E.; SOUZA, R. P.; COIMBRA, T. L.; BESSA, T. A.; OSHIRO, F. M.; LIMA, L. B.; CERRONI, M. P.; MARTI, A. T.; BARBOSA, V. M.; KATZ, G.; SUZUKI, A. St. Louis encephalitis virus: first isolation from a human in São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 47, n. 5, p. 281-5, 2005.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cell Mol Life Sci**, v. 67, n. 16, p. 2773-86, 2010.

RODRIGUES, V. G. **Estudo fitoquímico e atividade biológica de raízes de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek**. 2011. (dissertação de mestrado). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais.

RODRIGUES, V. G.; DUARTE, L. P.; SILVA, G. D. F.; SILVA, F. C.; GÓES, J. V.; TAKAHASHI, J. A.; PIMENTA, L. P. S.; VIEIRA FILHO, S. A. Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. **Química Nova**, v. 35, p. 1375-1380, 2012.

\_\_\_\_\_. Pentacyclic Triterpenes From *Maytenus* Genus As Acetylcholinesterase Inhibitors. **Internat J of Pharma and Pharmaceutical Scien**. 6 2014.

RODRIGUEZ-ROCHE, R.; GOULD, E. A. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 690835, 2013.

ROMERO, J. A. F.; ALONSO, G. D. B.; ÁLVAREZ, B. R.; GUTIÉRREZ, Y.; VALDÉS, V. S.; PARRA, F. In vitro antiviral activity of *Phyllanthus orbicularis* extracts against herpes simplex virus type 1. **Phytotherapy Researc**, v. 17, Issue 8.17: 980-982 p. 2003.

ROSA, R.; COSTA, E. A.; MARQUES, R. E.; OLIVEIRA, T. S.; FURTINI, R.; BOMFIM, M. R.; TEIXEIRA, M. M.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Isolation of saint louis encephalitis virus from a horse with neurological disease in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 11, p. e2537, 2013.

ROSEN, L.; SHROYER, D. A.; TESH, R. B.; FREIER, J. E.; LIEN, J. C. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 32, n. 5, p. 1108-19, 1983.

RUKUNGA, G. M.; KOFI-TSEKPO, M. W.; KUROKAWA, M.; KAGEYAMA, S.; MUNGAI, G. M.; MULI, J. M.; TOLO, F. M.; KIBAYA, R. M.; MUTHAURA, C. N.; KANYARA, J. N.; TUKEI, P. M.; SHIRAKI, K. Evaluation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitory properties of extracts from some medicinal plants in Kenya. **Afr J Health Sci**, v. 9, n. 1-2, p. 81-90, 2002.

SALEEZA, S. N. R.; NORMA-RASHID, Y.; SOFIAN-AZIRUN, M. Mosquitoes larval breeding habitat in urban and suburban areas, Peninsular Malaysia. **World Academy of Science, Engineering and Technology**: 569-573 p. 2011.

SAMPATH, A.; PADMANABHAN, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Res**, v. 81, n. 1, p. 6-15, 2009.

SELISKO, B.; WANG, C.; HARRIS, E.; CANARD, B. Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. **Curr Opin Virol**, v. 9, p. 74-83, 2014.

SILVA, J. R. **Pesquisas de infecções por Flavivírus da Encefalite de Saint Louis, Rocio e Oeste do Nilo em cavalos, por inquérito sorológicos e isolamento viral**. 2010. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SILVA, J. R.; ROMEIRO, M. F.; SOUZA, W. M.; MUNHOZ, T. D.; BORGES, G. P.; SOARES, O. A.; CAMPOS, C. H.; MACHADO, R. Z.; SILVA, M. L.; FARIA, J. L.; CHÁVEZ, J. H.; FIGUEIREDO, L. T. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 4, p. 414-7, Jul 2014.

SIMMONS, C. P.; FARRAR, J. J.; NGUYEN, V.; WILLS, B. Dengue. **N Engl J Med**, v. 366, n. 15, p. 1423-32, 2012.

SIMMONS, M. P.; CAPPAS, J. J.; ARCHER, R. H.; FORD, A. J.; EICHSTEDT, D.; CLEVINGER, C. C. Phylogeny of the Celastreae (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (qat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes. **Mol Phylogenet Evol**, v. 48, n. 2, p. 745-57, 2008.

SIMÕES, L. R.; MACIEL, G. M.; BRANDÃO, G. C.; KROON, E. G.; CASTILHO, R. O.; OLIVEIRA, A. B. Antiviral activity of *Distictella elongata* (Vahl) Urb. (Bignoniaceae), a potentially useful source of anti-dengue drugs from the state of Minas Gerais, Brazil. **Lett Appl Microbiol**, v. 53, n. 6, p. 602-7, 2011.

SMITH, P. F.; OGUNDELE, A.; FORREST, A.; WILTON, J.; SALZWEDEL, K.; DOTO, J.; ALLAWAY, G. P.; MARTIN, D. E. Phase I and II study of the safety, virologic effect, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of single-dose 3-o-(3',3'-dimethylsuccinyl)betulinic acid (bevirimat) against human immunodeficiency virus infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 10, p. 3574-81, 2007.

ST JOHN, A. L.; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nat Rev Microbiol**, v. 11, n. 6, p. 420-6, 2013a.

ST JOHN, A. L.; RATHORE, A. P.; RAGHAVAN, B.; NG, M. L.; ABRAHAM, S. N. Contributions of mast cells and vasoactive products, leukotrienes and chymase, to dengue virus-induced vascular leakage. **Elife**, v. 2, p. e00481, 2013b.

ST JOHN, A. L.; RATHORE, A. P.; YAP, H.; NG, M. L.; METCALFE, D. D.; VASUDEVAN, S. G.; ABRAHAM, S. N. Immune surveillance by mast cells during

dengue infection promotes natural killer (NK) and NKT-cell recruitment and viral clearance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 22, p. 9190-5, 2011.

STAPLES, J. E.; MONATH, T. P. Yellow fever: 100 years of discovery. **JAMA**, v. 300, n. 8, p. 960-2, 2008.

TAKAHASHI, H.; TAKAHASHI, C.; MORELAND, N. J.; CHANG, Y. T.; SAWASAKI, T.; RYO, A.; VASUDEVAN, S. G.; SUZUKI, Y.; YAMAMOTO, N. Establishment of a robust dengue virus NS3-NS5 binding assay for identification of protein-protein interaction inhibitors. **Antiviral Res**, v. 96, n. 3, p. 305-14, 2012.

TALARICO, L. B.; DAMONTE, E. B. Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. **Virology**, v. 363, n. 2, p. 473-85, 2007.

TALARICO, L. B.; PUJOL, C. A.; ZIBETTI, R. G.; FARÍA, P. C.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E.; DAMONTE, E. B. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Res**, v. 66, n. 2-3, p. 103-10, 2005.

TANG, L. I.; LING, A. P.; KOH, R. Y.; CHYE, S. M.; VOON, K. G. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 3, 2012.

TERZIAN, A. C.; MONDINI, A.; BRONZONI, R. V.; DRUMOND, B. P.; FERRO, B. P.; CABRERA, E. M.; FIGUEIREDO, L. T.; CHIARAVALLIOTTI-NETO, F.; NOGUEIRA, M. L. Detection of Saint Louis encephalitis virus in dengue-suspected cases during a dengue 3 outbreak. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 11, n. 3, p. 291-300, 2011.

VAN DER SCHAAR, H. M.; RUST, M. J.; CHEN, C.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; WILSCHUT, J.; ZHUANG, X.; SMIT, J. M. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 12, p. e1000244, 2008.

VELOSO, C. C.; RODRIGUES, V. G.; AZEVEDO, A. O.; OLIVEIRA, C. C.; GOMIDES, L. F.; DUARTE, L. P.; DUARTE, I. D.; KLEIN, A.; PEREZ, A. C. Antinociceptive effects of *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek (Celastraceae) root extract and its tingenone Constituent. **J of Med Plants Research**. 8(1): 68-76 p. 2014.

VERMA, R.; KHANNA, P.; CHAWLA, S. Yellow fever vaccine: an effective vaccine for travelers. **Hum Vaccin Immunother**, v. 10, n. 1, p. 126-8, 2014.

VILELA, A. P. P. **Circulação espaço-temporal de Dengue virus em mosquitpa e humanos: situação de Caratinga, MG, Brasil, 2010-2011**. 2013. (Tese de Doutorado). Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

WANG, L.; CHEN, R. F.; LIU, J. W.; LEE, I. K.; LEE, C. P.; KUO, H. C.; HUANG, S. K.; YANG, K. D. DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 1, p. e934, 2011.

WESTAWAY, E. G.; BRINTON, M. A.; GAIDAMOVICH SYA; HORZINEK, M. C.; IGARASHI, A.; KÄÄRIÄINEN, L.; LVOV, D. K.; PORTERFIELD, J. S.; RUSSELL, P. K.; TRENT, D. W. Flaviviridae. **Intervirol**, v. 24, n. 4, p. 183-92, 1985

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, n. 14, p. 8698-706, 2005.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 7, p. 518-28, 2007.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C. P. The pathogenesis of dengue. **Vaccine**, v. 29, n. 42, p. 7221-8, 2011.

ZANDI, K.; TEOH, B.; SAM, S.; WONG, P.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S. in vitro antiviral activity of fisetin, rutin and naringenin against Dengue virus type-2. **J of Med Plants Research**. 5: 5534-5539 p. 2011a.

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. **Virol J**, v. 8, p. 560, 2011b.

ZANDI, K.; TEOH, B. T.; SAM, S. S.; WONG, P. F.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S. Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 214, 2012.

ZHANG, L.; MOHAN, P. M.; PADMANABHAN, R. Processing and localization of Dengue virus type 2 polyprotein precursor NS3-NS4A-NS4B-NS5. **J Virol**, v. 66, n. 12, p. 7549-54, 1992.

ZOU, J.; LEE, L. T.; WANG, Q. Y.; XIE, X.; LU, S.; YAU, Y. H.; YUAN, Z.; GEIFMAN SHOCHAT, S.; KANG, C.; LESCAR, J.; SHI, P. Y. Mapping the interactions between the NS4B and NS3 proteins of dengue virus. **J Virol**, 2015.

# ANEXO 1

## SLEV-Contig

ACAACATTGGATGAAAAGCGAGAGAAAAAGACGGGAGAATTTGGGAAGCCAAAGGAAGCA  
 GAGCCATCTGGTACATGTGGCTAGGAGCTCGGTTTTTTGGAGTTTGAAGCTCTCGGGTTTT  
 TAAATGAAGATCACTGGATGAGCCGCGAGAATCACATGGGGGAGTTGAGGGGAAAGGAC  
 TCCAAAAACTCGGATACATCCTACAAGAAAATCCTCCAAATTCAGGAGGAAAGATGTATG  
 CTGATGACACCGCCGGCTGGGACACAACCTTTTTTCTCTCGCTTTCCCATCATGTTGTA

**Sequences producing significant alignments:**  
 Select: All None Selected:0  
 Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_isolate_BeH35864_complete_genome	446	446	84%	1e-121	98%	<a href="#">KM267635.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_BeAn_246262_polyprotein_gene_partial_cds	429	429	84%	1e-116	97%	<a href="#">EF158053.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_75_D_90_polyprotein_gene_partial_cds	401	401	84%	2e-108	95%	<a href="#">EF158054.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_TRVL_9464_polyprotein_gene_partial_cds	396	396	84%	1e-106	95%	<a href="#">EF158056.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_BeAn_247377_polyprotein_gene_partial_cds	390	390	84%	5e-105	94%	<a href="#">EF158067.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_BE_AN_246262_NS5_gene_partial_cds	381	381	74%	3e-102	98%	<a href="#">EU088424.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_FLU3632_polyprotein_gene_complete_cds	379	379	84%	1e-101	94%	<a href="#">KF589299.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_isolate_Imperial_Valley_complete_genome	379	379	84%	1e-101	94%	<a href="#">JF460774.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_GiML_902612_polyprotein_gene_partial_cds	379	379	84%	1e-101	94%	<a href="#">EF158064.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_BeAr_23379_polyprotein_gene_partial_cds	379	379	84%	1e-101	94%	<a href="#">EF158048.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_ChaAr-4005_complete_genome	374	374	84%	5e-100	93%	<a href="#">EJ753286.2</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_polyprotein_gene_complete_cds	374	374	84%	5e-100	93%	<a href="#">AY632544.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_89_M_114.3_polyprotein_gene_partial_cds	370	370	84%	7e-99	93%	<a href="#">EF158061.2</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_85_V_310_polyprotein_gene_partial_cds	370	370	84%	7e-99	93%	<a href="#">EF158059.1</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_79V-2533_complete_genome	368	368	84%	2e-98	93%	<a href="#">FJ753287.2</a>
<input type="checkbox"/> SL_Louis_encephalitis_virus_strain_CorAn_9275_polyprotein_gene_partial_cds	368	368	84%	2e-98	93%	<a href="#">EF158068.1</a>

## ANEXO 2

### YFV-Contig

ATGGTATATGTGGCTGGGAGCGCGGTATCTTGAGTTTGAGGCCCTGGGATTCCTGAATGA  
 GGACCATTTGGGCTTCCAGGGAAAACCTCAGGAGGAGGAGTGGAAGGCATTGGCTTACAATA  
 CCTAGGATATGTGATCAGAGACCTGGCTGCAATGGATGGTGGTGGATTCTACGCTGATGA  
 CACCGCCGGCTGGGACACAAACCTGTTTTCTCTCTCTCTCCCATCATGTTATAATGTT  
 GTAANNCTTCTTTGCTAGCTCTCTGNTCATGTTGCAAGAATCCCAGGGCCTCAAACCTCAA  
 GATACCGCGCTCCAGCCACATATACCATATGGCACGGCTTCCCTTTGCTTTCCCAAACCT  
 CTGACAGCTTTTTCTCTCGCTTTCCCATCATGTTGTA

**Sequences producing significant alignments:**  
 Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus strain 17D poliprotein gene, complete cds</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">JX949181.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus strain Asibi, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">KF769016.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus strain 17D-204, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">KF769015.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus 17D YF-VAX Vero adapted Series C P11, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">JN811143.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus 17D YF-VAX Vero adapted Series B P11, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">JN811142.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus 17D YF-VAX Vero adapted Series A P11, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">JN811141.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus strain YFVaccine/USASanofi-Pasteur-17D-204/JF795AAVfVax, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">JX503529.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus strain 17D RKI, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">JN628279.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus strain 17D Flamun WSL, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">JN628280.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus strain case #2, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">G0379163.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus strain case #1, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">G0379162.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus 17D/Tiantan, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">FJ654700.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus strain 17DD-Brazil, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">D0100292.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Yellow fever virus isolate YF-AVD2791-93F/04 from Spain, complete genome</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">D0118157.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">YFV recilon vector orIME-def, complete sequence</a>	350	550	80%	1e-92	98%	<a href="#">D0322635.1</a>