

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Parasitária

LUCIANA GOMES FIALHO

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADOR E
ANTIVIRAL DE UMA ESPÉCIE DA FAMÍLIA *MARCGRAVIACEAE* EM MODELO
IN VITRO DE INFECÇÃO EM LINHAGEM DE HEPATÓCITOS HUH-7
PELO VÍRUS DENGUE-2**

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

Orientadora: Dr^a. Claire Fernandes Kubelka

RIO DE JANEIRO

2012

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

F438 Fialho, Luciana Gomes

Caracterização dos efeitos imunomodulador e antiviral de uma espécie da família Marcgraviaceae em modelo in vitro de infecção em linhagem de hepatócitos HuH-7 pelo vírus dengue-2 / Luciana Gomes Fialho. – Rio de Janeiro, 2012.

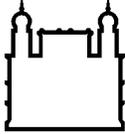
xvi, 105 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2012.

Bibliografia: f. 86-105

1. Dengue. 2. Plantas medicinais. 3. Imunomodulação. 4. Antiviral. I. Título.

CDD 616.91852



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: Luciana Gomes Fialho

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS IMUNOMODULADOR E
ANTIVIRAL DE UMA ESPÉCIE DA FAMÍLIA MARCGRAVIACEAE EM MODELO
IN VITRO DE INFECÇÃO EM LINHAGEM DE HEPATÓCITOS HUH-7
PELO VÍRUS DENGUE-2**

ORIENTADORA: Dr^a. Claire Fernandes Kubelka

EXAMINADORES:

Dr. Valber da Silva Frutuoso - Presidente

Dr^a. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Dr^a. Iranaia Assunção Miranda

Dr^a. Flávia Barreto dos Santos

Dr^a. Sônia Regina Nogueira Ignácio Reis

Rio de Janeiro, 23 de outubro de 2012

Dedico esta dissertação às pessoas que sempre acreditaram em mim e me deram força para alcançar mais esta vitória em minha vida. Minha família e ao meu amado namorado Rafael, que estiveram ao meu lado durante toda essa caminhada. Obrigada, amo muito vocês!!!

“Não desista enquanto você ainda for capaz de fazer um esforço a mais. É nesse algo a mais que está a sua vitória”

Roberto Shinyashik

AGRADECIMENTOS

À Deus, simplesmente por tudo, pela vida, pela família, pela saúde e por todas as conquistas;

Aos meus pais Sandra e Valter e minha irmã Andréa, pela agradável convivência de cada dia, pelos momentos de carinho e alegria, pelos conselhos, pela força e confiança na minha capacidade de vencer;

Aos meus avós, Líbia, Walter e Ana, pelo carinho, amor e por torcerem sempre pelo meu sucesso e acreditarem em mim. Em especial, ao meu avô Walter, por ser meu grande exemplo de coragem e, principalmente, de força. Meu grande guerreiro e vencedor na vida;

Ao meu namorado Rafael, pela maravilhosa companhia de todos esses anos, pela confiança, por tantos momentos felizes, pela força, pelo incentivo e por acreditar na minha vitória;

Aos meus cachorrinhos Nick e Falk, por toda a felicidade que me proporcionam, pela companhia, por tornarem os meus dias ainda mais alegres;

À todos do Laboratório de Imunologia Viral, e aos que já passaram por ele, pela amizade, respeito e imensa familiaridade com que me receberam desde o início. Em especial, à Sônia, a qual teve grande importância no começo de minha vida científica, a quem devo enormes aprendizados e que tornou-se, também, uma grande amiga;

Ao Raimundo Júnior e Cíntia Mello, pela colaboração nos ensaios das cinéticas de infecção e do perfil de citocinas;

À amiga e companheira de laboratório, Amanda Torrentes de Carvalho, por tornar nosso ambiente de trabalho mais agradável, por ser uma pessoa prestativa, alegre e pela grande amizade;

À Dr^a. Maria Raquel Figueiredo e ao MSc Vagner Pereira da Silva, do laboratório de Produtos Naturais, PN3 - Far-Manguinhos/FIOCRUZ, pela obtenção e fornecimento dos compostos vegetais utilizados neste estudo e pela colaboração;

À Dr^a. Claire Fernandes Kubelka, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo incentivo e estímulo à carreira científica, a qual, além de orientadora, tornou-se uma grande amiga;

Aos integrantes da banca, pela gentileza de aceitarem o convite;

À CAPES, CNPq e FAPERJ, pelo apoio científico e financeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

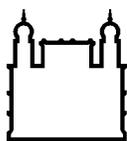
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização dos efeitos imunomodulador e antiviral de uma espécie da família *Marcgraviaceae* em modelo *in vitro* de infecção em linhagem de hepatócitos HuH-7 pelo vírus dengue-2.

RESUMO

Luciana Gomes Fialho

Várias doenças relacionadas à desregulação do sistema imunológico têm sido, há muito tempo, tratadas com a medicina fitoterápica, considerando que vários efeitos terapêuticos podem ser induzidos pela modulação de citocinas. Entretanto, não são encontrados relatos científicos do uso de plantas medicinais na dengue. A identificação de compostos com propriedades imunomoduladoras é extremamente importante para o tratamento da dengue, uma vez que a gravidade da doença está relacionada a uma produção exacerbada da resposta imunológica, principalmente, de citocinas que podem levar à distúrbios hemodinâmicos e de coagulação. A família *Marcgraviaceae*, pertencente à flora brasileira, tem sido avaliada quanto às suas atividades biodinâmicas, devido ao seu quase completo ineditismo químico e farmacológico. A atividade anti-inflamatória dessa família tem sido descrita por alguns autores. Assim sendo, o objetivo principal do trabalho foi caracterizar os potenciais antivirais e imunomoduladores de uma espécie de *Marcgraviaceae*. Foi estabelecido e utilizado um modelo *in vitro* cultivando uma linhagem de hepatócitos – as células HuH-7- que foram infectadas com DENV-2. As células HuH-7 infectadas foram incubadas, por 48 horas, com uma fração butanólica e 4 subfrações (26-30, 40-43, 89-98 e 99-134) derivadas de um extrato bruto etanólico de folhas de uma espécie de *Marcgraviaceae*. As amostras passaram por uma triagem, a qual identificou a atividade antiviral das mesmas, através da detecção do antígeno viral (DENV Ag) nas células HuH-7, pela citometria de fluxo e a atividade imunomoduladora, através da dosagem de MIF, por ELISA, no sobrenadante das culturas infectadas e tratadas. Os resultados da triagem indicaram que a fração butanólica e sua subfração 89-98 apresentaram ambas as atividades, sendo selecionadas para os demais estudos de caracterização dos mecanismos de ação. Após a seleção, a atividade antiviral destas frações/subfrações foram avaliadas quanto à produção de óxido nítrico (NO), através da reação de Griess, e detecção da proteína viral NS1, através de ELISA. A ação imunomoduladora foi avaliada através da dosagem de IL-8 também por ELISA. Nossos resultados demonstraram que a fração butanólica e sua subfração 89-98, foram capazes de reduzir a taxa de produção de NS1, além de estimular a produção de NO pelas células HuH-7. Além disso, a subfração 89-98 também reduziu a produção de IL-8. Em conclusão, acreditamos que estas frações/subfrações sejam boas candidatas para o desenvolvimento de fitoterápicos a serem usados no tratamento da dengue. Considerando que o organismo é capaz de controlar a infecção por DENV em poucos dias e que as reações imunológicas possuem um papel importante na patogênese da dengue, o estudo de fatores imunomoduladores é uma abordagem de investigação inovadora e relevante.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Characterization of the antiviral and immunomodulatory effects of a specie from *Marcgraviaceae* family in an *in vitro* infection model on hepatocyte lineage HuH-7 by dengue-2 virus.

ABSTRACT

Luciana Gomes Fialho

Various diseases related to immunodesregulation have been long treated by herbal medicine, considering that several therapeutical effects are observed in the modulation of cytokines. However, there are few reports regarding to the use of medicinal plants in dengue. The identification of compounds with immunomodulatory properties is extremely important for the treatment of dengue, since the disease severity is related to an exacerbated production of the immunological response, mainly cytokines that may lead to hemodynamic and coagulation disorders. *Marcgraviaceae*, a family of the Brazilian flora, has been evaluated for its biodynamic activities, due to its almost complete chemical and pharmacological uniqueness. The anti-inflammatory activity of this family has been described by some authors. Therefore, the aim of this work was to characterize the antiviral and immunomodulator potentials of a *Marcgraviaceae* species. It was established and used an *in vitro* model cultivating an hepatocyte cell line – HuH-7 cells – that were infected with DENV-2. Infected, HuH-7 cells were incubated with a buthanolic fraction and four subfractions ((26-30, 40-43, 89-98 e 99-134) derived from a crude ethanol leave extract from a *Marcgraviaceae* species, for 48 hours. The samples went through a screening that revealed their antiviral activity, by detection of viral antigen (Ag DENV) in HuH-7 cells, using flow cytometry. The immunomodulator activity was measured by ELISA detecting MIF levels in the supernatant of infected and treated cultures. The results of screening indicated that the buthanolic fraction and its subfraction 89-98 presented both activities, being selected for the other studies to characterize the mechanisms of action. After selection, the antiviral activity of these fractions/subfractions were evaluated for the production of nitric oxide (NO) by Griess reaction, and viral protein NS1 detection, by ELISA. The immunomodulator action was evaluated by IL-8 measurement by ELISA as well. Our results demonstrated that the buthanolic fraction and its subfraction 89-98 were able to reduce NS1 production ratio, besides stimulating NO production by HuH-7 cells. Furthermore, the 89-98 subfraction also reduced IL-8 production. In conclusion, we believe that these are good candidates for the development of herbal medicines for the treatment of dengue. Considering that the host is able to control infection by DENV in a few days and that immune responses develop an important role in the pathogenesis of dengue, the study of immunomodulatory factors is a relevant approach in research.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Epidemiologia e histórico da dengue.....	1
1.1.1 Dengue nas Américas e no Brasil.....	2
1.2- O vírus Dengue (DENV).....	6
1.2.1- Características estruturais.....	6
1.2.2 – Vetor e transmissão.....	9
1.2.3- Ciclo de vida: células-alvo e replicação viral.....	10
1.3- Manifestações clínicas.....	14
1.3.1- Dengue (com ou sem sinais de alerta).....	14
1.3.2- Dengue grave.....	15
1.4- Imunopatogenia da dengue.....	16
1.4.1- Teoria da facilitação dependente de anticorpos (ADE).....	17
1.4.2- Teoria da virulência viral.....	18
1.4.3- Teoria do pecado original.....	19
1.4.4- Teoria do mimetismo molecular.....	19
1.4.5- Teoria do polimorfismo genético.....	20
1.4.6- Teoria multifatorial.....	21
1.5- O papel de citocinas/mediadores inflamatórios na dengue.....	21
1.6- Dengue e plantas medicinais.....	25
1.7-Plantas medicinais - Uso histórico.....	27
1.7.1- Família <i>Marcgraviaceae</i>	30
2- OBJETIVOS.....	33
2.1- Geral.....	33
2.2- Específicos.....	33
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1- Meios de cultura e reagentes.....	34
3.2- Soluções.....	35
3.3- Anticorpos.....	37
3.4- Metodologia.....	38
3.4.1- Cepa viral.....	38
3.4.2- Produção de massa viral.....	38
3.4.2a- Titulação da massa viral.....	39

3.4.3- Amostras vegetais.....	39
3.4.3a- Obtenção e diluição das amostras vegetais.....	39
3.4.4- Cultura de células HuH-7.....	40
3.4.5- Infecção de células HuH-7.....	40
3.4.5a- Cinética da infecção.....	41
3.4.5b- Cinética do perfil das citocinas.....	41
3.4.5c- Tratamento de células HuH-7 com frações /subfrações.....	41
3.4.6- Ensaio de citotoxicidade por MTT.....	41
3.4.7- Citometria de fluxo.....	42
3.4.7a- Marcação intracelular do antígeno viral.....	42
3.4.8- Imunofluorescência indireta.....	43
3.4.8a- Detecção do antígeno viral.....	43
3.4.9- Detecção de citocinas e outros fatores solúveis nos sobrenadantes das culturas de células HuH-7.....	44
3.4.9a- Detecção quantitativa de MIF.....	44
3.4.9b- Detecção quantitativa de IL-8.....	45
3.4.9c- Detecção quantitativa de TNF- α	45
3.4.9d- Detecção de NS1.....	46
3.4.10- Reação de Griess.....	46
3.4.11- Análise estatística.....	46
4- RESULTADOS.....	47
4.1- Estabelecimento do modelo de infecção <i>in vitro</i> de células HuH-7 por DENV-2 para estudo dos efeitos antivirais e imunomoduladores de plantas medicinais.....	47
4.1.1- Cinética de infecção <i>in vitro</i> pelo DENV-2 em linhagens de hepatócitos (células HuH-7).....	47
4.1.2- Cinética da produção de citocinas/mediadores inflamatórios <i>in vitro</i> pelas células HuH-7 infectadas por DENV-2.....	54
4.2- Triagem das frações/subfrações de <i>Marcgraviaceae</i>	56
4.2.1- Avaliação da citotoxicidade celular por MTT.....	56
4.2.2- Avaliação da atividade antiviral das frações /subfrações em células HuH-7 por citometria de fluxo.....	58
4.2.3- Avaliação da atividade imunomoduladora das frações/subfrações em células HuH-7 por ELISA.....	60

4.2.4- Caracterização de um possível efeito citotóxico das frações/subfrações por citometria de fluxo.....	62
4.3- Seleção das frações/subfrações de <i>Marcgraviaceae</i>	67
4.4- Avaliação do efeito do tratamento com as amostras seleccionadas em células HuH-7 infectadas com DENV-2.....	67
4.4.1- Avaliação do efeito antiviral das amostras seleccionadas através da dosagem de NS1 no sobrenadante das culturas de células HuH-7.....	67
4.4.2- Avaliação do efeito antiviral das amostras seleccionadas através da dosagem de óxido nítrico no sobrenadante das culturas de células HuH-7.....	70
4.4.3- Comparação do efeito antiviral avaliado por citometria de fluxo, detectando antígeno viral intracelular, e pela dosagem de NS1 e NO no sobrenadante das culturas de células HuH-7.....	70
4.4.4- Avaliação do efeito imunomodulador das amostras seleccionadas através da dosagem de interleucina-8.....	72
4.4.5- Comparação do efeito antiviral com o imunomodulador de IL-8 e MIF.....	72
5- DISCUSSÃO.....	74
6- CONCLUSÃO.....	84
7- PERSPECTIVAS.....	85
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADE**= Facilitação dependente de anticorpo (do inglês *antibody-dependent enhancement*)
- Ag**= Antígeno
- BHK**= Célula de rim de hamster bebê
- BSA**= Albumina sérica bovina
- CBA**= Do inglês *Cytometric Bead Array*
- CD14**= Do inglês *cluster differentiation 14*
- CD209**= Do inglês *cluster differentiation 209*
- CLEC5**= Domínio de lectina tipo-C da família 5
- CLR**= Receptores lectina tipo-C
- CO₂**= Gás carbônico
- CPE**= Efeito citopático
- CTLA-4**= Proteína associada ao Linfócito T citotóxico-4
- DAPI**= 4',6-Diamidino-2-Phenylindole
- DC**= Célula Dendrítica (do inglês *dendritic cell*)
- DC-SIGN**= Ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de DC (do inglês *Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*)
- DENV**= Vírus da Dengue
- DM**= Diabetes mellitus
- DMSO**= Dimetilsulfóxido
- DNA**= Ácido desoxirribonucléico
- D.p.i**= Dia após a infecção
- ELISA**= Método Imunoenzimático (do inglês *Enzyme-linked Immunossorbent Assay*)
- FACs**= Do inglês *Fluorescence-activated cell sorting*
- Fc**= Fragmento cristalizado
- FcR**= Receptor para porção Fc de anticorpos
- FD**= Febre do Dengue
- FHD**= Febre Hemorrágica do Dengue
- FITC**= Isotiocianato de fluoresceína
- FSC**= Do inglês *Forward Scatte*
- GFP**= Proteína fluorescente verde
- G6PD**= Glicose-6P desidrogenase
- GRP78/BiP**= Proteína reguladora de glicose 78

HepG2= Do inglês *Human hepatocellular liver carcinoma cell line*

HLA= Antígeno leucocitário humano (do inglês *human leukocyte antigen*)

Hsp70= Proteína do choque térmico 70

Hsp90= Proteína do choque térmico 90

HUVEC= Célula endotelial de veia umbilical humana

HRP= Do inglês *Horseradish Peroxidase*

ICAM-1= Molécula de adesão intercelular-1

IDO= indolamina 2,3 dioxigenase

IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ = Interferon- $\alpha/\beta/\gamma$

IgG= Imunoglobulina G

IL-1 β = Interleucina 1 β

IL-6= Interleucina-6

IL-8= Interleucina-8

IL-12= Interleucina-12

IL-10= Interleucina=10

IL-15= Interleucina-15

iNOS= Enzima óxido nítrico sintase induzida

IOC= Instituto Oswaldo Cruz

IP-10= Proteína induzida por Interferon γ

IRF-3= Fator Regulador de Interferon-3

LIN= Laboratório de instrumentação nuclear

LPS= Lipopolissacarídeo

MCP-1= Proteína quimiotática de monócitos-1

MIF= Fator inibidor da migração de macrófagos

MIP-1 α/β = Proteína inflamatória de macrófago-1 α/β (do inglês *macrophage inflammatory protein- 1 α/β*)

MR= Receptor de manose

MTT= Do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*

NAP=Do inglês *N-acetyl-DL-penicillamine*

NC= Nucleocapsídeo

NF κ B= Fator nuclear kappa B

NO= Óxido Nítrico

NO₂⁻= Nitrito

NO₃⁻= Nitrato

OMS= Organização Mundial de Saúde (do inglês *WHO- World Healthy Organization*)

OPAS= Organização Panamericana de Saúde

ORF= Do inglês *Open Reading Frame*

PBS= Solução salina tamponada

PI= Iodeto de Propídio

PrM= Pré-Membrana

Proteína C= Proteína do capsídeo

Proteína E= Proteína do envelope

Proteína M= Proteína de membrana

Proteína NS= Proteína não estrutural (do inglês *nonstructural protein*)

RANTES= Ligante de quimiocinas regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais

RdRp= RNA polimerase - dependente de RNA

RE= Retículo endoplasmático

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

RT-PCR= Reação da polimerase em cadeia em tempo real

SBF= Soro Fetal Bovino

SCD= Síndrome do choque do dengue

SNAP= Do inglês *S-nitroso-N-acetylpenicillamine*

SSC= Do inglês *Side SCatter Detector*

STAT 1/2= Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1/2 (do inglês *signal transducer and activator of transcription*)

SVS/MS= Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

T.A.= Temperatura ambiente

T CD4= Células T auxiliares

T CD8= Células T citotóxicas

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

TGF-β= Fator de crescimento transformante- β (do inglês *transforming growth factor*)

TMB= Do inglês *3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine*

TNF-α = Fator de Necrose tumoral- α (do inglês *tumor necrosis factor-α*)

TRAIL= Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

UFRJ= Universidade Federal do Rio de Janeiro

WHO= Do inglês *World Healthy Organization*

ZO-1= Proteína de junção estreita-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Sorotipos do DENV circulantes no Brasil por UF em Janeiro de 2012.....	4
Figura 1.2- Casos de dengue por semana epidemiológica. Brasil, 2011 e 2012.....	5
Figura 1.3- Distribuição mundial dos casos de dengue no início do ano de 2012.....	5
Figura 1.4- Organização do genoma do DENV.....	6
Figura 1.5- Estrutura da proteína do envelope do DENV (A) e a partícula viral (B)....	7
Figura 1.6- O primeiro contato do DENV com o hospedeiro.....	11
Figura 1.7- Nova classificação da dengue, revisada em 2009 pela OMS.....	16
Figura 1.8- Médicos da Antiguidade grega: Hipócrates e Avicenna.....	27
Figura 1.9- Distribuição geográfica mundial da família <i>Marcgraviaceae</i>	30
Figura 1.10- Exemplo fotográfico de uma espécie da família utilizada neste estudo.....	31
Figura 4.1- Marcação do antígeno viral por citometria de fluxo na população de células HuH-7.....	49
Figura 4.2- Cinética da infecção de DENV-2 em células HuH-7 realizada por citometria de fluxo.....	50
Figura 4.3- Detecção de DENV por microscopia 24 horas após a infecção de hepatócitos HuH-7.....	51
Figura 4.4- Detecção de DENV por microscopia 48 horas após a infecção de hepatócitos HuH-7.....	52
Figura 4.5- Detecção de DENV por microscopia 72 horas após a infecção de hepatócitos HuH -7.....	53
Figura 4.6- Cinética do perfil das citocinas durante infecção pelo DENV-2.....	55
Figura 4.7- Avaliação da citotoxicidade celular por MTT de compostos originados de uma espécie de <i>Marcgraviaceae</i>	57
Figura 4.8- Avaliação da atividade antiviral da fração butanólica e subfrações originadas de extrato etanólico de <i>Marcgraviaceae</i>	59

Figura 4.9- Avaliação da atividade imunomoduladora da fração butanólica e subfrações originadas de extrato etanólico de <i>Marcgraviaceae</i>	61
Figura 4.10- Alteração do perfil de tamanho e granulosidade evidenciando possível efeito citotóxico da subfração 26-30 no tratamento de células HuH-7 não infectadas.....	63
Figura 4.11- Alteração do perfil de tamanho e granulosidade evidenciando possível efeito citotóxico da subfração 40-43 no tratamento de células HuH-7 não infectadas.....	64
Figura 4.12- Alteração do perfil de tamanho e granulosidade evidenciando possível efeito citotóxico da subfração 89-98 no tratamento de células HuH-7 não infectadas.....	65
Figura 4.13- Alteração do perfil de tamanho e granulosidade evidenciando possível efeito citotóxico da subfração 99-134 no tratamento de células HuH-7 não infectadas.....	66
Figura 4.14- Detecção de NS1 em células HuH-7 submetidas a diferentes tratamentos.....	69
Figura 4.15- Dosagem de NO ₂ ⁻ em culturas de células HuH-7 submetidas a diferentes tratamentos.....	71
Figura 4.16- Dosagem de IL-8 em células HuH-7 submetidas a diferentes tratamentos	73

1- INTRODUÇÃO

1.1- Epidemiologia e histórico da dengue

A dengue é uma doença antiga e bem adaptada ao homem causando sintomas brandos na maioria dos casos, mas podendo evoluir para uma forma grave com riscos de morbidade e mortalidade (1, 2). A dengue é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente por *Aedes aegypti*, constituindo uma das arboviroses mais importantes a nível mundial em termos de morbidade, mortalidade e afeto na economia (3, 4). A doença é endêmica em mais de 100 países, particularmente na Ásia e América Latina (5). Dentre as doenças virais transmitidas por mosquitos, a dengue é a que se espalha mais rapidamente no mundo. Nos últimos 50 anos, houve um aumento de 30% em sua incidência com expansão geográfica para novos países (6). Estima-se que 50 milhões de infecções ocorrem anualmente, sendo que aproximadamente 2.5 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos (7).

A origem das infecções humanas pelo vírus dengue (DENV) não é bem definida. Possivelmente, a mudança do vetor, do ambiente florestal para o rural, devido às derrubadas das florestas e desenvolvimento dos povoados, seja a principal causa. Adaptado ao ambiente peridoméstico, o mosquito encontrou condições que favoreceram seu desenvolvimento e, assim, conseguiu disseminar o vírus. Outra hipótese é que o vírus tenha surgido na África e espalhou-se pelo mundo através do tráfico de escravos. Sua introdução neste continente teria ocorrido devido à expansão do comércio internacional, durante os séculos XVII, XVIII e XIX, principalmente nas cidades portuárias, pois mosquitos infectados chegavam nos porões dos navios (8). A maioria das epidemias de dengue ocorreu nas Américas, sul da Europa, norte da África, Mediterrâneo, Ásia, Austrália, Índia, Oceania, regiões sul e central do Pacífico e no Caribe, no final do século XVIII, durante o século XIX e início do XX. O mosquito adaptou-se muito bem ao ambiente urbano, vivendo próximo à população e se reproduzindo de forma eficiente. A urbanização desenfreada, ao longo e no final do século XX, levou a um aumento da população vivendo em áreas de alta densidade, onde sistemas de abastecimento e esgoto eram inadequados. Dessa forma, o *Aedes aegypti* conseguiu encontrar condições ideais para seu crescimento, resultando num aumento dramático nos casos de febre do dengue (FD), e o surgimento da forma mais grave, a febre

hemorrágica da dengue (FHD), tornando-se a doença, um grande problema de saúde pública nas Américas e na Ásia (8).

1.1.1- Dengue nas Américas e no Brasil

Nas Américas, a FD surgiu durante a Segunda Guerra Mundial, havendo evidências de uma endemia pelo DENV-2 na região do Caribe, porém a primeira epidemia americana foi registrada em 1963. Nas décadas de 40, 50 do século passado, estava sendo realizada uma intensa campanha de combate ao vetor *Aedes aegypti*, pela Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), com a finalidade de se diminuir a transmissão urbana do vírus da febre amarela (8). Porém, com a descontinuidade do combate ao mosquito, o vetor *A. aegypti* foi reintroduzido na América, levando ao ressurgimento das epidemias de FD. O acelerado crescimento e urbanização da população, associado à insuficiência no controle do vetor e ao aumento do trânsito de pessoas entre os países são fatores associados à emergência da dengue e suas formas graves nas Américas (8).

A primeira principal epidemia de dengue americana ocorreu em Cuba em 1977/1978 e foi causada pelo DENV-1. Foi implantado, então, um programa de combate efetivo e de sucesso, deixando o país livre da doença por 16 anos (9). O DENV-1 e DENV-4 foram introduzidos, assim como um novo subtipo do DENV-2, neste continente (10). Durante o período de 1981 a 1997 foram confirmados casos de FHD em 24 países (11). No ano de 1989, ocorreu uma epidemia de FHD na Venezuela e uma nova epidemia em Cuba, no ano de 1997. Ambas foram causadas pelo DENV-2, não havendo casos graves, na epidemia de 1997, entre crianças (9).

Na região das Américas tem ocorrido um crescimento progressivo de casos de dengue durante as três últimas décadas levando à extensão da doença por quase a totalidade dos países (12). Em 2002, um milhão de casos de FD foram notificados em mais de 30 países latino-americanos. Já a FHD ocorreu em 20 países com mais de 17.000 casos notificados, havendo 225 mortes (13).

O Brasil, por ser um dos países que aderiram ao programa de erradicação da OPAS, conseguiu erradicar o mosquito *Aedes* nas décadas de 40 e 50 (14). Com isso, o vírus somente ressurgiu no país no início da década de 80 (15).

A reinfestação, no Brasil, pelo vetor levou à primeira epidemia de FD diagnosticada laboratorialmente no país, que ocorreu em Boa Vista no estado de Roraima em 1981/1982, sendo o DENV-1 e o DENV-4, os sorotipos responsáveis,

respectivamente (16). No Rio de Janeiro, as epidemias ocorridas no ano de 1986 foram causadas pelo DENV-1 (17). O DENV-2 foi detectado pela primeira vez no Rio de Janeiro durante uma epidemia em 1990, e a circulação simultânea do DENV-1 e DENV-2 foi correlacionada com o surgimento dos primeiros casos de FHD no Estado, onde foram notificados 1.952 casos de FHD, com 24 mortes (18).

O DENV-3 foi inserido no país em Limeira em 1999, estado de São Paulo, porém casos autóctones só foram relatados em 2001, quando este sorotipo foi isolado no estado do Rio de Janeiro, sendo considerado o mais virulento no país (19).

Em 2001/2002 uma grande epidemia, ocasionada pelo DENV-3, atingiu o estado do Rio de Janeiro e se propagou para outros estados, ocasionando mais de 30 mortes por FHD. O DENV-2 foi reintroduzido no ano de 2008, encontrando uma parte significativa de indivíduos não imunes e outra parte provavelmente já infectada por outro sorotipo (DENV-1 ou DENV-3) (20, 21).

Em julho de 2010 foram relatados casos de infecção branda pelo DENV-4 na região Norte do Brasil, no estado de Roraima, após 28 anos sem a circulação deste sorotipo no país. De acordo com estudos filogenéticos, a reintrodução desta cepa viral ocorreu a partir da Venezuela, onde o DENV-4 circula desde 1980. Também em 2010, foi detectada a circulação de DENV-1 e -2 (22). As atividades de vigilância virológica em 2011 destacaram o predomínio da circulação do sorotipo DENV-1 no país, com isolamento em 86,1% das amostras positivas. Foram constatadas, também, uma co-circulação importante dos sorotipos DENV-2 e DENV-4 no Brasil (23). O monitoramento dos sorotipos circulantes até abril deste ano, demonstra que o sorotipo 4 é o predominante no Brasil, no momento, seguido do sorotipo 1. Já na região Sudeste há um equilíbrio entre o sorotipo 1 e 4 do vírus (**Figura 1.1**) (24) .

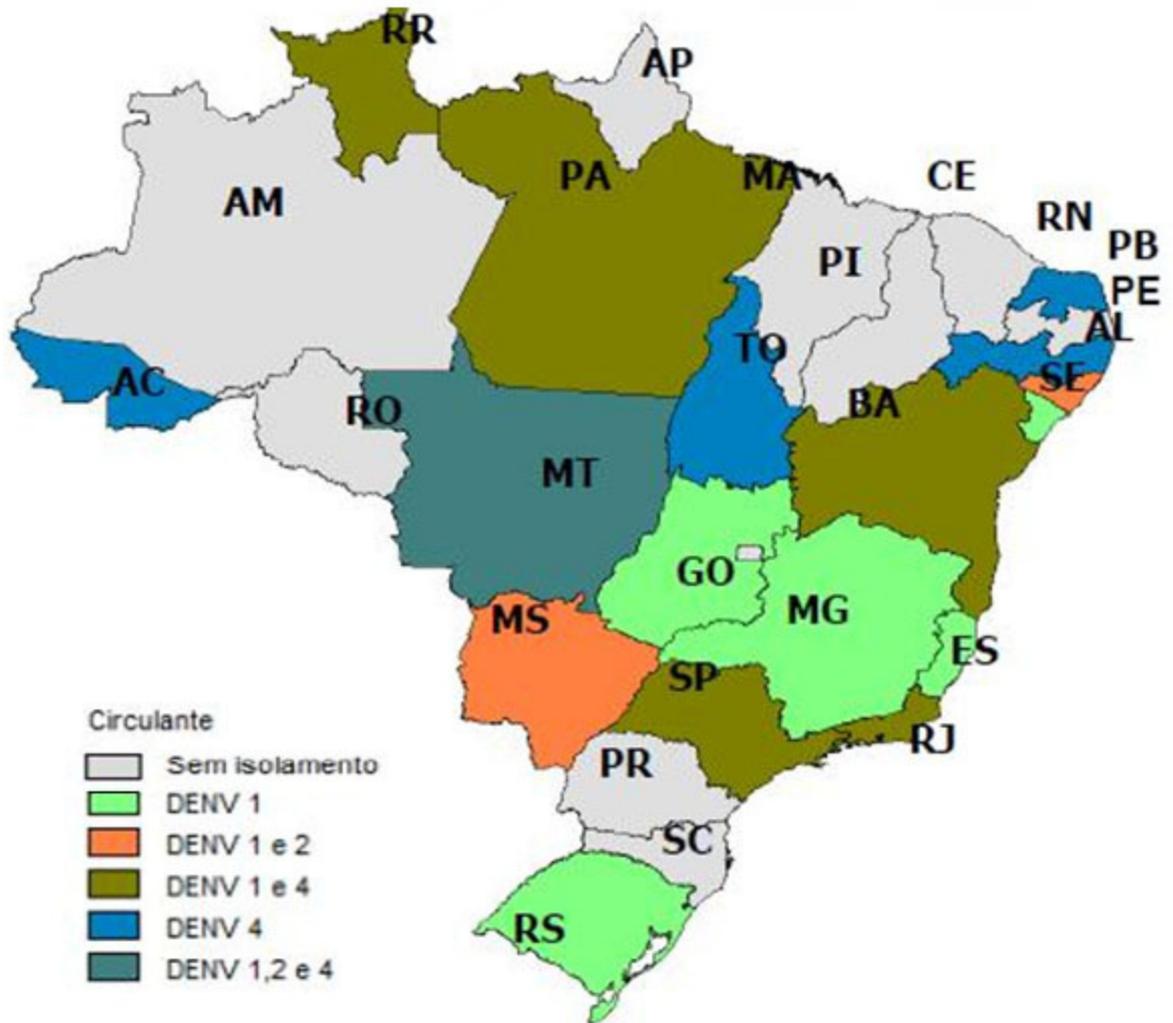
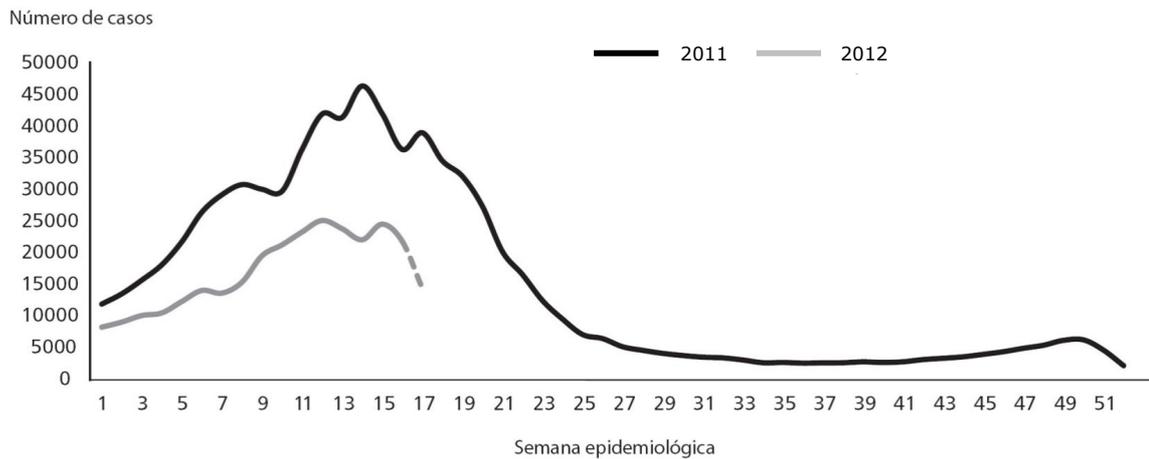


Figura 1.1. Sorotipos do DENV circulantes no Brasil por UF em Janeiro de 2012. Fonte: <http://www.defesacivil-ap.com.br/porta/noticias/16defesadivulgainformacaodengue.html>, acessado em setembro de 2012 (25).

Entre os meses de janeiro a abril deste ano, foram confirmados mais de 200.000 casos de dengue no país, havendo uma redução de 44% dos casos, comparado ao mesmo período do ano de 2011 (**Figura 1.2**). Entre os casos confirmados, mais de 1000 são graves e estão concentrados, em sua maioria, na região Sudeste. O número de óbitos confirmados chegou a 74 e, embora tenha ocorrido uma redução comparado ao ano de 2011, os números ainda são elevados (24). A **Figura 1.3** mostra o mapa da distribuição mundial dos casos de dengue em 2012 (26).



Fonte: Secretarias estaduais de saúde. Dados sujeitos a alterações.

Figura 1.2. Casos de dengue por semana epidemiológica. Brasil, 2011 e 2012.

Fonte: Boletim epidemiológico, SVS/MS, 2012 (24).



Figura 1.3. Distribuição mundial dos casos de dengue no início do ano de 2012. Em azul, as áreas de risco contínuo. Fonte: <http://www.healthmap.org/dengue/pt/>, acessado em agosto de 2012 (26).

1.2- O vírus Dengue (DENV)

1.2.1- Características estruturais

O vírus dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae* e contém 4 sorotipos específicos denominados: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os vírions do DENV têm diâmetro aproximado de 500Å e o seu genoma é composto de uma fita simples de RNA com senso positivo (27). O genoma de aproximadamente 11 Kb possui uma fase aberta de leitura (ORF- *Open Reading Frame*) que começa no resíduo metionina e codifica uma poliproteína que é processada por proteinases virais e celulares em proteínas estruturais e não estruturais. A ordem de codificação do ORF do DENV é: 5`-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3- NS4A-NS4B-NS5-3` (**Figura 1.4**) (28).

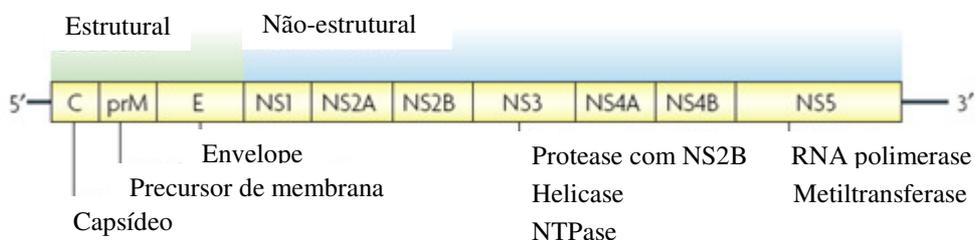


Figura 1.4. Organização do genoma do DENV. Proteínas estruturais e não-estruturais e suas funções estão identificadas. Fonte: Adaptado de Kuhn *et al.*, 2002 (29).

Os vírions maduros contém três proteínas estruturais: a proteína do capsídeo (C), proteína de membrana (M) e do envelope (E); e 7 proteínas não-estruturais, que são importantes para a replicação viral: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (30). Múltiplas cópias da proteína C (11kDa) encapsulam o RNA genômico para formar o nucleocapsídeo viral (NC). O nucleocapsídeo é circundado por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira, onde 180 cópias da proteína M e E estão ancoradas (31). A proteína M é um pequeno fragmento proteolítico de sua forma precursora prM. A Proteína E possui 3 domínios estruturais distintos. O domínio I está estruturalmente posicionado entre o II, o domínio de homodimerização, e o domínio III, imunoglobulina-like. Análises estruturais dos vírions maduros revelaram que o vírus possui um envelope icosaédrico e um nucleocapsídeo do core, esférico (**Figura 1.5**) (32).

Estudos indicam que a proteína prM, antes de ser clivada na maturação viral, auxilia na montagem da proteína E, funcionando como *chaperone* (33). A proteína E parece ser o principal constituinte da superfície dos vírions e está envolvida em diversas funções biológicas do vírus como: ligação aos receptores das células-alvo e endocitose do vírus, indução de anticorpos neutralizantes, hemaglutinação de eritrócitos e montagem da partícula viral (34, 35).

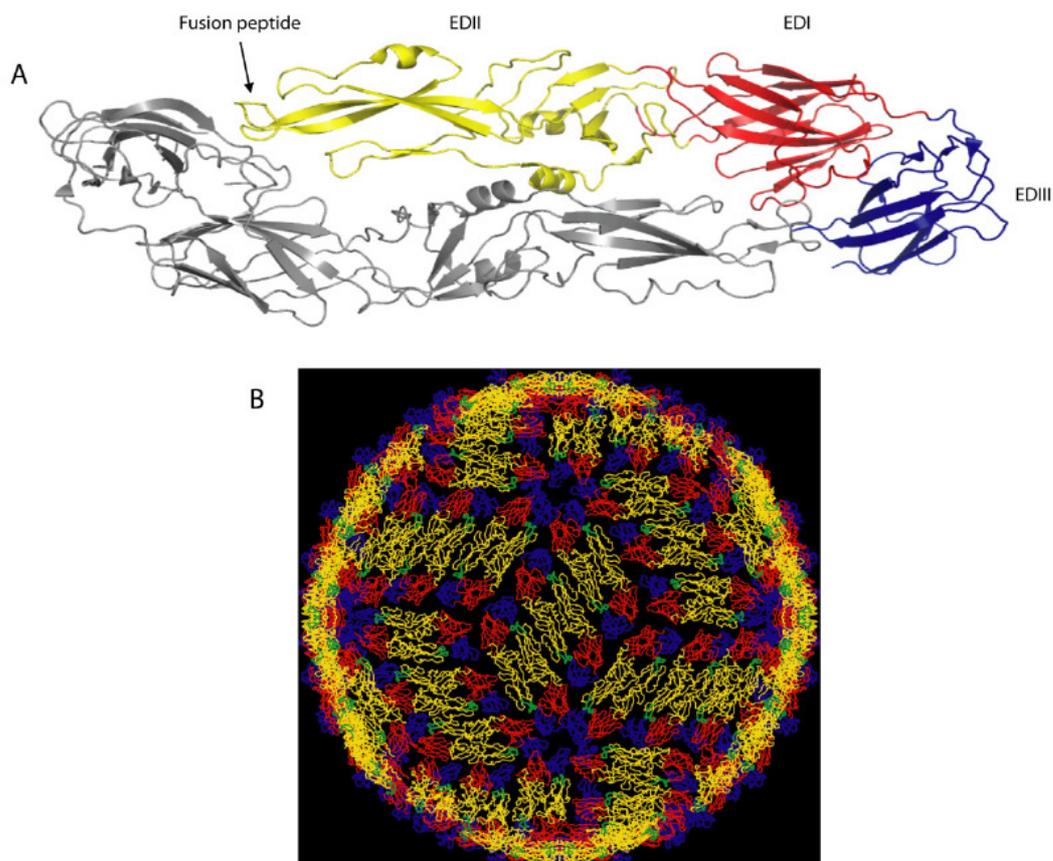


Figura 1.5. Estrutura da proteína do envelope do DENV (A) e a partícula viral (B). (A) Proteína E no vírus maduro é um homodímero e cada subunidade possui três domínios chamados I (vermelho), II (amarelo) e III (azul). (B) Distribuição das proteínas E na superfície do vírion. Fonte: Wahala & Aravinda., 2011 (36).

Entre as proteínas não-estruturais, a NS1, expressa tanto na forma residente no retículo endoplasmático (RE), associada à membrana das células infectadas ou na forma solúvel no plasma de pacientes infectados, parece estar envolvida na replicação viral (37). Níveis plasmáticos de NS1 foram mais associados com casos de FHD, do que com casos de FD, sugerindo que seus níveis estariam relacionados à gravidade da doença (38). Alguns estudos sugerem que os níveis de NS1 secretadas estariam associados com os níveis de viremia em infecções secundárias pelo DENV-2, sendo usada como diagnóstico (39). Portanto, níveis de NS1 estariam relacionados à carga viral. Além disso, a NS1 foi descrita como sendo capaz de ativar, *in vitro*, proteínas do sistema complemento e esta atividade é aumentada pela presença do anticorpo DENV-específico (40). O mecanismo molecular desta atividade da NS1 ainda é desconhecido. O papel da atividade fixadora do complemento desta proteína no extravasamento plasmático tem sido questionado devido às discordâncias entre o pico dos níveis de NS1, que ocorrem durante a fase febril e o período do extravasamento plasmático, que ocorre mais tardiamente. Por outro lado, os níveis do antígeno NS1 em amostras biológicas poderiam ser usados como um indicador precoce de uma forma grave da doença (41). Recentemente, foi demonstrado que a NS1 é capaz de se ligar à protrombina, formando complexos NS1/protrombina em soro de pacientes com dengue. Ainda, NS1 recombinante foi capaz de inibir a ativação da protrombina e prolongar o tempo de tromboplastina parcial ativada, contribuindo para a hemorragia, em pacientes com FHD (42).

A proteína NS3 parece interagir com proteínas que se ligam à receptores nucleares e modular o tráfego intracelular RE/Golgi, tendo um importante papel na distribuição celular e indução de algumas estruturas membranares, observadas durante a infecção pelos flavivírus. A NS5 serve como uma polimerase dependente de RNA viral, bem como uma metiltransferase e está envolvida na replicação viral. Ela também parece induzir IL-8, citocina essa que tem um importante papel na imunopatogenia da dengue (37).

As demais proteínas não-estruturais ainda não foram bem caracterizadas. É possível que a NS4B, e em uma menor extensão, a NS2A e NS4A, sejam capazes de bloquear a transdução de sinal mediada pelo Interferon (IFN) (43). Além disso, a NS4A é um potente inibidor de IFN- β e - γ , importantes mediadores da resposta antiviral (37). Nos flavivírus, esta proteína também foi descrita como capaz de induzir autofagia em células epiteliais, protegendo o vírus durante a infecção, uma vez que a autofagia é vital para a replicação dos flavivírus nestas células (44). Porém, mais

recentemente, foi descrito que a NS4B e NS5 são as primeiras responsáveis pela indução de mediadores imunológicos, tais como IL-6, IL-8, IP-10, TNF- α ou IFN- γ . Além disso, a maturação da NS4B parece ser importante durante a sinalização imune inata, em monócitos infectados com DENV (45).

1.2.2 – Vetor e transmissão

Os diversos sorotipos do DENV são transmitidos para os humanos através da picada de mosquitos *Aedes* infectados, principalmente, o *Aedes aegypti* (6). Após um repasto de sangue infectado, o mosquito está apto a transmitir o vírus, depois de 8 a 12 dias de incubação extrínseca. A transmissão mecânica também é possível, quando o repasto é interrompido e o mosquito, imediatamente, se alimenta em um hospedeiro suscetível próximo. Não há transmissão por contato direto de um doente ou de suas secreções com uma pessoa sadia, nem de fontes de água e alimento (8). Diversos fatores podem influenciar a dinâmica de transmissão do vírus, incluindo fatores climáticos e ambientais, interações patógeno-hospedeiro e fatores imunológicos da população. O clima influencia diretamente na biologia dos vetores e, conseqüentemente, em sua abundância e distribuição, sendo um importante determinante das epidemias de doenças transmitidas por vetores (6).

O *Aedes aegypti* é uma espécie tropical e subtropical amplamente distribuída ao redor do mundo, principalmente entre latitudes de 35° N e 35° S, já tendo sido encontrada em 45°N, porém, tal invasão ocorreu durante os meses mais quentes e os mosquitos não sobreviveram ao inverno. Também, por causa das baixas temperaturas, o *Ae. Aegypti* é relativamente incomum acima dos 100 metros (6).

Os estágios imaturos são encontrados em *habitats* repletos de água, principalmente, em recipientes artificiais intimamente associados com habitações humanas e, muitas vezes, dentro de casa. Estudos sugerem que a maioria das fêmeas pode passar sua vida dentro ou ao redor das casas, onde emergem como adultos. Isto significa que as pessoas, rapidamente, deslocam o vírus dentro e entre as comunidades (6).

Surtos de dengue também foram atribuídos ao *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* e diversas espécies do complexo de *Aedes scutellaris*. Cada uma dessas espécies tem uma ecologia, comportamento e distribuição geográfica particular. Nas últimas décadas, o *Aedes albopictus* se espalhou da Ásia para a África, Américas e Europa, através do comércio internacional de pneus usados,

onde os ovos são depositados quando contém água da chuva. Os ovos podem se manter viáveis por diversos meses na ausência de água (6).

1.2.3- Ciclo de vida: células-alvo e replicação viral

Nas infecções naturais, o DENV é inoculado pelo vetor, enquanto este se alimenta, provavelmente no espaço subcutâneo ou no espaço intradérmico. A replicação viral ocorre no local da inoculação, em células retículo-endoteliais, células de Langerhans, ou em fibroblastos (46). Wu e colaboradores (2000) observaram que células dendríticas imaturas obtidas a partir de explantes da pele de cadáveres, com 12 h de falecimento, infectadas com DENV-2 cepa Nova Guiné, apresentavam taxas de infecção entre 60- 80%. Com isso, foi demonstrado que as células dendríticas intersticiais da derme, localizadas no epitélio, seriam os primeiros alvos potenciais *in vivo* da infecção (47). Após se replicarem nestas células, os vírus provavelmente atingem os linfonodos através das células dendríticas e se difundem pelo sangue, podendo ser detectados juntamente com o início dos sintomas (**Figura 1.6**).

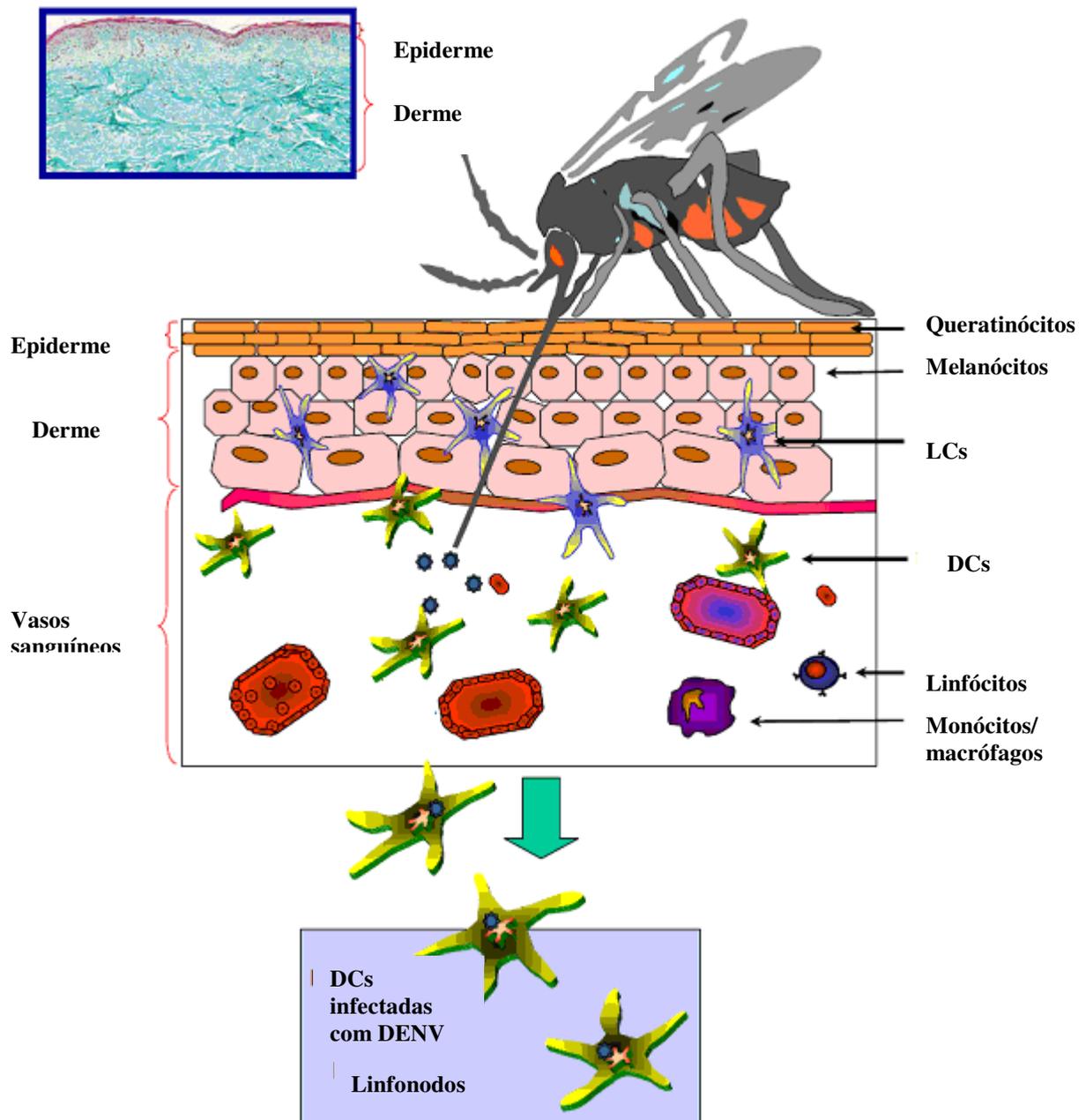


Figura 1.6- O primeiro contato do DENV com o hospedeiro. O vírus entra pela pele enquanto o vetor se alimenta, e as DCs são as células imunes primárias nos primeiros momentos da infecção de dengue. DCs infectadas na derme, migram para os linfonodos regionais junto com seu processo de maturação. Fonte: Adaptado de Navarro- Sánchez *et al.*, 2005 (48).

A detecção de RNA e de antígenos virais na fração das células mononucleares do sangue periférico de pacientes demonstrou que o vírus também é capaz de infectar estas células. Foi demonstrada por nossa equipe a marcação do antígeno DENV, por citometria de fluxo, em monócitos de pacientes (49). Estudos *in vitro* demonstraram que células da linhagem monocítica, como monócitos e células dendríticas imaturas (47), são as principais células capazes de desenvolver a replicação viral, mas os antígenos virais podem, ainda, ser encontrados em células hepáticas, células de Kupfer, macrófagos alveolares, órgãos linfoides e linfócitos B (50-55), e em macrófagos e células de Kupfer em tecidos de casos fatais de órgãos como fígado, cérebro, baço e pulmão (55, 56). Em um modelo de infecção de camundongos, também já foi observado que macrófagos e células dendríticas são permissíveis à infecção pelo DENV (57). Um papel para outras células do sistema imunológico, como basófilos e mastócitos, também vem sendo proposto. King e colaboradores demonstraram que células da linhagem de mastócitos humanos KU812 são permissivas à infecção pelo vírus DENV, com produção de partículas virais e citocinas (58). Ainda, o DENV se mostrou infeccioso para diversas linhagens celulares, incluindo linhagens de células humanas (K562, U937, THP-1, HepG2, HUVEC, ECV304, Raji, HSB-2, Jurkat, LoVo, KU812, HuH-7), de mosquito (C6/36), de macaco (Vero, BS-C-1, CV-1, LLC-MK2), de hamster (BHK), assim como macrófagos murinos (Raw, P388D1, J774) (31). Entre as linhagens de hepatócitos suscetíveis à infecção pelo DENV, a linhagem de células de hepatocarcinoma, HuH-7, vem sendo bastante utilizada em modelos de infecção para dengue e foi utilizada neste estudo.

Vários trabalhos têm demonstrado importantes papéis das células HuH-7, como ferramenta no estudo das infecções *in vitro* pelo DENV. Elas são capazes de se infectar com o vírus, levando à secreção de fatores, tais como, o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), responsável pelo aumento da permeabilidade vascular na dengue (59). Ainda, células HuH-7, tratadas com MIF recombinante, são capazes de produzir espécies reativas do oxigênio, como o óxido nítrico, induzindo autofagia (60). Além disso, essa linhagem celular já foi utilizada como modelo para teste de substâncias antivirais (61).

Estudos já demonstraram a importância de hepatócitos nas infecções pelo DENV. Hepatócitos humanos primários são permissíveis à infecção pelo DENV-2, levando à expressão de genes de citocinas, tais como IFN- β , TRAIL, MCP-1, IL-6,

IL-1 β , IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , e RANTES. Além disso, a indução de IL-8 em resposta à infecção é acompanhada pela sua secreção por hepatócitos infectados. Em modelo de infecção em camundongos também já foi demonstrado o envolvimento de hepatócitos nos danos causados pela infecção. Análises ultraestrutural e histopatológica demonstraram danos em extensas áreas de tecido hepático, associados com a replicação do DENV-2 (62). Essa habilidade dos hepatócitos serem infectados com DENV-2 suportam evidências de hepatócitos humanos como células-alvo nos casos de infecção pelo DENV (63).

A primeira etapa na via de entrada dos flavivírus em células-alvo envolve a ligação da glicoproteína E com o receptor celular (64). Portanto, a entrada do DENV ocorre através de endocitose mediada por receptor. A vasta gama de células permissíveis ao DENV indica que o vírus deve ligar-se a uma molécula de superfície celular comum, ou explorar múltiplos receptores para mediar a infecção. Durante a última década, diversos candidatos à receptores e/ou fatores de ataque tem sido identificados, o que sugere que o DENV é capaz de utilizar diversas moléculas para entrar na célula (31). Em células de mosquito, o DENV demonstrou interagir com a proteína de choque térmico 70 (Hsp70) (65), proteínas de 80 e 67 kDa, R80 e R67, respectivamente (66) e a proteína de 45-kDa (67). O sulfato de heparan (68-70) Hsp90 (65), CD14 (71), GRP78/BiP (proteína reguladora de glicose 78) (72), e o receptor de laminina de alta afinidade 37/67 kDa (73) foram identificados como receptores do DENV, em células de mamíferos. Receptores de lectina tipo-C (CLR) estão envolvidos na interação das partículas de DENV com células mieloides humanas (74). Eles incluem DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*) (75-77), CD209, receptor de manose (MR) (78), e domínio de lectina tipo-C da família 5, membro A (CLEC5, MDL-1) (79). A interação mais bem caracterizada se faz com o DC-SIGN, presente em células dendríticas (DCs), podendo mediar a infecção dos 4 sorotipos. Sua expressão ectópica confere permissividade à infecção sobre aquelas células, geralmente não permissivas (37). Dentre os inúmeros receptores descritos, a entrada do DENV em células HuH-7 ocorre através de proteoglicanas contendo sulfato de heparan (69).

Mukhopadhyay e colaboradores (2005) sugeriram um modelo de ciclo viral baseado em vários estudos moleculares realizados com flavivírus. Uma mudança conformacional irreversível na proteína E seria iniciada pelo ambiente ácido do endossoma, resultando em uma fusão das membranas viral e celular (27). Uma

revisão mais recente indica também que, lipídios aniônicos podem ter um papel crucial no processo de fusão do vírus da dengue (64). Posteriormente a esta fusão, o NC é liberado no citoplasma, havendo a dissociação da proteína do capsídeo e do RNA, propiciando a replicação do genoma. Partículas virais imaturas, incluindo aquelas formadas pelas proteínas E e prM, pelo NC e recobertas pela membrana bilipídica, não infectantes, são formadas no lúmen do retículo endoplasmático. No complexo de Golgi ocorre a quebra da prM em M, criando, assim, partículas maduras, que seriam liberadas por exocitose (27).

1.3- Manifestações clínicas

Um amplo espectro de quadros clínicos pode ser causado durante a infecção pelo DENV. A doença pode se manifestar como uma febre indiferenciada ou com sintomas brandos. As manifestações graves são caracterizadas por extravasamento de plasma, podendo levar ao choque hipovolêmico, e ao aparecimento de hemorragias graves (80-82). Durante três décadas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) têm recomendado a classificação da dengue em febre do dengue (FD), febre hemorrágica do dengue (FHD) com ou sem síndrome do choque do dengue (SCD)(83). A FHD é classificada em 4 graus de gravidade, onde os graus III e IV foram definidos como SCD (83).

Dificuldades na aplicação dos critérios para FHD na situação clínica, junto com o aumento dos casos clínicos de dengue grave que não se encaixavam nos critérios de FHD, levaram à solicitação para que reconsiderassem a classificação. Motivada por estas dificuldades, a OMS conduziu um estudo multicêntrico entre regiões endêmicas, a fim de coletar evidências sobre os critérios para a classificação da dengue em níveis de gravidade. Os achados do estudo confirmaram que, usando um conjunto de parâmetros clínicos e/ou laboratoriais, nota-se uma clara diferença entre pacientes com dengue grave e aqueles com dengue não-grave. Entretanto, por razões práticas, era desejável dividir o grande grupo de pacientes com dengue não-grave em dois subgrupos: pacientes com sinais de alerta e sem eles (**Figura 1.7**) (6, 84, 85).

1.3.1- Dengue (com ou sem sinais de alerta)

É uma doença não fatal que pode ocorrer tanto nas infecções primárias quanto nas secundárias e afetar crianças e adultos (10, 86). As características

clínicas, frequentemente, dependem da idade do paciente. Caracterizam a doença, principalmente em crianças mais velhas (acima de 10 anos) e adultos, o aparecimento súbito de febre (duração de 2 a 7 dias), dores no corpo (cabeça, retro-orbital, artralgia, mialgia), anorexia, náuseas, exantema, prova do laço positiva (petéquias) e leucopenia (85).

De acordo com a nova classificação, estas manifestações brandas da doença podem ocorrer com ou sem alguns sinais de alerta, os quais são úteis para identificar o indivíduo que pode vir a evoluir para a forma grave da dengue. Dentre estes sinais de alerta, a dor abdominal é um fator de risco significativo para adultos e crianças, assim como o sangramento de mucosas e a trombocitopenia menor que $10.000/\text{mm}^3$. Nos adultos, outros sinais de alarme são a sonolência, às vezes alternando com irritabilidade, a hipoalbuminemia e hematócrito elevado. Também, nos adultos, é significativa a comorbidade. Outros sinais de alarme são vômitos persistentes e acúmulo clínico de líquidos (6).

1.3.2- Dengue grave

A evolução para a cura ocorre pela diminuição da febre, onde o indivíduo apresenta sudorese e fraqueza transitórias, evoluindo para a melhora; Porém, outras vezes, esta diminuição da febre, está associada ao momento em que o paciente agrava, e a defervescência anuncia, portanto, o início da etapa crítica, a qual corresponde à forma grave da doença. Entre o 3º e 6º dia para as crianças, e entre o 4º e 6º dia para os adultos (período mais frequente, porém, não exclusivo dos indivíduos que evoluem para a dengue grave), a febre diminui, a dor abdominal se mantém e apresenta-se intensa, se constata derrame pleural ou ascite, os vômitos se tornam mais frequentes e começa a etapa crítica da doença, o momento de maior frequência de instalação do choque. Também nesta etapa se torna evidente a hepatomegalia (85).

A etapa de recuperação requer atenção médica, pois durante este período é que o paciente deve eliminar fisiologicamente o excesso de líquido que havia extravasado até normalizar todas as suas funções vitais. Deve-se vigiar também uma possível co-infecção bacteriana, quase sempre pulmonar, assim como o surgimento do chamado exantema tardio (10 dias após) (85).

Dentro da nova classificação, os critérios estabelecidos para dengue grave são: extravasamento de plasma, expresso por choque hipovolêmico e/ou dificuldade respiratória, devido ao excesso de líquidos acumulado nos pulmões; hemorragias

graves; e o acometimento de órgãos (hepatite grave - transaminases superiores a 1000 unidades, encefalite, miocardite por dengue) (6).



Figura 1.7. Nova classificação da dengue, revisada em 2009 pela OMS. Fonte: Adaptado de WHO, 2008 (7).

1.4- Imunopatogenia da dengue

As manifestações clínicas das infecções pelo DENV envolvem uma interação complexa entre o vírus e o hospedeiro. Muitos estudos têm sido feitos com relação à estrutura e biologia do DENV, receptores virais e suas interações com as células do hospedeiro, a virulência intrínseca de determinadas cepas virais, o efeito da infecção na imunidade inata e o papel de outros fatores virais e do hospedeiro (31). Porém, o fato de não haver modelos animais que reproduzam as características físico e imunopatológicas da doença, associado ao alto grau de variação das manifestações clínicas causadas pelo vírus, dificultam a compreensão da patogenia e da gravidade da dengue. Portanto, diversas hipóteses são propostas para tentar explicar a patogênese e os possíveis mecanismos que direcionam a doença para sua forma grave (28).

1.4.1- Teoria da facilitação dependente de anticorpos (ADE)

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que infecções secundárias com um sorotipo heterólogo ou uma infecção primária de crianças nascidas de mães imunes aumentam, significativamente, o risco de desenvolvimento de uma doença grave. Essas observações levaram à hipótese, amplamente aceita, da facilitação dependente de anticorpos (antibody-dependent enhancement – ADE) (87, 88).

A teoria da facilitação dependente de anticorpos (ADE) procura explicar porque, em uma segunda infecção, alguns indivíduos têm maior chance de desenvolver as formas mais graves da doença. Segundo essa teoria, anticorpos heterólogos desenvolvidos na infecção pelo primeiro sorotipo estariam em níveis subneutralizantes durante uma segunda infecção por outro sorotipo e se ligariam ao vírus. Esse complexo, então formado, antígeno-anticorpo seria atraído através da ligação da porção Fc da imunoglobulina com o FcR γ de células-alvo, tais como monócitos, macrófagos e DCs, e aproximaria o vírus de seu receptor, resultando no aumento da infecção dessas células (89). Estudos com anticorpos específicos para a proteína E sugerem que, quando a opsonização do vírus ocorre de forma que não exceda o limiar necessário para a neutralização do vírus, estes anticorpos podem aumentar a eficiência de ataque do vírus à superfície celular e facilitar a entrada de vírions através da endocitose via FcR (88, 90). Os mecanismos moleculares que estão envolvidos no fenômeno da ADE continuam a ser identificados (91). A absorção de complexos imunes de DENV através da entrada mediada pelo FcR, pode não somente levar à um aumento de células infectadas, mas também influenciar no número de partículas virais produzidas pelas células infectadas (31). Um estudo demonstrou que a infecção de células THP-1 por complexos imunes do DENV levaram à uma regulação negativa na produção de IL-12, IFN- γ , TNF- α , e Óxido Nítrico (NO), e aumentou a expressão de IL-6 e IL-10, indicando que a entrada via receptor Fc suprime a resposta imune antiviral, promovendo, dessa forma, a produção de partículas virais (92).

O fenômeno da ADE implica, não apenas anticorpos contra a proteína E, mas também anticorpos contra prM (31, 93-95). Foi observado que anticorpos contra a proteína prM são capazes de tornar partículas virais imaturas, não-infecciosas, em partículas quase tão infecciosas quanto o vírus tipo-selvagem. Estes anticorpos parecem aumentar a infectividade de vírions imaturos, mas não apresentam efeito no número de progênies virais produzidas pela célula infectada (31).

1.4.2- Teoria da virulência viral

Alguns estudos demonstram que a genética do vírus infectante estaria relacionada à gravidade da infecção (96). Por possuírem muitas variações genéticas, os DENV foram classificados em grupos denominados genótipos (97). Neste sentido, existem evidências sobre diferenças no genótipo em um mesmo sorotipo viral em diferentes áreas geográficas (98). Os casos de FHD da primeira epidemia ocorrida nas Américas, em 1981, coincidiram com a entrada de um genótipo do sudeste asiático do DENV-2, possivelmente mais virulenta (99). Para tentar explicar tais diferenças nos genótipos dos sorotipos, Gubler sugere a hipótese de que os vírus DENV podem sofrer variações genômicas quando submetidos à seleção durante a replicação nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, o que pode conferir aumento na virulência e no potencial epidêmico (10).

Alguns autores demonstraram que a FHD e a SCD raramente são causadas por cepas americanas e estariam mais associados ao genótipo asiático. Além disso, após a entrada do genótipo asiático nas Américas, o vírus americano dificilmente é isolado em pacientes com FHD. Isto pode indicar uma maior virulência do vírus asiático e uma prevalência seletiva do genótipo americano (96, 99, 100).

A comparação entre o genótipo do DENV-1, circulante em 1986, no Brasil, e do vírus re-emergente em 2009, demonstrou que os vírus pertenciam ao mesmo genótipo (V- Américas/África), porém, isolados de 2009/2010 (linhagem II) e de 2011 (linhagem III) pertenciam a linhagens diferentes daquela de 1986 (linhagem I). Entretanto, nenhuma correlação quanto à gravidade dos casos de dengue foi feita (101). Ainda, infecções sequenciais com determinados sorotipos, nas Américas e em Cingapura, poderiam estar relacionadas ao desenvolvimento de FHD. Como, por exemplo, epidemias com alta incidência de FHD foram associadas à infecção primária pelo DENV-1 seguida de DENV-2 ou DENV-3 (13, 102-104).

Em um estudo mais recente, foi observada uma associação entre algumas manifestações clínicas específicas, bem como, alguns grupos de manifestações clínicas, com determinados sorotipos. Indivíduos infectados com DENV-3 apresentaram uma maior prevalência de manifestações gastrointestinais e muscoesqueléticas, enquanto indivíduos infectados com DENV-4 tinham uma maior prevalência de manifestações respiratórias e cutâneas (105).

1.4.3- Teoria do pecado original

Evidências sugerem uma ativação de células T CD4 e CD8, *in vivo*, durante a infecção pelo DENV, sendo esta ativação mais intensa em pacientes graves do que aqueles com a forma branda da doença (106). Em uma segunda infecção com sorotipo heterólogo, linfócitos T de memória estariam envolvidos na liberação de mediadores responsáveis pela FHD, porém seriam ineficientes na eliminação do vírus. Posteriormente, foi verificada a mesma habilidade para células T CD8⁺ dengue-específicas (107). O nível de citocinas como TNF- α , assim como a magnitude das respostas via células T, estariam correlacionados com a gravidade da doença.

Em uma infecção primária, ocorre a ativação e expansão de células T, com alta afinidade para o sorotipo infectante, levando à formação de células T de memória para este sorotipo. No caso da segunda infecção, por outro sorotipo, estas células de memória sensibilizadas durante a infecção prévia, seriam ativadas e se expandiriam mais rapidamente do que as células virgens específicas para o novo sorotipo infectante. Porém, esses clones de células de memória teriam menor afinidade pelo sorotipo presente e, conseqüentemente, não exerceriam suas funções efetoras para eliminar o vírus. Por outro lado, teriam alta capacidade em produzir mediadores inflamatórios e poderiam, de fato, promover a imunopatologia do dengue. Esta teoria foi reafirmada em um estudo realizado em crianças tailandesas com dengue agudo, onde as células T CD8⁺ citotóxicas possuíam baixa afinidade para o sorotipo infectante e secretavam altos níveis de citocinas (108).

Foi demonstrado que a ativação de células T CD8⁺ durante uma infecção secundária heteróloga parece resultar em uma produção maciça de citocinas e moduladores imunológicos característicos de FHD e SCD (109). A liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células, como IFN- γ e TNF- α , pode agir diretamente sobre o endotélio vascular e resultar no extravasamento de plasma, característico das infecções graves (110, 111).

1.4.4- Teoria do mimetismo molecular

Uma outra teoria sugere os anticorpos de reatividade cruzada como os responsáveis pela alteração da cascata de coagulação e, conseqüentemente, pelas manifestações hemorrágicas da doença. A homologia entre alguns trechos do gene da proteína do envelope viral e de proteínas da coagulação humana sugere que anticorpos de reatividade cruzada ao plasminogênio, poderia ter uma relação com a

hemorragia na FHD. O aumento da destruição de plaquetas ou a diminuição em sua produção poderia resultar na trombocitopenia (28, 112, 113).

1.4.5- Teoria do polimorfismo genético

Certas populações humanas, assim como, certos indivíduos apresentam diferenças nos sintomas da dengue. Como exemplo, temos a população Haitiana, onde nenhuma forma aparente de FHD/SCD foi documentada, enquanto havia transmissões hiperendêmicas de diversos sorotipos do DENV. Tal estudo, associado ao fato de que pessoas da raça negra apresentam uma menor frequência em desenvolver as formas graves da doença, comparadas às pessoas da raça branca, levou à teoria de que polimorfismos e mutações genéticas podem contribuir para a variação na suscetibilidade entre humanos (114-116). Diversas variantes gênicas foram identificadas como candidatas à predisposição ou proteção do indivíduo à desenvolver as formas graves da dengue. Dentre elas, alelos específicos do antígeno leucocitário humano (HLA) e polimorfismos de genes não-HLA. Diversos alelos do HLA humano classe I e II foram associados com a suscetibilidade à doença grave, enquanto outros, com a proteção (117-122). Nesse contexto, Stephens e colaboradores observaram uma associação do HLA-A*0203 à FD, independente do sorotipo. Diferentemente, o HLA-A*0207 foi associado com susceptibilidade à FHD, em pacientes com infecções pelo DENV-1 e DENV-2 (120). Dentre os alelos polimórficos não-HLA, o receptor da vitamina D, FcRII (123), o TNF- α (124), CTLA-4 e TGF- β (125), foram associados com a dengue mais grave. Além disso, foi observado em três coortes independentes, de hospitais da Tailândia, que uma variante do promotor do gene DC-SIGN1-336 está envolvido na progressão da doença para a FHD (126). Outros fatores do hospedeiro, como a deficiência na desidrogenase glicose-6-fosfato (G6PD) pode predispor o indivíduo ao desenvolvimento da FHD, assim como foi demonstrado que o vírus se replica para títulos elevados em monócitos derivados destes indivíduos (127). Ainda, pessoas com doenças crônicas, tais como, diabetes mellitus (DM) são mais suscetíveis à desenvolver dengue grave (81, 103, 128, 129). Recentemente, foi identificado que um polimorfismo de base única do gene de CLEC5A está relacionado com a gravidade da dengue, muito provavelmente pela sua indução de TNF(130).

1.4.6- Teoria multifatorial

Alguns autores acreditam que os riscos para o desenvolvimento da gravidade são resultantes multifatoriais. Diversos fatores (sorotipo, virulência viral, idade, sexo, perfil do sistema imunológico, fatores nutricionais e genéticos do hospedeiro) poderiam interagir, definindo o curso da infecção (86, 131). Outros fatores, bem como a intensidade de transmissão viral e a circulação simultânea dos sorotipos, vêm sendo considerados como fatores de risco. Portanto, seria uma associação de teorias que estariam envolvidas na suscetibilidade à gravidade da doença (86).

Embora algumas destas teorias sejam amplamente aceitas, como a ADE, outros estudos ainda contradizem as evidências apresentadas (132) e não comprovam as teorias propostas para a imunopatogenia da dengue.

1.5- O papel de citocinas/mediadores inflamatórios na dengue

As citocinas são proteínas solúveis, produzidas em resposta a um antígeno e que funcionam como mensageiro químico para regular a resposta inata e adaptativa do sistema imune, sendo produzidas por praticamente todas as células envolvidas nestes dois tipos de imunidade (133). Elas podem, ainda, induzir a liberação de outras citocinas, que irão interagir de forma complexa, levando à uma exacerbação de seus níveis e de outros mediadores químicos, podendo exercer efeitos sinérgicos (39). No caso da dengue, diversas citocinas e outros fatores tais como TNF- α , IL6, INF- γ , IL18, IL-10, IL-8 demonstraram estar relacionados à gravidade da doença, quando produzidas em altas concentrações (41). Estes mediadores podem promover ativação plaquetária e endotelial, culminando em trombocitopenia, permeabilidade vascular, hipotensão e choque, como observado em casos graves (134).

As citocinas da superfamília do TNF medeiam seus efeitos através da ativação de fatores de transcrição, incluindo NF-kB, que culmina em processos apoptóticos e/ou proliferação celular (135). Vários estudos com amostras de sangue de pacientes com dengue durante a fase aguda demonstraram que pacientes com as formas mais graves da doença apresentam uma maior produção de TNF- α em comparação à pacientes com as formas mais brandas. Estes resultados demonstram que esta citocina pode estar relacionada à gravidade da doença (136, 137). O TNF- α está dentre as primeiras citocinas detectadas no soro de pacientes com FHD. Um aumento significativo na expressão do alelo TNF-308A, que predispõe

geneticamente à expressão de altos níveis de TNF, é observado entre os pacientes com FHD (138). Dewi e colaboradores observaram aumento na permeabilidade e alterações morfológicas em células endoteliais tratadas, *in vitro*, com TNF- α , demonstrando que esta citocina parece estar envolvida no dano vascular. Além disso, após a infecção destas células pelo DENV, quantidades menores de TNF- α (que não produzia efeito em células não infectadas) foram suficientes para alterar a permeabilidade endotelial (139).

Outro fator que vem sendo descrito como agravante da doença é o fator inibidor da migração de macrófagos (MIF). É um mediador pró-inflamatório expresso em diversos tipos celulares, não somente do sistema imune, e é produzido em resposta à diferentes estímulos como citocinas, moléculas microbianas, glicocorticóides e complexos imunes (140). As atividades pró-inflamatórias de MIF incluem a indução de mediadores inflamatórios e a expressão de receptores *Toll-Like* e moléculas de adesão, antagonizando o efeito de glicocorticóides, agindo como quimioatrativos, e aumentando a sobrevivência de leucócitos. Estas células estocam MIF em diversas gotículas lipídicas, as quais aumentam em número e tamanho após ativação celular. Esta compartimentalização de MIF em gotículas lipídicas pode ser uma etapa intermediária na via de secreção deste fator (141). Em pacientes com dengue, este fator foi associado aos casos mais graves, principalmente àqueles em que pacientes FHD não sobreviveram, os quais apresentaram uma produção muito maior de MIF comparado aos pacientes FHD que sobreviveram, FD e controles (142). Já em modelo de macrófagos humanos infectados com o DENV-3, *in vitro*, a produção de MIF demonstrou não afetar a replicação viral e foi associada com a produção de mediadores inflamatórios como TNF- α e IL-6 (141). Ainda no mesmo trabalho, utilizando modelo de camundongo infectado com DENV-2, foi observado uma diminuição da letalidade em camundongos deficientes em MIF comparados ao tipo selvagem, além de uma diminuição na viremia. Também em camundongos deficientes em MIF, o número de plaquetas se manteve alto e o hematócrito diminuído em comparação aos camundongos tipo selvagem, demonstrando uma possível participação deste fator nas características observadas durante a doença, como trombocitopenia e hematócrito elevado (59, 141). Ainda, outro estudo demonstrou um papel deste fator em aumentar a permeabilidade vascular, na infecção pelo DENV (59). Mais recentemente, foi demonstrado que o MIF estimula a produção de espécies reativas do oxigênio, tais como NO, em células HuH-7, levando à autofagia (60).

Outra citocina descrita como agravante na dengue é a Interleucina- 8 (IL-8). O DENV parece modular a expressão de IL-8, através de sua proteína não-estrutural, NS5. Níveis do RNAm da IL-8 estavam aumentados em células mononucleares do sangue periférico em pacientes com FD dias após a defervescência e encontravam-se mais elevados entre pacientes FHD (143). Dentre outras funções, a IL-8 é capaz de promover o recrutamento de eosinófilos, neutrófilos e células T *naive* para a superfície do endotélio, além de aumentar a expressão de moléculas de adesão e, dessa forma, promover o extravasamento de monócitos e plasma. Essa atividade quimiotática em neutrófilos foi demonstrada através de sua degranulação em pacientes com FD e FHD/SCD, além do aumento de elastase, um produto da degranulação, bem como níveis elevados de IL-8 em pacientes com SCD (144). A IL-8, produzida pelo endotélio, sob infecção, parece estar envolvida na reorganização da actina e deslocamento da ocludina, levando à um aumento da permeabilidade (145). Além disso, hepatócitos infectados, *in vitro*, pelo DENV, tiveram a expressão aumentada do gene da IL-8 (63).

Além das citocinas, certas quimiocinas também apresentam um importante papel na patogênese da dengue. Elas constituem uma família de moléculas que foram originalmente descritas como mediadores inflamatórios, produzidos no sítio de infecção ou injúria, em resposta a um estímulo pró-inflamatório. Estão envolvidas nos processos de migração de diversos tipos celulares como, neutrófilos, monócitos, linfócitos e eosinófilos. Contudo, essas moléculas estão envolvidas em vários processos como angiogênese, produção de colágeno e na proliferação de precursores hematopoiéticos (146). Níveis plasmáticos da quimiocina MCP-1, além de outras citocinas, citadas anteriormente, tais como, IL-1 β , IL-8 e TNF- α foram associados com um quadro clínico importante na dengue, a trombocitopenia. Além disso, níveis aumentados de MCP-1 também foram correlacionados com hipotensão (147). Lee e colaboradores demonstraram que monócitos humanos infectados, *in vitro*, pelo DENV são capazes de produzir MCP-1. Além disso, células endoteliais expostas ao sobrenadante da cultura dos monócitos infectados pelo DENV-2 ou ao MCP-1 recombinante, levou à um aumento da permeabilidade vascular e redistribuição da proteína ZO-1 das junções firmes das células endoteliais. Ainda, o tratamento prévio com anticorpo neutralizante para o MCP-1 inibiu apenas parcialmente a alteração na permeabilidade dessas células. Estes dados sugerem o envolvimento do MCP-1 na alteração da permeabilidade vascular (148). Mais

recentemente, também foi demonstrado por nossa equipe que pacientes com dengue durante a infecção aguda apresentam níveis de MCP-1 elevados (149).

Na infecção pelo DENV, alguns fatores produzidos estão envolvidos na resposta antiviral do hospedeiro. Dentre eles, o principal mecanismo de defesa antiviral que possuímos é mediado pela via do Interferon. Na maioria das viroses, para o estabelecimento da infecção, é necessário que o vírus escape da resposta antiviral inata fornecida pelo sistema Interferon. As células tipicamente respondem à infecção viral secretando IFN- α/β (Tipo I), que se ligam à receptores na superfície de células infectadas e vizinhas (150). Os IFN- α e β são secretados por células infectadas e/ou ativadas por vírus e exibem múltiplas propriedades biológicas incluindo efeitos antiproliferativo, antiviral e imunomodulador (151, 152). O sistema IFN pode inibir várias etapas da replicação viral, entre elas a transcrição, a tradução e a degradação do RNA viral (153). Alguns flavivírus possuem um mecanismo de escape do sistema imunológico através da inibição da via do IFN- α , atuando na inibição da expressão do transdutor de sinal e ativador de transcrição 2 (STAT 2) (154). Diversos estudos vêm relatando a capacidade do DENV em inibir a via do Interferon em diferentes modelos experimentais. Em células LLCMK2 infectadas com DENV-2 foi observada uma inibição tanto da via do IFN- β , quanto do IFN- γ , através da inibição da fosforilação do STAT-1 (43). Também em culturas de células dendríticas derivadas de monócitos, foi observada a inibição da via do IFN tipo I, porém neste modelo, a inibição ocorreu a nível da fosforilação do Fator Regulador de Interferon-3 (IRF-3) (150). Alguns trabalhos mostram que o pré-tratamento com IFN- α e γ ou IFN- β e γ inibe a replicação do DENV (134).

Outro fator envolvido na resposta antiviral durante a infecção pelo DENV é o Óxido Nítrico (NO). O NO é um importante sinal parácrino e autócrino usado por diferentes tipos celulares e produzido por uma variedade de células no corpo, por exemplo, macrófagos, células endoteliais vasculares, células de Kupffer (155). Ele apresenta uma variedade de funções desde dilatação de vasos sanguíneos, agregação de plaquetas, combate à infecções e tumores, mediador de inflamação, entre outras (156-158). Em concentrações ótimas, o NO possui ação protetora e regulatória nas células, porém, em altas concentrações, possui efeitos tóxicos. O NO, que é produzido por fagócitos mononucleares auxilia na defesa anti-microbiana. Ele demonstra atividade antiviral contra vírus tanto de DNA como de RNA por mecanismos como inibição da síntese do genoma viral, nitrosilação de proteínas virais e promoção de eliminação viral por células do hospedeiro (159).

Na dengue, foi observado que monócitos infectados, *in vitro*, pelo DENV-1, apresentaram expressão da enzima indutora de NO- iNOS- em uma relação inversa à expressão do antígeno DENV. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que monócitos de pacientes com dengue apresentavam expressão de iNOS, comparados à doadores saudáveis (49). Diversos estudos avaliam a produção de NO em pacientes com dengue. Levy e colaboradores (2010) demonstraram que tanto pacientes com FD quanto pacientes com FHD apresentaram níveis elevados de NO (Nitritos), estando o teor de nitrito aumentado em pacientes com FD. Essa associação de aumento dos níveis de NO com manifestações brandas da doença sugerem um papel protetor do NO nas infecções pelo DENV, *in vivo*. O aumento nos níveis de nitrito também foi observado em sobrenadante de cultura de monócitos infectados, sugerindo que NO está envolvido na infecção pelo DENV e que os monócitos podem ser uma importante fonte de sua produção (160). A infecção de células THP-1 (linhagem monocítica) com isolados clínicos de baixa passagem também estimula a produção de NO, que está relacionada à diminuição do número de cópias do RNA viral detectado (92). O doador de NO, S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), demonstrou um efeito inibidor no acúmulo do RNA em 14-18 horas após a infecção, o correspondente a etapa de síntese do RNA viral, no ciclo de vida do DENV. Além disso, a atividade da replicase viral isolada de células LLCMK-2, infectadas e tratadas com SNAP, foi suprimida quando comparada ao controle negativo de células tratadas com N-acetyl-DL-penicillamine (NAP). Ainda nesse mesmo estudo, a investigação do alvo molecular da ação do NO revelou que a atividade da NS5 recombinante do DENV-2 na síntese da fita negativa do RNA foi afetada na presença do SNAP em ensaios *in vitro* envolvendo RNA polimerase - dependente de RNA (RdRp) (161). De acordo com estes estudos, o papel do NO na infecção pelo DENV parece estar relacionado à proteção do hospedeiro, estimulando uma resposta antiviral e colaborando para o controle da infecção.

1.6- Dengue e plantas medicinais

Até o momento, não há uma vacina aprovada para uso clínico ou uma terapia antiviral efetiva no controle da dengue. Além disso, o tratamento dos doentes consiste, principalmente, no uso de antitérmicos e reposição de fluidos (via oral ou intravenosa). Dessa forma, torna-se importante o estudo de produtos naturais que apresentem uma atividade antiviral e, principalmente, imunomoduladora, reduzindo a

produção dos principais fatores envolvidos com a gravidade da dengue. Entre as várias plantas que exercem uma atividade imunomoduladora, tanto com base no uso tradicional quanto com respaldo científico, não se encontravam relatos para atividades destas contra a dengue. Recentemente, foi demonstrado por nossa equipe que extratos de *Uncaria tomentosa* apresentaram propriedades imunomoduladoras, reduzindo a produção de TNF- α , e antivirais em modelo de infecção de monócitos humanos primários pelo DENV-2 (162). Além disso, outro estudo revelou que o tratamento de células THP-1 com a mesma espécie inibiu a ativação, dependente de LPS, de componentes específicos da família NF-kB (163). A maior parte dos estudos envolvendo produtos naturais foca em sua possível ação antiviral contra o DENV. Já foi demonstrado que compostos derivados de flavonoides exibiram uma forte atividade antiviral em modelo de infecção de células HepG2, *in vitro*, pelo DENV-2 (164). Um ionóforo, conhecido por Narasina, revelou uma ação antiviral contra os quatro sorotipos do vírus da dengue, além disso, este composto parece atuar de forma a inibir os estágios de pós-entrada na replicação viral em células HuH-7 infectadas com DENV-2. Análises de proteômica e ultraestrutura revelaram ainda que o mecanismo antiviral da Narasina, provavelmente, está associado com o rompimento da síntese das proteínas virais (165). Bioflavonóides, compostos polifenólicos derivados de plantas, também têm sido alvo de estudos contra o DENV. Dentre eles, a quercetina demonstrou uma ação inibitória anti-DENV-2 significativa (166). Em um estudo mais recente, extratos metanólicos de *Andrographis paniculata*, *Citrus limon*, *Cymbopogon citratus*, *Momordica charantia*, *Ocimum sanctum* e *Pelargonium citrosum* foram testados quanto aos seus efeitos contra o DENV-1. Resultados demonstraram que extratos metanólicos de *A. paniculata* e *M. charantia* possuem a habilidade de inibir DENV-1 em ensaios, *in vitro*, com células Vero E6 (167).

Assim, nos parece relevante o estudo de novos extratos/frações originados de plantas em maior abundância no país e que não disponham de restrições das suas propriedades intelectuais. Estas se mostram atrativas para o desenvolvimento de um produto de origem fitoterápica para a dengue.

1.7- Plantas medicinais – Uso histórico

O uso dos vegetais como alimento, medicamento e cosmético, perde-se na história do homem. Os estudos de arqueologia demonstram que as plantas são utilizadas para cura desde os primórdios da civilização humana. Alguns médicos famosos da antiguidade grega, como Hipócrates e Avicenna (**Figura 1.8**), já faziam o uso de plantas em processos terapêuticos (168). Várias linhas diferentes de evidência indicam que as plantas medicinais representam a mais antiga e difundida forma de medicação (169). Um estudo relatou que não somente os humanos, mas também macacos, gorilas e chimpanzés selecionavam algumas das mesmas plantas para o manejo das mesmas doenças, lesões e outros problemas de saúde (170). Em diversas culturas antigas, produtos botânicos eram ingeridos para fins psicoterapêuticos e de cura biomédica. Através de extensa experimentação, as atividades biodinâmicas dos constituintes fitoquímicos das plantas foram, gradualmente, sendo descobertas e exploradas para aplicações médicas e psiquiátricas específicas. (169). Um estudo que traz uma revisão histórica sobre o uso de plantas medicinais descreve várias fontes que evidenciam que a conexão existente entre humanos e sua busca por drogas na natureza datam de um passado distante, tais como documentos escritos, monumentos preservados e até mesmo plantas medicinais originais (171).



Hipócrates



Avicenna

Figura 1.8. Médicos da Antiguidade grega: Hipócrates e Avicenna.

Fonte: <http://publicrelations.tums.ac.ir>.(26).

As plantas medicinais da flora nativa brasileira são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, muitas vezes utilizadas para fins medicinais que diferem daqueles utilizados pelos silvícolas (172). As observações populares sobre o uso e eficácia das plantas medicinais, contribuem para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, que são prescritos, muitas vezes, pelos efeitos medicinais que produzem, mas sem o conhecimento de seus constituintes químicos. Com isso, estudos multidisciplinares são de extrema importância para a pesquisa dessas plantas, a fim de descobrir os verdadeiros riscos que elas podem apresentar ao serem utilizadas sem os devidos estudos científicos (173).

O termo etnobotânica foi empregado pela primeira vez em 1895 por Harshberger que, embora não o tenha definido, apontou maneiras pelas quais ele poderia servir à investigação científica (174). Parafraseando a definição de Posey (1986) para etnobiologia, pode-se definir a etnobotânica como “a disciplina que se ocupa do estudo do conhecimento e das conceituações desenvolvidas por qualquer sociedade a respeito do mundo vegetal; este estudo engloba tanto a maneira como um grupo social classifica as plantas, como os usos que dá a elas” (175). Di Stasi e colaboradores relataram que na Amazônia brasileira existe um conhecimento popular sobre plantas medicinais, onde foram registrados 491 usos medicinais populares para 117 espécies de plantas estudadas (176).

A composição química das espécies vegetais, especialmente das plantas encontradas nas florestas tropicais, ainda está longe de ser descrita em sua totalidade. Um enorme arsenal de constituintes naturais ainda não foi isolado e estudado do ponto de vista químico. Somente um pequeno percentual, dentre as 250-500 mil espécies de plantas existentes, vem sendo investigado quanto aos seus potenciais efeitos fitoquímicos e biológicos (177). Aproximadamente, metade das espécies de plantas florais (125.000) é originária de florestas tropicais, mas somente 1% tem seus componentes químicos estudados para o desenvolvimento de novas drogas. Cerca de 50 drogas com uso comercial foram originadas de plantas tropicais, e o potencial farmacêutico que estas florestas podem oferecer é uma das mais importantes razões para sua preservação (178)

Os vegetais costumam ter aspectos em comum no seu metabolismo, tais como as vias de síntese de carboidratos, proteínas, gorduras e ácidos nucléicos. Estes processos são chamados, coletivamente, de metabolismo primário dos

vegetais (179). Princípios ativos de plantas medicinais são os metabólitos secundários, isto é, a planta não utiliza estas substâncias para sua nutrição, desenvolvimento ou em sua economia direta (180). Essas substâncias incluem substâncias voláteis ou agentes coloridos que atraíam polinizadores ou afastem predadores, matérias tóxicas que promovam a defesa contra os predadores, sendo utilizadas pelas plantas para melhorar suas condições de sobrevivência (179). As plantas, em geral, possuem uma gama variada e rica de princípios ativos. De acordo com semelhanças químicas e estruturais, estes metabólitos secundários podem ser divididos em grupos, como: esteroides, flavonoides, alcaloides, terpenos, taninas, entre outros (175, 177).

O Brasil, devido às suas dimensões continentais compreenderem diferentes características de clima e relevo, apresenta uma flora muito rica, bastante diversificada e praticamente desconhecida. Somente o nosso país possui cerca de 60.000 espécies de plantas, o que corresponde a cerca de 20% de toda a flora mundial conhecida, e 75% de todas as espécies existentes nas grandes florestas (181). O conhecimento da composição química, assim como das potencialidades biodinâmicas das espécies nativas brasileiras, entretanto, ainda é extremamente pequeno diante de tamanha diversidade (182).

Elisabetsky (1991) sublinha que “a pesquisa com plantas medicinais tem sido e continua a ser considerada uma abordagem frutífera para a procura de novas drogas”; e que “a maior parte da flora quimicamente desconhecida e o conhecimento medicinal associado a ela existem nos países de Terceiro Mundo, especialmente os que ainda possuem florestas tropicais extensas”, como é o caso do Brasil (183). Porém, na velocidade em que ocorre o fenômeno de extinção das espécies vegetais, devido à ação exploradora do homem, um enorme número de plantas com propriedades medicinais corre o risco de desaparecer antes de seu valor ser reconhecido, o que torna ainda mais urgente intensificar os investimentos nesta área (181).

Diante de tamanha biodiversidade encontrada no Brasil, estudos envolvendo plantas medicinais têm recebido atenção cada vez maior. Uma espécie que vem sendo bastante estudada, *Uncaria tomentosa*, demonstrou em uma fração enriquecida em alcaloides, ação antiviral e imunossupressora em um modelo de dengue (162). Outro estudo revelou que o tratamento de células da linhagem THP-1 com a mesma espécie inibiu a ativação, dependente de lipopolissacarídeo (LPS), de

componentes específicos da família do fator de transcrição (NF-κB) (163). Além disso, extratos metanólicos de espécies como, *Andrographis paniculata* e *Momordica charantia*, apresentaram habilidade em inibir a ação de determinados sorotipos do vírus causador da dengue, em ensaios *in vitro*, apresentando como um dos possíveis constituintes responsável por essa ação, os flavonoides (167).

Dessa forma, sabendo-se da importância de diferentes espécies e famílias de plantas na busca do controle de infecções virais, uma espécie da família botânica *Marcgraviaceae* sp, pertencente à flora brasileira, foi objeto de estudo do presente trabalho.

1.7.1- Família *Marcgraviaceae*

Marcgraviaceae é formada por oito gêneros e aproximadamente 110-130 espécies (184). Seu limite setentrional de distribuição corresponde aos estados de Chiapas, Oaxaca e Veracruz, no México, enquanto os estados brasileiros do Paraná e Santa Catarina correspondem à distribuição mais meridional (**Figura 1.9**). Cabe destacar que das 110-130 espécies que se conhece para a família, 56-60 encontram-se na Colômbia, constituindo o país com maior número de espécies de *Marcgraviaceae* (185). Na flora brasileira, a família é encontrada em áreas alagadas, restingas, campos, cerrados e matas, apresentando cerca de quatro gêneros e 35 espécies (182).



Figura 1.9. Distribuição geográfica mundial da família *Marcgraviaceae*.
Fonte: Silva, 2012 (186).

Esta família é caracterizada por brácteas florais altamente modificadas, hábitos arbustivos, trepadeiras, rupícolas e epifíticos, presença de ráfides e idioblastos esclerenquimatosos, além de uma aparente ausência de amido (187).

Espécies da família utilizada neste trabalho apresentam uma ampla ocorrência, nos estados brasileiros. Na restinga, caracterizam-se por serem plantas muito vistosas, com inflorescências que vão desde o verde e o vermelho, até a tonalidade vinho, formando um conjunto ornamental de grande beleza (**Figura 1.10**) (188). Suas características morfológicas incluem: flores actinomorfas, planas, hermafroditas e dicogâmicas, sem odor e reunidas em inflorescências terminais racemosas. As flores possuem pedicelo cilíndrico muito desenvolvido, também de cor vinho. O modo como a flor e o pedicelo são estruturados e a similaridade de suas cores conferem ao conjunto o aspecto de uma flor tubulosa (186).



Figura 1.10. Exemplo fotográfico de uma espécie da família utilizada neste estudo.

Fonte: <http://www.arboretto.blogspot.com.br>, acessado em setembro de 2012 (189).

De forma geral, são escassas as informações científicas a cerca da utilização das espécies de *Marcgraviaceae*. Pouco se sabe sobre sua utilização pela sabedoria popular, tendo apenas registro para *Marcgravia umbellata*, considerada diurética e anti-sifilítica na medicina popular das Antilhas, onde são empregadas todas as partes da planta (190).

Do ponto de vista da Química, são raros os registros que identifiquem substâncias do metabolismo secundário de espécies de *Marcgraviaceae* (191). Dentre as substâncias já identificadas em diferentes partes de uma espécie de *Marcgraviaceae*, encontram-se os mono e sesquiterpenos, ácidos graxos, ésteres graxos, hidrocarbonetos, triterpenos, além de flavonoides glicosilados (186).

Testes farmacológicos realizados com a espécie utilizada, com o intuito de avaliar potencialidades biodinâmicas já foram realizados, como testes de citotoxicidade e inibição na produção de óxido nítrico, demonstrando sua atividade anti-inflamatória (182). Sua atividade antimicrobiana também foi descrita para alguns extratos e frações (186). Devido a essas propriedades farmacológicas, ela atraiu a atenção da equipe da Dr^a. Maria Raquel Figueiredo (Farmanguinhos), que vem estudando as propriedades químicas, e de nossa equipe, que a partir do conhecimento fitoquímico, pôde estudar os efeitos antivirais e imunomoduladores.

As informações a respeito da espécie utilizada no presente trabalho foram mantidas em sigilo, devido ao seu potencial no desenvolvimento de um fitoproduto e pedido de sua patente.

2- OBJETIVOS

2.1- Geral

Caracterizar os efeitos antiviral e imunomodulador de uma espécie da família *Marcgraviaceae*, em modelo *in vitro* de infecção de células HuH-7 com DENV-2.

2.2- Específicos

- Estabelecer um modelo de infecção de acordo com a cinética de detecção do Ag viral e produção de citocinas em linhagem de células hepáticas (HuH-7);
- Realizar triagem de compostos efetivos entre uma fração butanólica e 4 de suas subfrações, utilizando ensaios de detecção da taxa de infecção e dosagem de MIF.
- Selecionar duas frações/subfrações para uma melhor caracterização, avaliando as seguintes atividades:

Antiviral:

- 1- Determinar a taxa de proteína viral não estrutural -NS1- no sobrenadante das culturas;
- 2- Determinar a concentração de óxido nítrico produzido pelas células;

Imunomoduladora:

- 1- Dosar a citocina IL-8, no sobrenadante das culturas;

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Meios de cultura e reagentes

Meio Dulbeco's #41300-070 – Gibco

Meio RPMI 1640 #11875-093 – Gibco

Albumina Bovina (BSA) #A-7906 – Sigma

Aminoácidos não-essenciais #11140-050 – Gibco

Azul de Trypan 0,4% #T8154 – Sigma

Bicarbonato de Sódio P.A. #302 – ISOFAR

DAPI com anti-fade # S36938 – Molecular Probes

Estreptavidina-HRP #43-4323 – Zymed

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

Fungizona – #15290-018 – Gibco

HEPES #15630 – Gibco

Human IL-8 ELISA Development Kit #900-k18 - Peprotech

Human MIF ELISA Development Kit #DY289 - R&D Systems

Human TNF- α ELISA Development Kit #DY210 – R&D Systems

L-Glutamina #21051-024 – GibcoBRL

Paraformaldeído #P6148-500G – Sigma

Penicilina-Estreptomicina #BR30110-01 – LGC

Platelia Dengue NS1 Ag Kit #12830 - Biorad

Saponina #S-7900 – Sigma

Soro Fetal Bovino #041M3396 – Sigma

TMB (tetrametilbenzidina) #002023 – Invitrogen

Tripsina com EDTA #T4049 - Sigma

Triptose Fosfato #T8782 – Sigma

Triton X-100 # 036k00851 - Sigma

Tween 20™ (*Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate*) #P-9416 – Sigma

Vybrant MTT cell proliferation Assay Kit # V-13154 – Molecular Probes

3.2- Soluções

PBS (Tampão fosfato) pH 7.4 (10x)

Cloreto de sódio.....	80 g
Cloreto de potássio.....	2 g
Fosfato dibásico de sódio.....	28,98 g
Fosfato monobásico de potássio.....	2 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Bicarbonato de Sódio

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

Solução de azul de trypan 2%

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

•Soluções para Citometria de Fluxo e Imunofluorescência

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

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

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

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

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

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

Solução de fixação – Paraformaldeído 2% PBS 1x

Paraformaldeído	2 g
PBS q.s.p.	100 mL

•Soluções para ELISA MIF

Solução de lavagem – Tween 20 0,05% PBS 1x

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

Solução diluente/bloqueio - BSA 1% PBS 1x

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

•Soluções para ELISA IL-8 e TNF- α

Solução de lavagem – Tween 20 0,05% PBS 1x

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

Solução diluente- BSA 0,1% Tween 20 0,05% PBS 1x

BSA	0,1 g
Tween 20	0,05 mL
PBS q.s.p.	100 mL

Solução de bloqueio - BSA 1% PBS 1x

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

•Soluções para Reação de Griess

N-(1-Naftil)-etilenodiamina, 0,1%:

N-(1-Naftil)-etilenodiamina.....50 mg
H₂O.....50 mL

Sulfanilamida, 1% em ácido fosfórico (5%):

Sulfanilamida.....500 mg
Ácido fosfórico 5%.....50 mL

Ácido fosfórico 5%:

Ácido fosfórico 85%1 mL
H₂O.....16 mL

•Reconstituição dos reagentes do kit *Platelia Dengue NS1 Ag*

Lavagem – 1/20 em água destilada

Conjugado – 1/50 em diluente

3.3- Anticorpos

Anticorpo anti-Dengue complexo IgG_{2a} de camundongo (1/100) #MAB8705 – Millipore;

Anticorpo controle isotipo IgG_{2a} de camundongo (1/100) #MABC004 – Chemicon;

Anticorpo IgG-Alexa Fluor 488 de camundongo (1/400) #557782 - Invitrogen

3.4- Metodologia

3.4.1- Cepa viral

Para os ensaios de infecção e tratamento da linhagem de células HuH-7 foi utilizada uma cepa asiática padrão universal - 16681 do vírus DENV-2, cedida pelo Dr. Halstead do Instituto Militar de Pesquisa Walter Reed, Maryland/EUA. O lote 13 do vírus foi passado duas vezes, em célula epitelial de rim de macaco Rhesus (LLCMK2), e crescido em células de glândula salivar de mosquito *Aedes albopictus* (C6/36). A ativação inicial do vírus foi realizada em tubos de ensaio contendo monocamada de células C6/36. Para a verificação do efeito citopático (CPE), a cultura foi mantida à 28°C e observada por um período de 7 a 10 dias. Após a verificação de 50% de CPE, o sobrenadante da cultura foi recolhido e mantido à -70°C. Para confirmar a presença do vírus na célula foi realizada Imunofluorescência Indireta.

3.4.2- Produção de massa viral

As células C6/36 foram cultivadas em garrafas de 150 cm² com meio Dulbecco's suplementado com 0,4% de fungizona, 1,4% de bicarbonato de sódio, 1% de L-glutamina e penicilina-estreptomicina, 0,5% de aminoácidos não-essenciais, 10% de triptose fosfato e 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram mantidas em estufa à 28°C até a formação da monocamada e, então, utilizadas para a produção e titulação da massa viral. Foi realizada uma diluição 1/5 do inóculo viral em meio Dulbecco's e adicionados 3 mLs na cultura. Após 90 min., o inóculo viral foi retirado e adicionados 50 mLs de meio de cultura suplementado com 2% SFB. As garrafas foram mantidas em estufa à 28°C por 7 a 10 dias e observadas diariamente para verificação do CPE. Quando observado mais de 50% de CPE, o sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 1200 rpm por 10 min. e armazenado à -70°C. Foi realizada imunofluorescência indireta, utilizando filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC). A massa viral de DENV-2 (16681) utilizada nos experimentos com as células HuH-7 foi recuperada no décimo dia após infecção.

3.4.2a- Titulação da massa viral

As células C6/36 foram colocadas em placa de 96 poços e, após a formação da monocamada, foram infectadas com diferentes diluições do inóculo viral (10^{-1} - 10^{-11}), previamente armazenado a -70°C . As culturas foram observadas por um período de 7 a 10 dias e, após observado 50% de efeito citopático, as células foram transferidas para lâminas e fixadas com acetona por 5 min. As lâminas foram marcadas com anticorpo primário anti-dengue complex (1/100) e secundário anti-igG de camundongo (1/50) marcado com FITC. A leitura foi realizada em microscópio óptico de fluorescência e o título viral calculado como TCID₅₀ (do inglês *50% tissue culture infectious dose*), utilizando-se os cálculos de Reed & Munch (1938). O título viral obtido foi de $1,37 \times 10^{-8}$ TCID₅₀ /mL.

3.4.3- Amostras vegetais

Foi dada preferência às amostras originárias de plantas medicinais que apresentavam atividades imunomoduladoras e/ou antivirais de uso popular ou já determinadas cientificamente. Para este estudo foram utilizadas uma fração butanólica e quatro de suas sete subfrações (26-30, 40-43, 89-98 e 99-134), derivadas de um extrato bruto etanólico de folhas de uma espécie de *Marcgraviaceae*. A família utilizada já foi descrita pela sua ação anti-inflamatória em macrófagos peritoneais de camundongo (Rocha, 2002). As frações/subfrações foram cedidas pela Dr^a. Maria Raquel Figueiredo, laboratório de Produtos naturais (PN3) Far-Manguinhos/FIOCRUZ. As características das amostras testadas não foram mencionadas por motivo de sigilo, devido ao potencial de patentabilidade das mesmas.

3.4.3a- Obtenção e diluição das amostras vegetais

O extrato bruto etanólico de folhas foi obtido por maceração dinâmica em agitador orbital, utilizando-se a proporção aproximada de 5 mLs de etanol absoluto por grama de folhas moídas (foram utilizados 975,0 g de folhas). Após a extração, o líquido repleto de substâncias da planta (extrato bruto líquido) foi filtrado e seu solvente retirado, para obtenção do extrato bruto seco. O extrato foi, então, fracionado através de uma partição líquido-líquido, onde o mesmo foi solubilizado em uma mistura de água e metanol (9:1). Posteriormente, essa solução do extrato

foi levada a um funil de separação e a partição foi feita com solventes imiscíveis em água, como o butanol. A fração butanólica, resultante dessa partição, foi submetida ao procedimento de cromatografia em contracorrente (186), a partir do qual foram geradas as subfrações utilizadas neste estudo. A obtenção de todas as amostras foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais 3, por Vagner Pereira da Silva. As amostras foram recebidas liofilizadas, com peso aproximado de 5 mg e foram solubilizadas em 1% de DMSO, com o auxílio do banho-ultrassônico. Então, foram diluídas em PBS 1X, ficando as soluções estoques na concentração de 1mg/mL. Para esterilização das amostras foi utilizado o Irradiador Gammacell 220 com fonte de cobalto-60, usado em irradiação de alimentos e teste em dosímetros, do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) - UFRJ, sendo utilizados 67.200 rads. Após a irradiação, as amostras foram alíquotadas e armazenadas à -20°C.

3.4.4- Cultura de células HuH-7

A linhagem de células hepáticas, HuH-7, foi cultivada em garrafas de 25 cm³ com meio Dulbecco's suplementado com 0,4% de fungizona, 1,4% de bicarbonato de sódio, 1% de L-glutamina e penicilina-estreptomicina e 10% SFB. As culturas foram mantidas em estufa à 37°C/5%CO₂ e observadas até a formação da monocamada para a realização dos ensaios de infecção e tratamento com as amostras vegetais.

3.4.5- Infecção de células HuH-7

As células HuH-7 foram contadas e plaqueadas na concentração de 10⁵ céls/poço, em placa de 48 poços e mantidas em estufa à 37°C/5%CO₂ até a formação da monocamada. Após este período, o sobrenadante das culturas foi descartado e adicionados 300µL do inóculo viral, diluído 1/5 em meio Dulbecco's sem SFB. As placas foram incubadas à 37°C/5%CO₂ por 2h para adsorção do vírus. Após o período de adsorção, o inóculo foi descartado e adicionados 1mL de meio de cultura ou amostras vegetais diluídas em meio de cultura (100, 10 e 1µg/mL), suplementados com 2% de SFB. Meios de culturas de células não infectadas foram utilizadas como controle negativo da infecção.

3.4.5a- Cinética da infecção

Para o estabelecimento do melhor dia de infecção do DENV-2, as células HuH-7 foram analisadas quanto à detecção de Antígenos (Ags) virais por um período de 3 dias. Para isso, foi realizado o ensaio de marcação intracelular do Ag viral, por citometria de fluxo. O detalhe deste procedimento está descrito abaixo.

3.4.5b- Cinética do perfil das citocinas

Para definir quais citocinas seriam produzidas durante a infecção *in vitro* de células HuH-7 com o DENV-2 e o melhor dia a ser selecionado para os ensaios de avaliação da atividade imunomoduladora das amostras testadas nesse estudo, as células foram incubadas em estufa a 37 °C / 5% CO₂ por um período de 3 dias. O sobrenadante foi recolhido diariamente e armazenado à -20⁰ C, para a posterior dosagem das citocinas avaliadas, por ELISA.

3.4.5c- Tratamento de células HuH-7 com frações/subfrações

Após a infecção de células HuH-7 com DENV-2, o inóculo viral foi descartado e adicionados 1 mL das frações/subfrações diluídas em meio de cultura Dulbecco's, com 2% de SFB. A fração butanólica foi utilizada apenas na concentração de 1µg/mL, a qual demonstrou ação antiviral e imunomoduladora em modelo de infecção de monócitos humanos, de acordo com nosso trabalho anterior (192). As subfrações foram testadas em três concentrações diferentes: 100µg/mL, 10µg/mL e 1µg/mL. Após o tratamento, as células foram mantidas em estufa à 37 °C /5% CO₂ por 48h. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20⁰ C para posterior dosagem das citocinas. Foi, então, realizada a marcação intracelular do antígeno viral, por citometria de fluxo. Células não-infectadas e não-tratadas, foram utilizadas para avaliação do nível basal de produção de citocinas. Além disso, células não-infectadas e tratadas com as frações/subfrações foram utilizadas para avaliar se as amostras estariam de alguma forma interferindo nos ensaios.

3.4.6- Ensaio de citotoxicidade celular por MTT

As células HuH-7 foram plaqueadas, em microplaca de 96 poços, na concentração de 10⁵ células/poço e mantidas em estufa à 37°C/5%Co₂ até a

formação da monocamada. Em seguida, as células foram tratadas com a concentração de 1µg/mL da fração butanólica e as concentrações de 100, 10 e 1µg/mL das subfrações, por 48 horas. O meio das culturas tratadas foi, então, removido e substituído com 100 µL de meio Dulbecco's fresco. Foi utilizado como controle positivo de viabilidade celular, células com meio de cultura sem tratamento, e células tratadas com Tween 20[®] 3% foram utilizadas como controle negativo de viabilidade celular. Posteriormente, foram adicionados 10 µL/poço da solução estoque MTT 12 mM. Após incubação por 3 horas à 37°C, foram adicionados 50 µL/poço de DMSO, seguido de cuidadosa homogeneização com o uso da pipeta. A placa foi incubada à 37°C por mais 10 min. e a absorbância lida em filtro de 570 nm

3.4.7- Citometria de fluxo

Para avaliação da taxa de infecção de células HuH-7 infectadas e tratadas com as frações/subfrações foi feita a marcação intracelular dos antígenos virais, através da citometria de fluxo.

3.4.7a- Marcação intracelular do antígeno viral

Foram recolhidas quatro alíquotas de 150µL do sobrenadante, de cada poço, e armazenadas a -20°C para posterior dosagem das citocinas e outros mediadores inflamatórios. As células foram recuperadas pela adição de 150 µL de tripsina com edta e transferidas para placa de 96 poços. Após a centrifugação a 1300rpm/7min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200µL de solução de lavagem. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1300rpm/7min, o sobrenadante foi descartado e adicionados 100µL de paraformoldeído 2%. Após incubação a 4°C/20min. foram adicionados 100µL de solução de permeabilização, seguindo centrifugação a 1300rpm/7min. O sobrenadante foi retirado, as células ressuspensas em 200µL de solução de permeabilização e incubadas a 4°C/10min. As células foram, novamente, centrifugadas, o sobrenadante descartado e as mesmas ressuspensas em 100µL de solução de bloqueio. Após incubação a 4°C/30min foram adicionados 100µL da solução de permeabilização, seguindo centrifugação a 1300rpm/7min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 20µL de anticorpo primário (Anti-DENV Complex/Isotipo IgG2a diluído 1:100/1:50 em solução de permeabilização) e incubadas a 4°C/60min.

Posteriormente, as células foram lavadas com 150µL da solução de permeabilização e centrifugadas a 1300rpm/7min. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 20µL de anticorpo secundário (Alexa Flúor 488 diluído 1:400 em solução de permeabilização) e incubadas a 4°C/30 min. As células foram lavadas com 150µL da solução de permeabilização e centrifugadas a 1300rpm/7min. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 200µL de paraformoldeído 2%, transferidas para tubos de citometria e armazenadas a 4°C até o momento da leitura em citômetro de fluxo. As análises dos resultados foram realizadas no programa FlowJo 7.6.

3.4.8- Imunofluorescência Indireta para microscopia

Para a detecção qualitativa por microscopia de Ags virais durante a cinética de infecção de células HuH-7, também foi utilizada a técnica de Imunofluorescência, com o uso dos fluoróforos Alexa Flúor 488 (Excitação: 488 nm/Emissão: 519 nm – Fluorescência verde) e DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Excitação: 358 nm/Emissão: 461 nm – Fluorescência azul).

3.4.8a- Detecção do antígeno viral

Para análise da cinética de infecção do DENV-2, através da imunofluorescência, as células HuH-7 foram cultivadas em câmaras sobre lâminas (Labtech), na concentração de 10^5 células/poço e mantidas em estufa à 37°C/5%CO₂ por 24 hs. Após este período, as células foram infectadas por um período de 3 dias. Diariamente, os sobrenadantes das culturas foram recolhidos e as células lavadas com 100 µL de PBS 1x por duas vezes à temperatura ambiente (TA). A fixação foi feita com 200 µL de paraformaldeído 2%, por 20 min./TA e, então, as células foram lavadas com solução de permeabilização por 3 vezes, sendo a última vez seguida de incubação por 20 min./TA. Foram adicionados 100 µL de solução de bloqueio por 30 min./TA e, posteriormente, foi realizada a lavagem com 100 µL de solução de permeabilização por 2 vezes. As células foram, então, marcadas com anticorpo primário anti-dengue complexo (DENV1-4) IgG_{2a} de camundongo (diluído 1:100 em solução de permeabilização) e seu isotipo IgG_{2a} de camundongo (diluído 1:100 em solução de permeabilização) por 60min./37°C/TA, seguidas de lavagem 2 vezes com solução de permeabilização. Após a lavagem, foi feita a marcação com anticorpo

secundário Alexa Fluor 488 de camundongo (diluído 1:400 em solução de permeabilização) por 30min./TA. A lavagem foi feita com solução de permeabilização por 2 vezes, seguida de uma lavagem com PBS 1x e, por último, uma lavagem com água destilada. As câmaras foram desmontadas, o silicone retirado, foi adicionado DAPI com anti-fade e, após a secagem parcial da lâmina, foi adicionada a lamínula e feita a vedação com esmalte. As lâminas foram mantidas à 4°C até a leitura em microscópio de fluorescência.

3.4.9- Detecção de citocinas e outros fatores solúveis nos sobrenadantes das culturas de células HuH-7

Para a dosagem das citocinas e outros mediadores inflamatórios avaliados neste estudo, a fim de estabelecer suas cinéticas de produção e possíveis atividades imunomoduladoras das frações/subfrações testadas, foi utilizada a técnica de ELISA. Para isso, foram utilizados os sobrenadantes das culturas previamente recolhidos e armazenados à -20° C.

3.4.9a- Detecção quantitativa de MIF

Primeiramente, em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de captura (diluído 1:180 em PBS 1x) *overnight* à temperatura ambiente. A placa foi lavada 3 vezes e bloqueada com 300 µL/poço de solução diluente por 1h/TA. Minutos antes do término da incubação a curva padrão do MIF foi realizada em tampão diluente nas seguintes concentrações: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,65, 0 pg/mL. Após 3 lavagens, foram distribuídos os sobrenadantes e a curva padrão (2000 – 0 pg/mL), seguido de incubação por 2h/TA e nova lavagem por 3 vezes. Foram, então, adicionados 100 µL/poço do anticorpo de detecção (diluído 1:180 em solução diluente) por 2h/TA e a placa foi lavada 3 vezes para a adição de 100 µL/poço de estreptavidina conjugada à peroxidase(HRP) por 20 min./TA. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens e adicionados 100 µL/poço de tetrametilbenzidina (TMB) por 20min./TA. Finalmente, foram adicionados 50 µL/poço de solução de parada e a placa foi lida no leitor de placa, em comprimento de onda de 450nm.

3.4.9b- Detecção quantitativa de IL-8

Foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de captura (diluído 1:200 em PBS 1x) em placa de 96 poços, e a mesma foi incubada *overnight* à TA. Após 4 lavagens, a placa foi bloqueada com 300 µL/poço da solução de bloqueio por 1h/TA., seguida de nova lavagem, 4 vezes. Minutos antes do término da incubação a curva padrão da IL-8 foi feita em tampão diluente nas seguintes concentrações: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,65, 0 pg/mL. Foram adicionados 100 µL/poço dos sobrenadantes e da curva padrão por 2h/TA, a placa foi lavada 4 vezes e adicionados 100 µL/poço do anticorpo de detecção (diluído 1:200 em solução diluente) por 2h/TA. Após 4 lavagens, foram adicionados 100 µL/poço de estreptavidina-HRP (diluída 1:200 em solução diluente) por 30 min./TA, seguida de lavagem por mais 4 vezes. Finalmente, foram adicionados 100 µL/poço de TMB e a placa foi lida no leitor de placa, em comprimento de onda de 620nm.

3.4.9c- Detecção quantitativa de TNF-α

Foram adicionados 100µL/poço de anticorpo de captura (diluído 1/100 em PBS 1X), para a sensibilização da placa de 96 poços, seguido de incubação *overnight* a temperatura ambiente (TA). Após a incubação, a placa foi lavada 4x com solução de lavagem e adicionados 280µL/poço de solução de bloqueio. A placa foi, então, incubada por 60 min à TA. Minutos antes do término da incubação a curva padrão do TNF-α foi feita em tampão diluente nas seguintes concentrações: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,65, 0 pg/mL. Após a incubação, a placa foi lavada 4x e distribuídos 100 µL das amostras e da curva padrão. Em seguida, a placa foi incubada *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, a placa foi lavada 4x e adicionados 100µL/poço de anticorpo de detecção (diluído 1/200 em tampão diluente), seguindo incubação por 2 horas em TA sob agitação suave. Após esse período, a placa foi lavada 6x e adicionados 100µL/poço de estreptavidina-HRP (peroxidase) (diluída 1/2000 em tampão diluente), a incubação ocorreu por 30 min em TA sob agitação suave. A placa foi lavada 8x e adicionados 100µL/poço de TMB. A placa foi incubada de 5 a 30 min a TA sob agitação suave e posteriormente lida no leitor de placa, em comprimento de onda de 620nm.

3.4.9d - Detecção de NS1

Em cada poço de uma placa de 96 poços foram adicionados 50µL de diluente, 50µL de amostra ou controle e 100µL de conjugado diluído. A placa foi adesivada e incubada em estufa seca à 37°C/90 min. Após a incubação, a placa foi lavada 6x com a solução de lavagem. Foram adicionados 160µL/poço de TMB. A placa foi incubada por 30 min./TA e 100µL/poço de solução STOP (H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico) foram adicionados. A leitura da placa foi feita no leitor de placa, em comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram calculados como uma taxa de NS1, através da divisão da D.O. de cada amostra pela D.O. do *cutoff*.

3.4.10- Reação de Griess

O reagente de Griess foi obtido a partir da mistura de N-(1-Naftil)-etilenodiamina e sulfanilamida na proporção de 1:1, ao abrigo da luz. Em microplaca de 96 poços, foram adicionados 100µL de amostras e 100µL do reagente de Griess, sendo, em seguida, o conteúdo dos poços homogeneizado. Após 10 minutos de incubação, à temperatura ambiente, foi realizada a determinação dos níveis de nitrito em leitor de placa (540nm), a partir de uma curva-padrão com valores entre 0 a 80 µM.

3.4.11- Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram analisados estatisticamente. A partir de testes de avaliação da normalidade da amostra (Teste Kolmogorov-Smirnov - KS) foram empregados os testes estatísticos descritos a seguir. O teste t pareado é um teste paramétrico e foi utilizado para as amostras que seguiam uma distribuição normal. Para as amostras que não seguiam uma distribuição normal, foi utilizado o teste não-paramétrico de Wilcoxon, que compara 2 grupos pareados. Ambos os testes foram utilizados para determinar a significância das diferenças observadas após o tratamento da infecção com as frações/subfrações. Valores de $p < 0,05$ determinam significância estatística.

4. RESULTADOS

4.1- Estabelecimento do modelo de infecção *in vitro* de células HuH-7 por DENV-2 para estudo dos efeitos antivirais e imunomoduladores de plantas medicinais

4.1.1- Cinética de infecção *in vitro* pelo DENV-2 em linhagens de hepatócitos (células HuH-7)

Os hepatócitos da linhagem humana de células HuH-7 foram infectados com DENV-2 e avaliados por um período de 24, 48 e 72 horas após a infecção para o estabelecimento do melhor ponto de detecção do antígeno viral (Ag) a ser utilizado nos ensaios de atividade antiviral das amostras testadas nesse estudo. Em cada ponto, as células foram recuperadas, submetidas à marcação intracelular com anticorpos específicos para detecção de Ag viral e analisadas por citometria de fluxo ou microscopia. **Na Figura 4.1**, a análise por citometria de fluxo das células recuperadas demonstra que a população de células HuH-7 utilizada corresponde à cerca de 70% (**Figura 4.1A**), de acordo com a avaliação dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulidade (SSC). O grupo controle, como era esperado, não apresentou marcação para o antígeno viral (**Figura 4.1B**), enquanto que a infecção com o DENV resultou, nesse experimento representativo, em cerca de 38% de células positivas para o Ag viral (**Figura 4.1C**). Durante a cinética de infecção do vírus foi possível detectar Ags virais nas primeiras 24 horas após a infecção, permanecendo presente em todos os dias analisados. Nas primeiras 24 horas ocorre o pico da infecção, correspondente à cerca de 60% de células positivas para o Ag viral, havendo uma pequena queda em 48 horas, para 45% e uma redução mais brusca, chegando a 30%, em 72 horas após a infecção (**Figura 4.2**). Foi utilizado como controle negativo da infecção, células HuH-7 não infectadas que, aparentemente, não mostraram marcação inespecífica.

A análise realizada por microscopia demonstra de forma qualitativa os dados observados através da citometria de fluxo. Os grupos controle, de células não-infectadas (**Figura 4.3, 4.4 e 4.5 - A**), e de células marcadas com anticorpo isotipo (**Figura 4.3, 4.4 e 4.5 - B**) não apresentaram marcação específica para o Ag viral, enquanto no grupo de células infectadas pelo DENV-2 foi observada uma marcação de DENV nos 3 dias analisados (**Fig. 4.3, 4.4 e 4.5 - C**). Nota-se uma maior infecção das células HuH-7 nos 2 primeiros dias, caracterizado pela maior intensidade de

fluorescência (Alexa-488). Já no terceiro dia após a infecção, observa-se uma queda na intensidade da fluorescência, representando a detecção de uma quantidade menor de Ag viral neste período.

De acordo com estes resultados, foi possível selecionarmos o ponto de 48 horas após a infecção para os ensaios de avaliação da atividade antiviral das amostras vegetais utilizadas nesse estudo. Neste ponto, ainda é possível a detecção de Ags virais em níveis adequados para nosso modelo de ensaio.

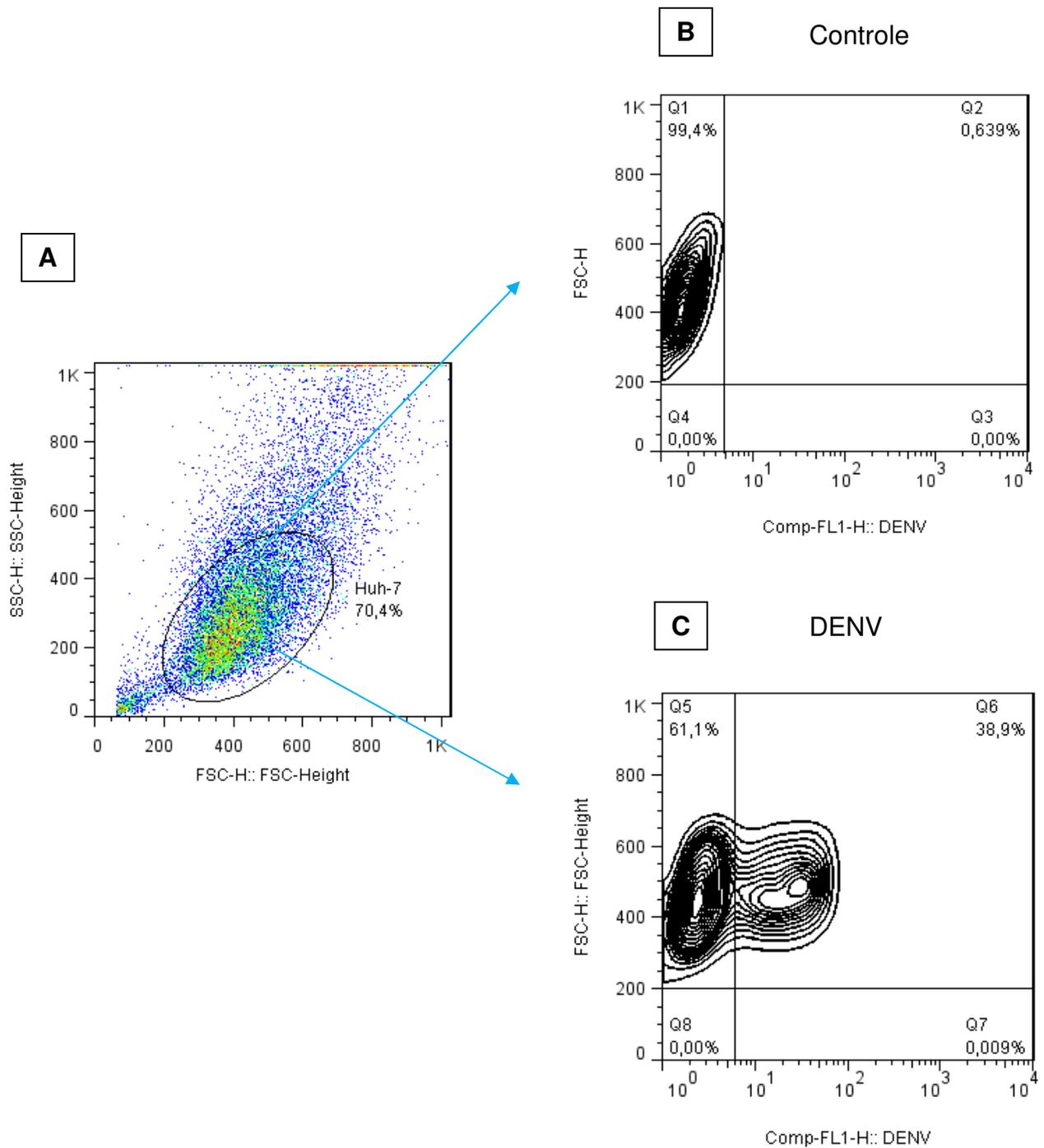


Figura 4.1. Marcação do antígeno viral por citometria de fluxo na população de células HuH-7. As células da região R1 foram selecionadas (A) e realizada marcação intracelular do Ag viral para o controle celular (B) e células infectadas com DENV (C). Esta é uma figura representativa das populações de HuH-7 que foram utilizadas no ensaio da cinética de infecção de DENV-2.

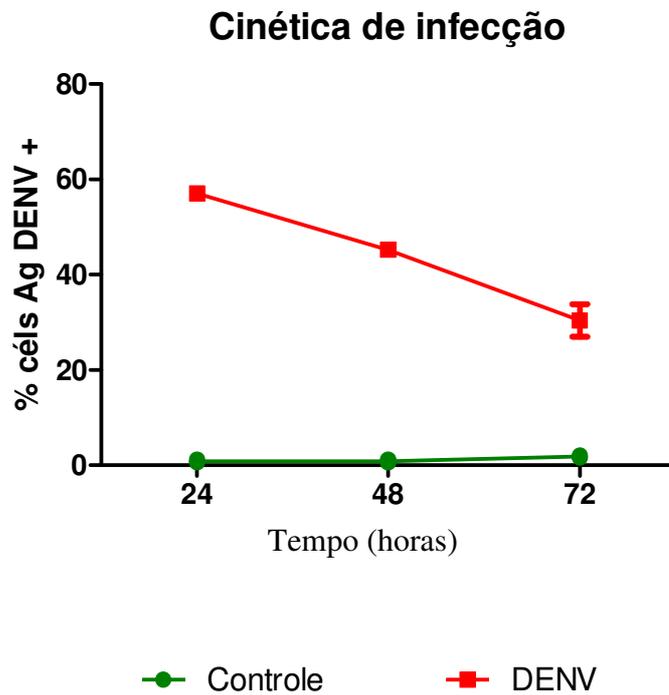


Figura 4.2. Cinética da infecção de DENV-2 em células HuH-7 realizada por citometria de fluxo. A detecção de células positivas para o Ag viral foi realizada por citometria de fluxo do dia 1-3 em células HuH-7 infectadas com DENV-2 ou incubadas com meio de cultura (Controle). O gráfico representa 3 experimentos independentes realizados.

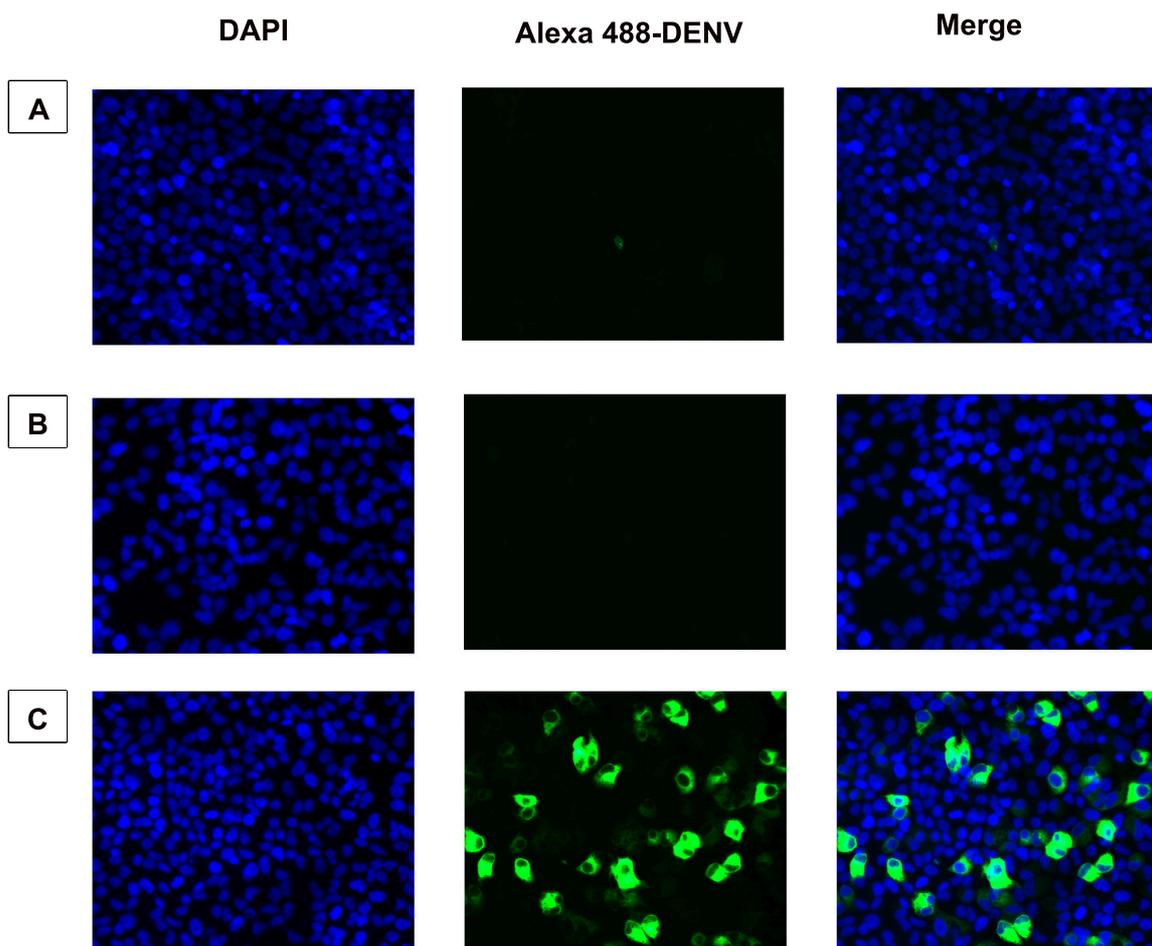


Figura 4.3. Detecção de DENV por microscopia 24 horas após a infecção de hepatócitos HuH-7. A detecção de células positivas para o antígeno viral foi realizada por imunofluorescência indireta em células HuH-7 infectadas com DENV-2 ou incubadas com meio de cultura (Controle). Foi feita a marcação utilizando-se anticorpo específico para o antígeno viral ou seu isotipo. **A-** Controle celular; **B-** Isotipo; **C-** DENV-2.

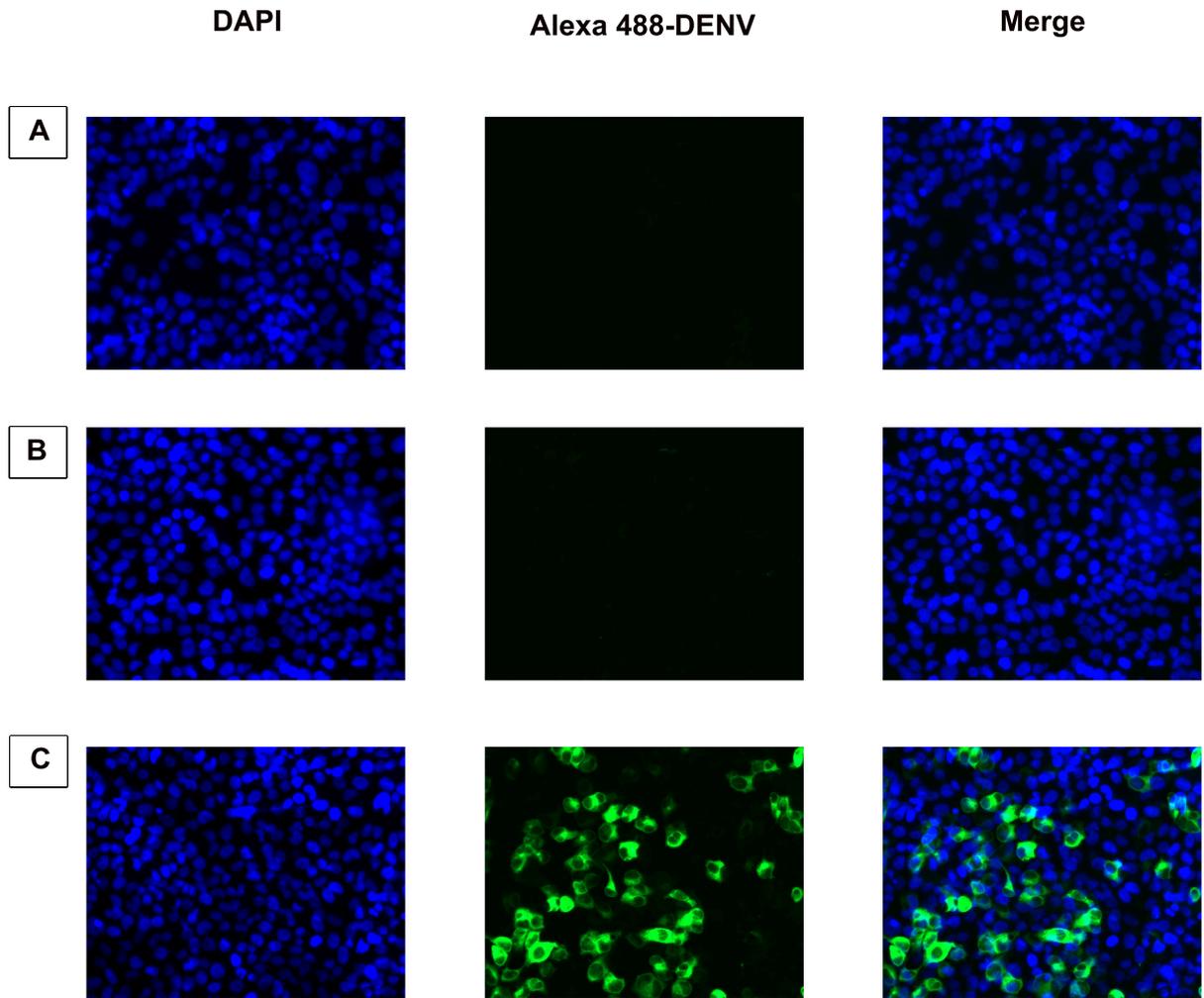


Figura 4.4- Detecção de DENV por microscopia 48 horas após a infecção de hepatócitos HuH-7. A detecção de células positivas para o antígeno viral foi realizada por imunofluorescência indireta em células HuH-7 infectadas com DENV-2 ou incubadas com meio de cultura (Controle). Foi feita marcação utilizando-se anticorpo específico para o antígeno viral ou seu isotipo. **A-** Controle celular; **B-** Isotipo; **C-** DENV-2.

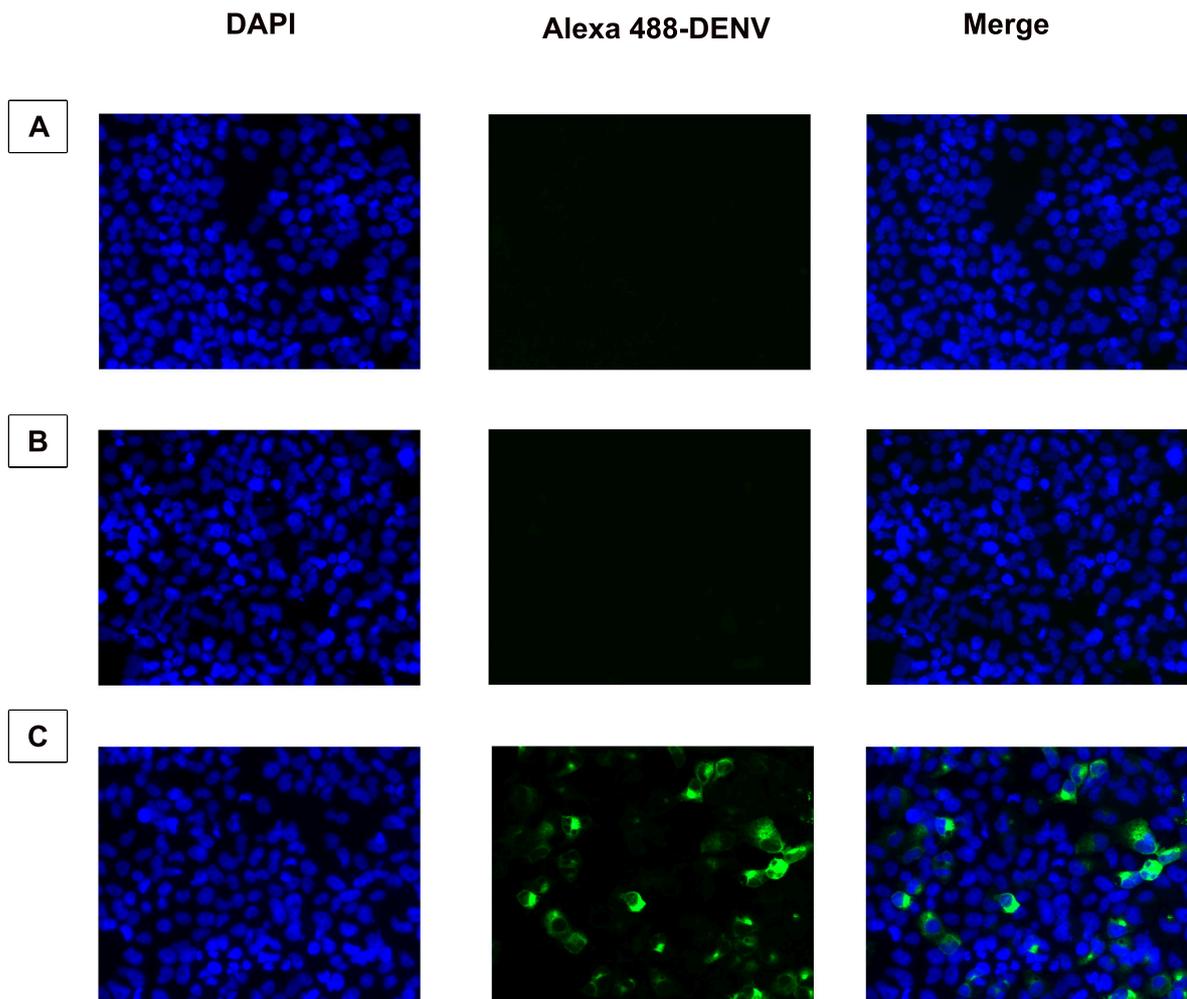


Figura 4.5. Detecção de DENV por microscopia 72 horas após a infecção de hepatócitos HuH-7. A detecção de células positivas para o antígeno viral foi realizada por imunofluorescência indireta em células HuH-7 infectadas com DENV-2 ou incubadas com meio de cultura (Controle). Foi feita marcação utilizando-se anticorpo específico para o antígeno viral ou seu isotipo. A- Controle celular; B- Isotipo; C-DENV-2.

4.1.2- Cinética da produção de citocinas/mediadores inflamatórios *in vitro* pelas células HuH-7 infectadas por DENV-2

Como já foi descrito anteriormente, as citocinas e outros mediadores inflamatórios possuem uma importante função na evolução da resposta imunológica no curso da dengue. Com isso, foi avaliado o perfil de produção de citocinas/mediadores inflamatórios pelas células HuH-7 durante infecção *in vitro* pelo DENV-2. Assim, os sobrenadantes das culturas de células infectadas foram recolhidos por um período de 24, 48 e 72 horas após a infecção e armazenados a -20°C para dosagem das seguintes citocinas/mediadores inflamatórios: TNF- α , IFN- α , IL-8, MCP-1 e MIF, pela técnica de ELISA. Os resultados apresentados na **Fig. 4.6** demonstram que, principalmente, MIF e IL-8 são produzidas pelas células HuH-7 durante os 3 primeiros dias de infecção. As demais citocinas/mediadores inflamatórios não apresentaram níveis detectáveis, tais como IFN- α e MCP-1 (dados não mostrados) ou demonstraram uma produção muito baixa, como é o caso do TNF- α (**Figura 4.6A**), não sendo possível sua utilização para os ensaios de avaliação da atividade imunomoduladora dos compostos vegetais. Nas primeiras 24 horas após a infecção observa-se uma baixa produção de MIF, havendo um pico em 48 horas, seguido de uma queda brusca em 72 horas (**Figura 4.6B**). O mesmo foi observado na cinética de produção de IL-8, com exceção para o período de 72 horas, onde sua produção permanece aumentando (**Figura 4.6C**). Com, isso o ponto de 48 horas após a infecção continuou sendo o ideal para a realização da triagem das amostras vegetais, por ser um ponto onde há níveis detectáveis de todas as citocinas avaliadas.

MIF e IL-8 exercem papel importante na fisiopatologia da dengue, agindo, por exemplo, no aumento da permeabilidade endotelial (59, 145). Estes fatores foram produzidos e detectados durante a infecção *in vitro* de células HuH-7 pelo DENV-2, no sobrenadante das culturas infectadas, sendo, portanto, adotados para avaliação nos ensaios de tratamento imunomodulador com as amostras vegetais selecionadas aqui.

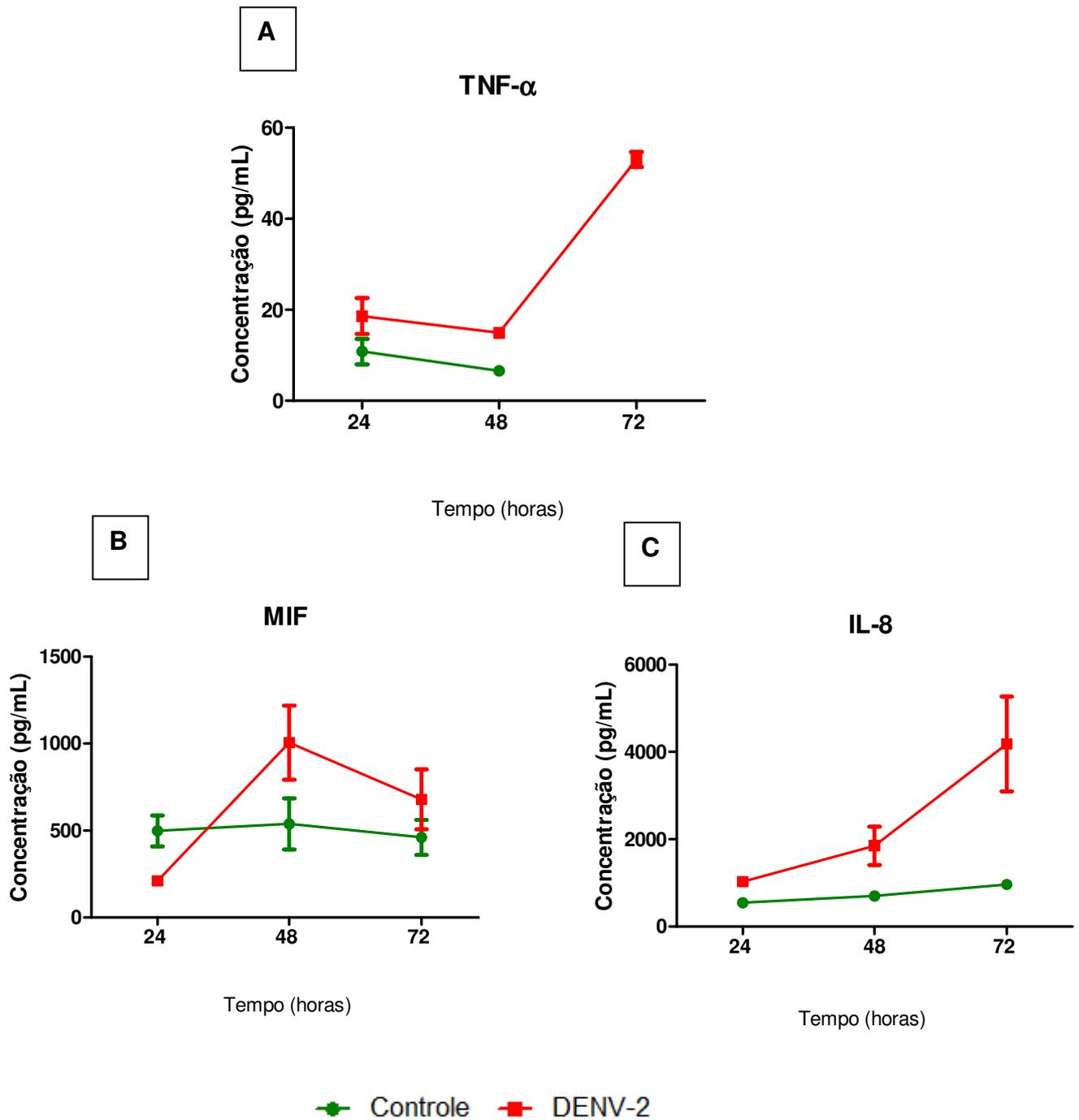


Figura 4.6. Cinética do perfil das citocinas durante infecção pelo DENV-2. A produção de TNF- α (A), MIF (B) e IL-8 (C) foi dosada pela técnica de ELISA em sobrenadantes de células HuH-7 infectadas com o vírus DENV-2 durante 3 dias. Cultura de células não-infectadas foram utilizadas como controles negativos.

4.2- Triagem das frações/subfrações de *Marcgraviaceae*

Após o estabelecimento do modelo de infecção de células HuH-7 pelo DENV-2 *in vitro*, foi realizada uma triagem para avaliação da ação antiviral e imunomoduladora da fração butanólica obtida a partir de extrato etanólico e quatro de suas subfrações (26-30, 40-43, 89-98 e 99-134), pertencentes à uma espécie de *Marcgraviaceae*. Nesta triagem foram avaliadas a taxa de infecção e produção de MIF em células HuH-7 infectadas e tratadas e, por fim, foi feita uma seleção de duas frações/subfrações para avaliação dos demais fatores/citocinas analisadas.

4.2.1- Avaliação da citotoxicidade celular por MTT

As amostras vegetais utilizadas neste estudo foram, primeiramente, avaliadas quanto à sua citotoxicidade em células HuH-7. Com base na cinética de infecção e produção das citocinas analisado anteriormente, as células foram tratadas por um período de 48 horas, e então, analisadas pelo ensaio de MTT. De acordo com dados já obtidos pela nossa equipe previamente, a fração butanólica foi testada apenas na concentração de 1µg/mL, sendo a concentração que demonstrou ação antiviral e imunomoduladora anteriormente em modelo de infecção *in vitro* com monócitos humanos (192). Suas subfrações foram testadas em três concentrações diferentes (1, 10 e 100 µg/mL) para a avaliação de seus possíveis efeitos antiviral e imunomodulador.

Os resultados demonstraram que nenhuma das concentrações testadas das amostras apresentou efeito citotóxico após 48 horas de tratamento, pois estas não reduziram o percentual de viabilidade celular quando comparadas ao controle positivo de cultura celular sem tratamento (**Figura 4.7**). Portanto, todas as concentrações puderam ser utilizadas nos ensaios posteriores. Além disso, foi possível observar que todas as amostras, na maioria das concentrações testadas foram capazes de aumentar a viabilidade das células, sugerindo um possível estímulo à proliferação celular (**Figuras 4.7A-4.7E**).

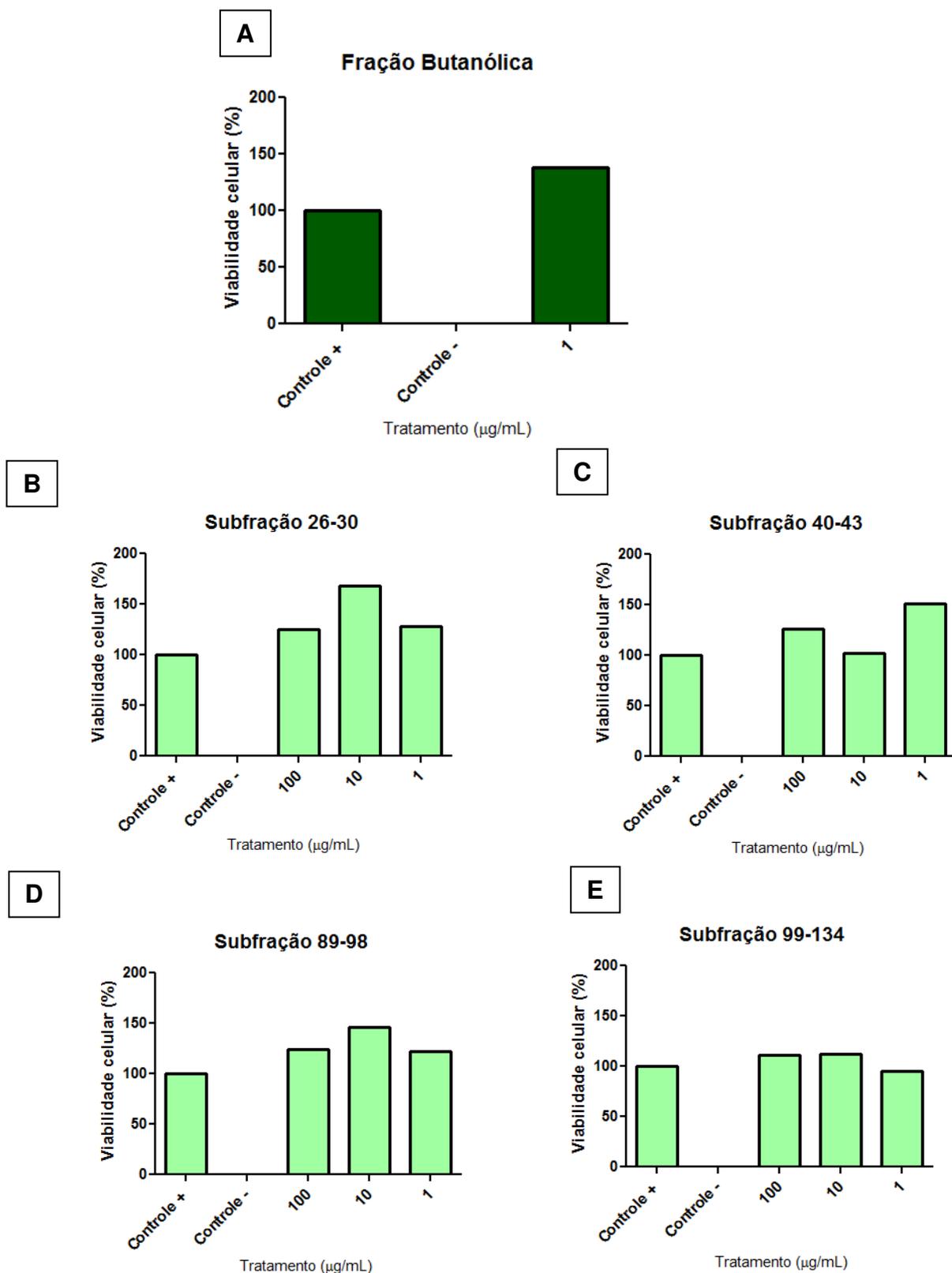


Figura 4.7. Avaliação da citotoxicidade celular por MTT de compostos originados de uma espécie de Marcgraviaceae. Células HuH-7 foram tratadas com a concentração de 1µg/mL da fração butanólica (A) e 100, 10 e 1µg/mL de suas subfrações (B, C, D e E) por 48 h, e a citotoxicidade das mesmas foi avaliada pelo método de MTT. Os dados foram normalizados utilizando-se como referência o controle positivo de células sem o tratamento (100% viabilidade celular). O controle negativo representa células tratadas com Tween 20 (0% viabilidade celular). Os gráficos representam a média das triplicatas de três experimentos independentes.

4.2.2- Avaliação da atividade antiviral das frações/subfrações em células HuH-7 por citometria de fluxo

Para a seleção das frações/subfrações obtidas de um extrato etanólico originado de uma espécie de *Marcgraviaceae* a serem utilizadas nos próximos ensaios, as células HuH-7 foram infectadas, tratadas e avaliadas quanto ao seu potencial antiviral, através da detecção dos Ags virais, por citometria de fluxo. Foram testadas as mesmas concentrações de cada amostra utilizada no ensaio de avaliação da citotoxicidade. Células não infectadas e tratadas com as frações/subfrações foram utilizadas para avaliar se as amostras estariam de alguma forma interferindo no ensaio, mas não foram observadas alterações. De acordo com a **Figura 4.8**, apenas a subfração 99-134 não demonstrou ação antiviral, pois não foi capaz de reduzir, de forma estatisticamente significativa, o percentual de células positivas para o antígeno DENV (**Figura 4.8E**), embora houvesse uma tendência de diminuição da carga viral evidenciada pela menor média da taxa de células infectadas e tratadas. A fração butanólica na concentração testada de 1µg/mL, reduziu significativamente a taxa de infecção do DENV-2 em células HuH-7 (**Figura 4.8A**). Dentre as suas demais subfrações, apenas a 26-30 demonstrou atividade em todas as concentrações testadas (**Figura 4.8B**). As subfrações 40-43 (**Figura 4.8C**) e 89-98 (**Figura 4.8D**) apresentaram atividade antiviral apenas quando testadas em suas maiores concentrações, de 10 e 100µg/mL. Já na concentração de 1µg/mL, essa atividade já não foi mais detectada.

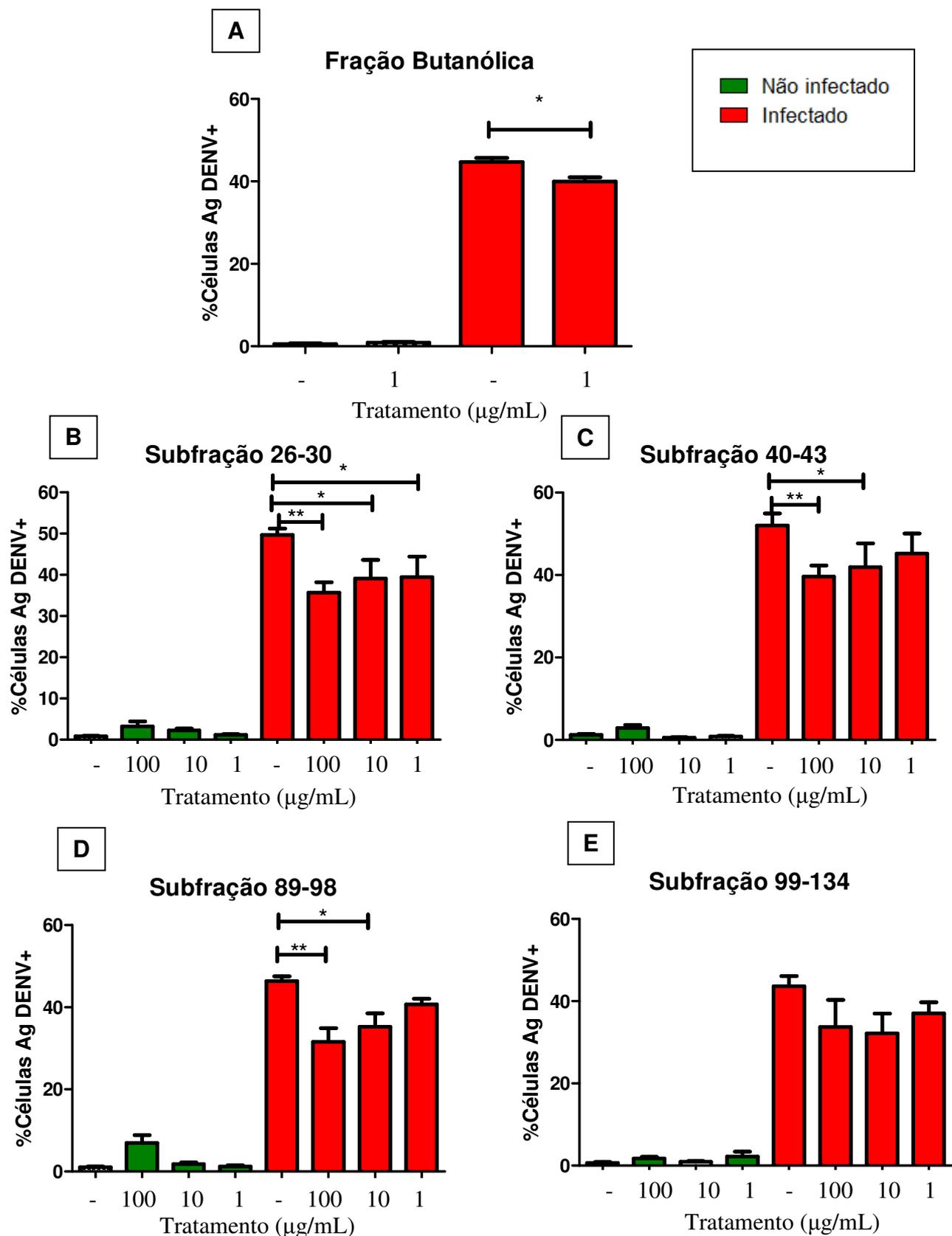


Figura 4.8- Avaliação da atividade antiviral da fração butanólica e subfrações originadas de extrato etanólico de Marcgraviaceae. As células HuH-7 foram submetidas a diferentes tratamentos com a concentração de 1µg/mL da fração butanólica (A) e 100, 10 e 1µg/mL de suas subfrações (B, C, D e E) e analisadas para a marcação intracelular do antígeno viral, por citometria de fluxo, no 2º dpi. *P<0,05 e **P<0,01 representam diferenças significantes, comparados ao grupo de células infectadas e não tratadas, pelo teste t pareado. Gráficos representam 3 experimentos realizados em triplicata cada (n=3).

4.2.3- Avaliação da atividade imunomoduladora das frações/subfrações em células HuH-7 por ELISA

Para a seleção das frações/subfrações quanto ao seu potencial imunomodulador, as células infectadas e tratadas foram avaliadas quanto a produção de MIF, um fator capaz de aumentar a permeabilidade endotelial, levando à gravidade da dengue (59).

O sobrenadante das culturas de células não-infectadas, tratadas ou não com as frações/subfrações, foram utilizados para verificação do nível basal de produção das citocinas. Conforme mostra a **Figura 4.9**, as subfrações 26-30 e 40-43, que haviam demonstrado ação antiviral anteriormente, não apresentaram ação imunomoduladora quanto à produção de MIF, pois não afetaram sua produção em células HuH-7 infectadas (**Figuras 4.9B e 4.9C**, respectivamente). A fração butanólica em sua concentração de 1µg/mL, foi capaz de reduzir de forma significativa a produção de MIF, em células infectadas (**Figura 4.9A**). Além disso, sua subfração 89-98, na concentração de 100µg/mL, também apresentou ação imunomoduladora quanto à produção de MIF (**Figura 4.9D**), assim como a subfração 99-134, que em suas maiores concentrações testadas reduziu significativamente a produção deste importante fator (**Figura 4.9E**).

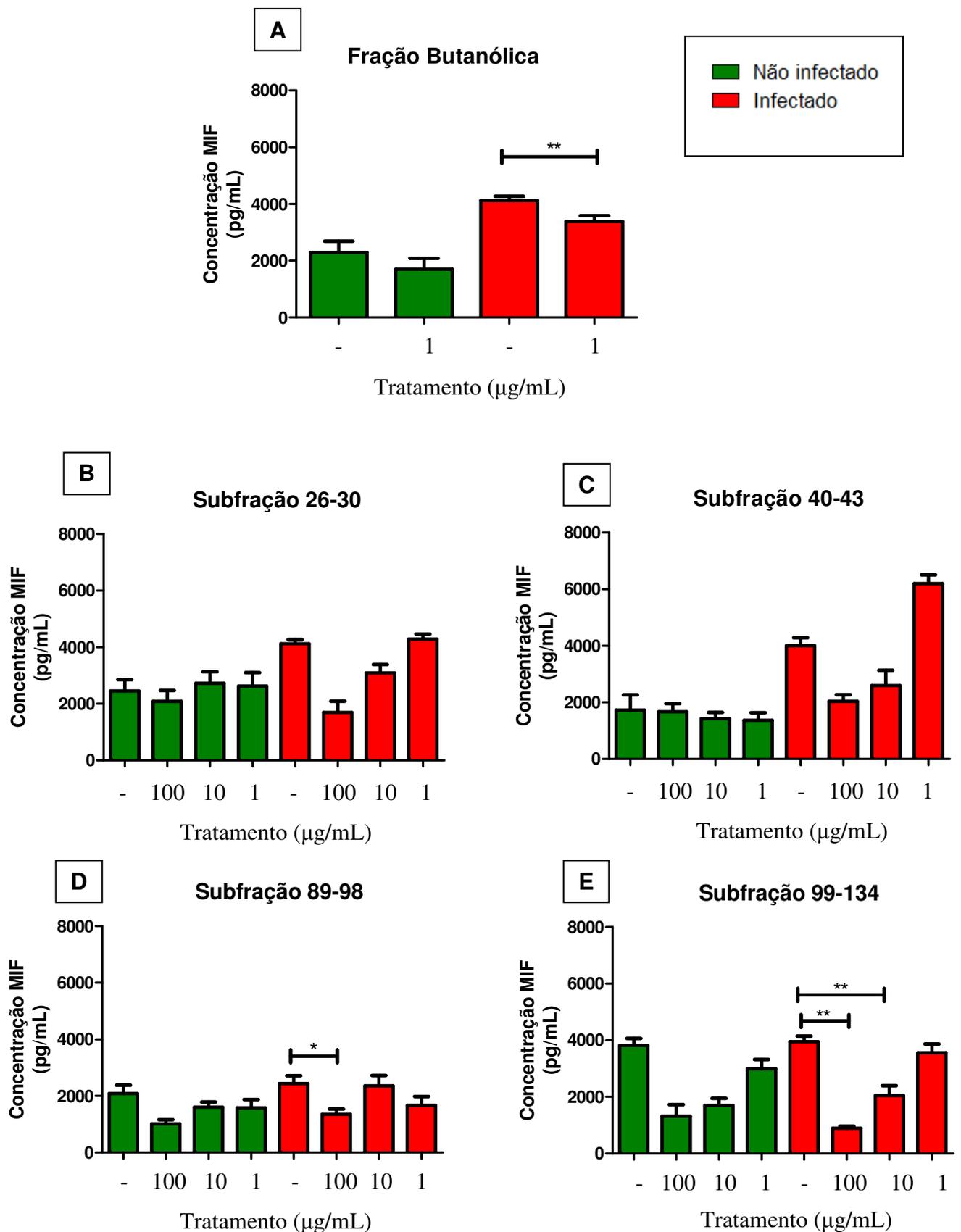


Figura 4.9. Avaliação da atividade imunomoduladora da fração butanólica e subfrações originadas de extrato etanólico de Marcgraviaceae. Os sobrenadantes das culturas de células HuH-7 infectadas e tratadas com a concentração de 1µg/mL da fração butanólica (A) e 100, 10 e 1µg/mL de suas subfrações (B, C, D e E), foram recolhidos no 2^o dpi para a dosagem de MIF. *P<0,05 e **P<0,01 representam diferenças significantes, comparados ao grupo de células infectadas e não tratadas, pelo teste de Wilcoxon. Gráficos representam 3 experimentos realizados em triplicata (n=3).

4.2.4- Caracterização de um possível efeito citotóxico das frações/subfrações por citometria de fluxo

Apesar dos resultados obtidos pelo ensaio de MTT, para avaliação da citotoxicidade das frações/subfrações de *Marcgraviaceae*, terem considerado as concentrações utilizadas como não citotóxicas, em nosso ensaio de citometria de fluxo foi observado um possível efeito citotóxico na concentração de 100µg/mL das subfrações. De acordo com as **Figuras 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13**, a região R1 característica de células HuH-7, de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulidade (SSC), apresentou uma perda de população celular, representada pelo menor percentual desta região, em células submetidas ao tratamento com a concentração de 100µg/mL das subfrações (**Figuras 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13 - B**) quando comparadas às células sem tratamento (**Figuras 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13- A**) ou tratadas com a concentração de 10µg/mL (**Figuras 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13- C**) ou 1µg/mL (**Figuras 4.10, 4.11, 4.12 e 4.13 - D**) Esta observação caracteriza, provavelmente, morte celular ou alteração morfológica causada pelas amostras. Por esse motivo, a concentração de 100µg/mL não foi utilizada nos ensaios posteriores para avaliação dos demais fatores analisados nesse estudo.

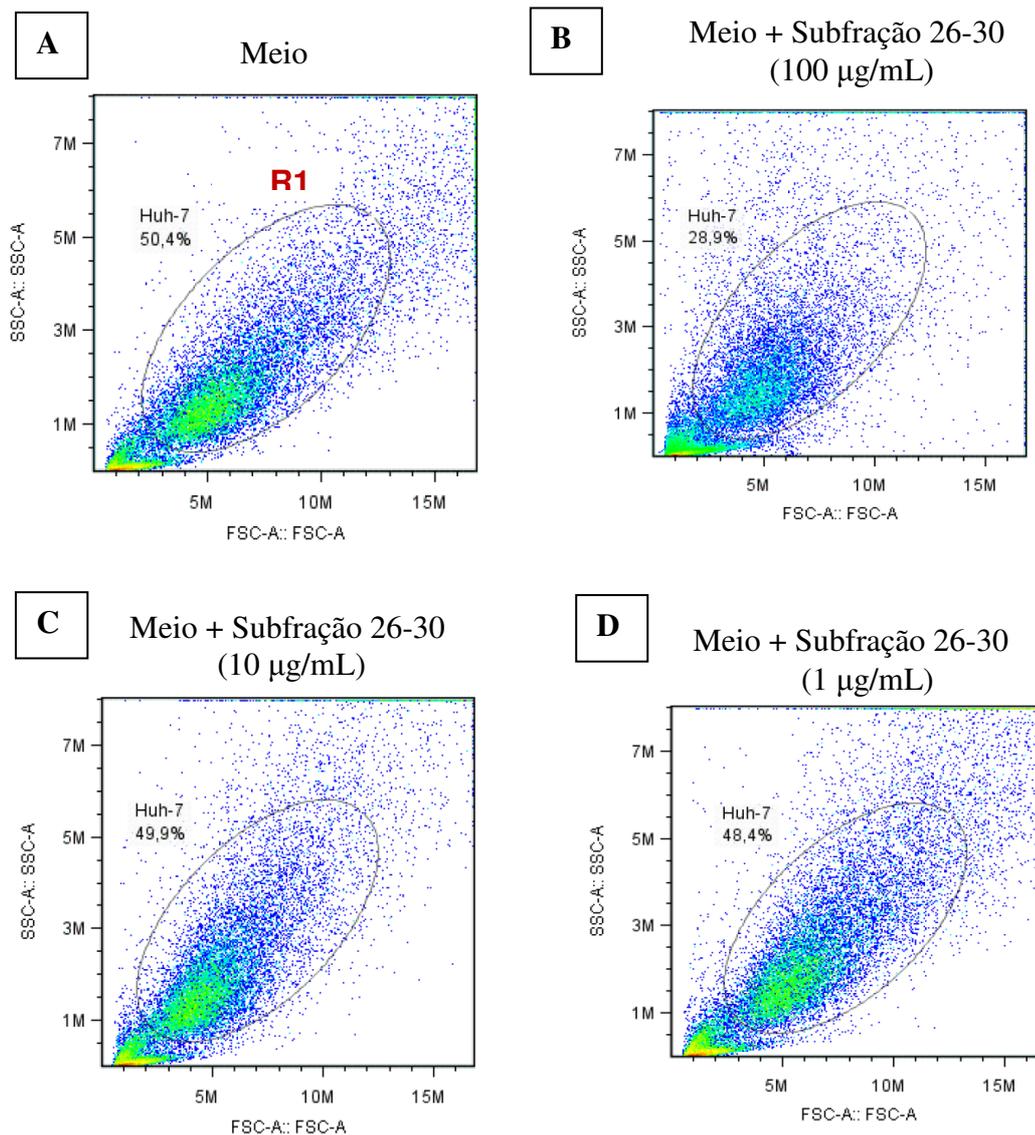


Figura 4.10. Alteração do perfil de tamanho e granulosidade evidenciando possível efeito citotóxico da subfração 26-30 no tratamento de células Huh-7 não infectadas. R1- região representativa da população de células Huh-7 a partir dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). **A.** Meio de cultura sem tratamento. **B.** Efeito do tratamento com a subfração 26-30 na concentração de 100 µg/mL. **C.** Efeito do tratamento com a subfração 26-30 na concentração de 10 µg/mL. **D.** Efeito do tratamento com a subfração 26-30 na concentração de 1 µg/mL. Nas concentrações de 100 µg/mL é observado a perda percentual de células na R1, possivelmente por morte celular.

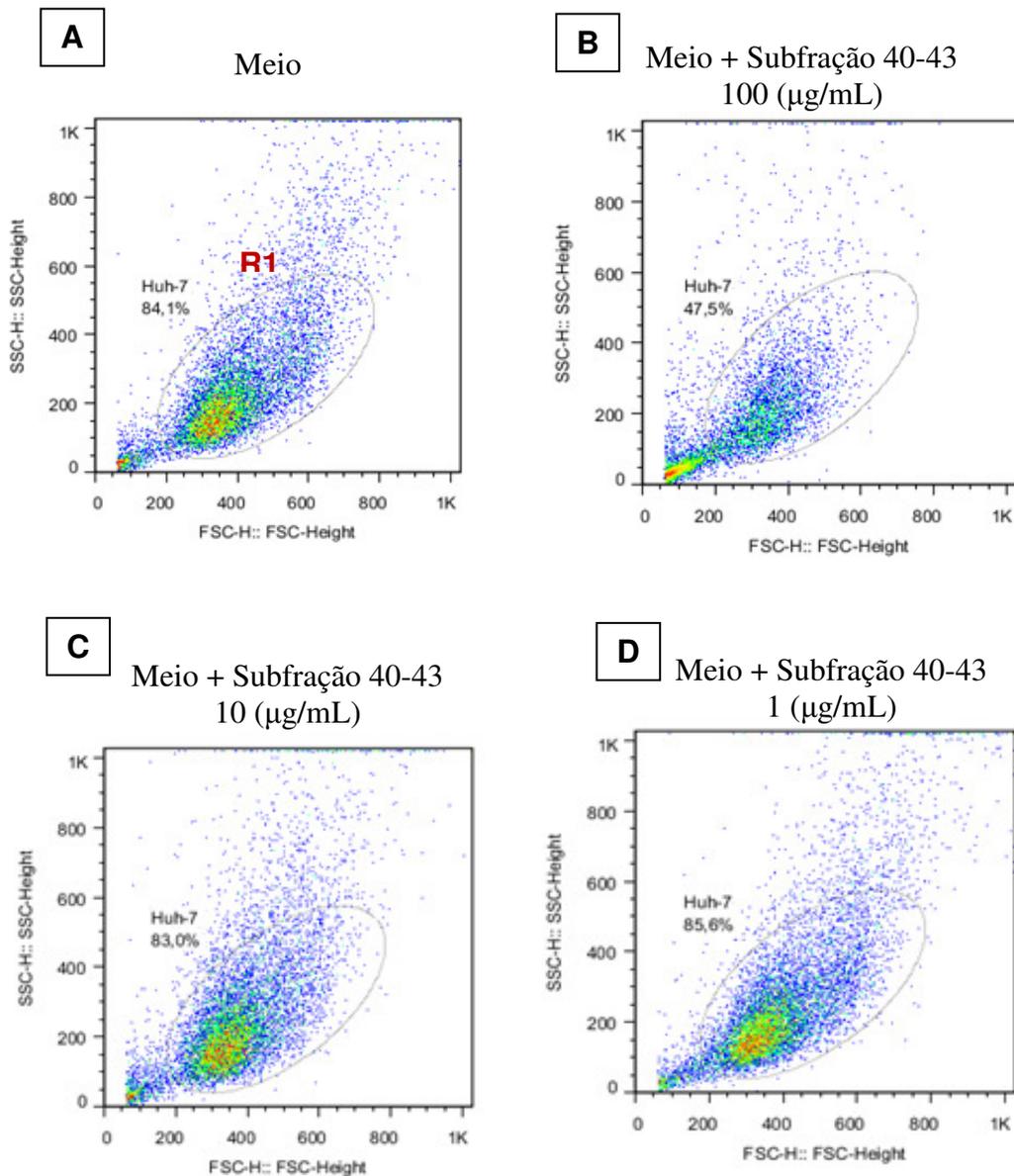


Figura 4.11. Alteração do perfil de tamanho e granulosidade evidenciando possível efeito citotóxico da subfração 40-43 no tratamento de células HuH-7 não infectadas. R1- região representativa da população de células Huh-7 a partir dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). **A.** Meio de cultura sem tratamento. **B.** Efeito do tratamento com a subfração 40-43 na concentração de 100 µg/mL. **C.** Efeito do tratamento com a subfração 40-43 na concentração de 10 µg/mL. **D.** Efeito do tratamento com a subfração 40-43 na concentração de 1 µg/mL. Nas concentrações de 100 µg/mL é observado a perda percentual de células na R1, possivelmente por morte celular.

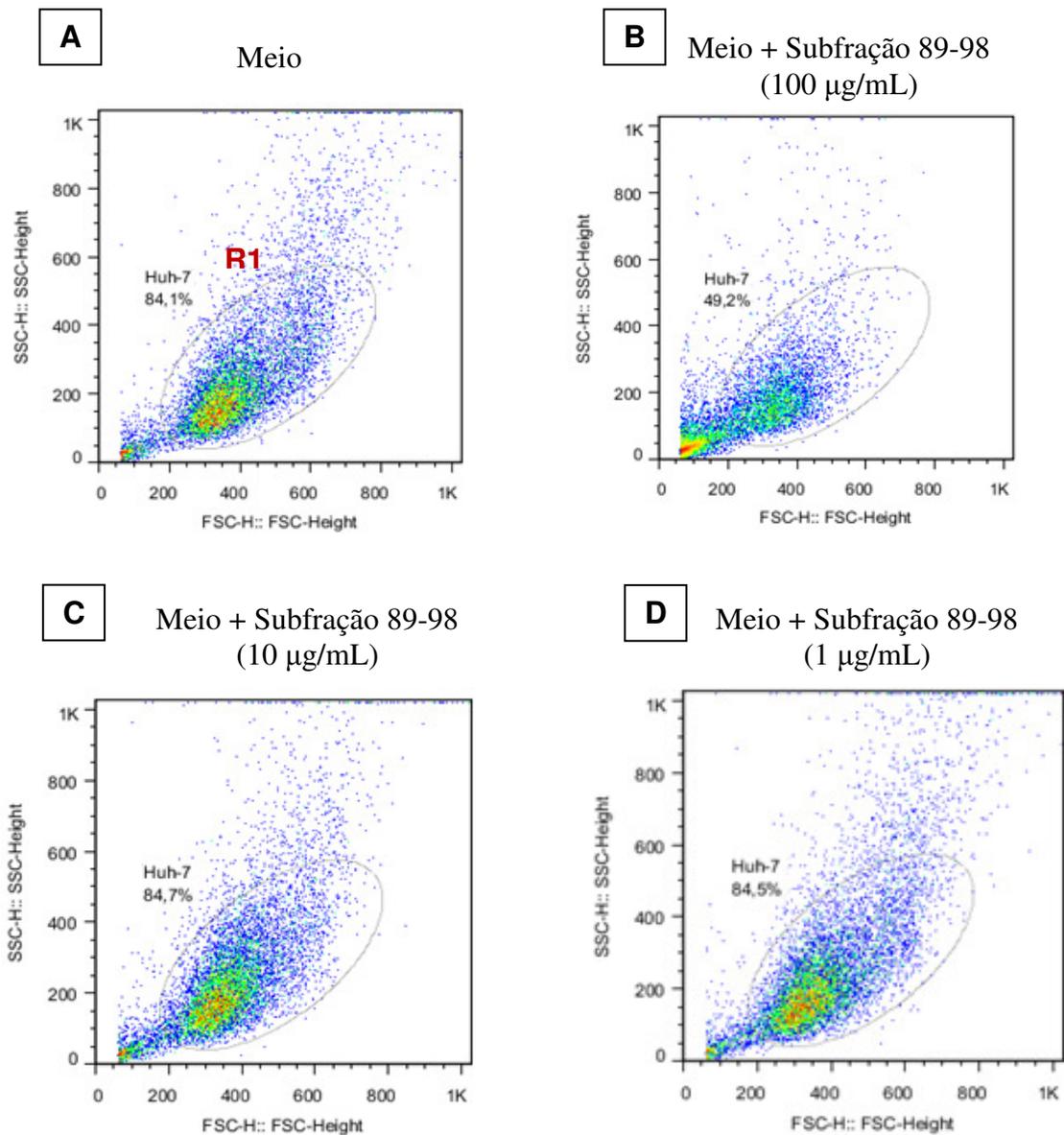


Figura 4.12. Alteração do perfil de tamanho e granulosidade evidenciando possível efeito citotóxico da subfração 89-98 no tratamento de células HuH-7 não infectadas. R1- região representativa da população de células Huh-7 a partir dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). **A.** Meio de cultura sem tratamento. **B.** Efeito do tratamento com a subfração 89-98 na concentração de 100 µg/mL. **C.** Efeito do tratamento com a subfração 89-98 na concentração de 10 µg/mL. **D.** Efeito do tratamento com a subfração 89-98 na concentração de 1 µg/mL. Nas concentrações de 100 µg/mL é observado a perda percentual de células na R1, possivelmente por morte celular.

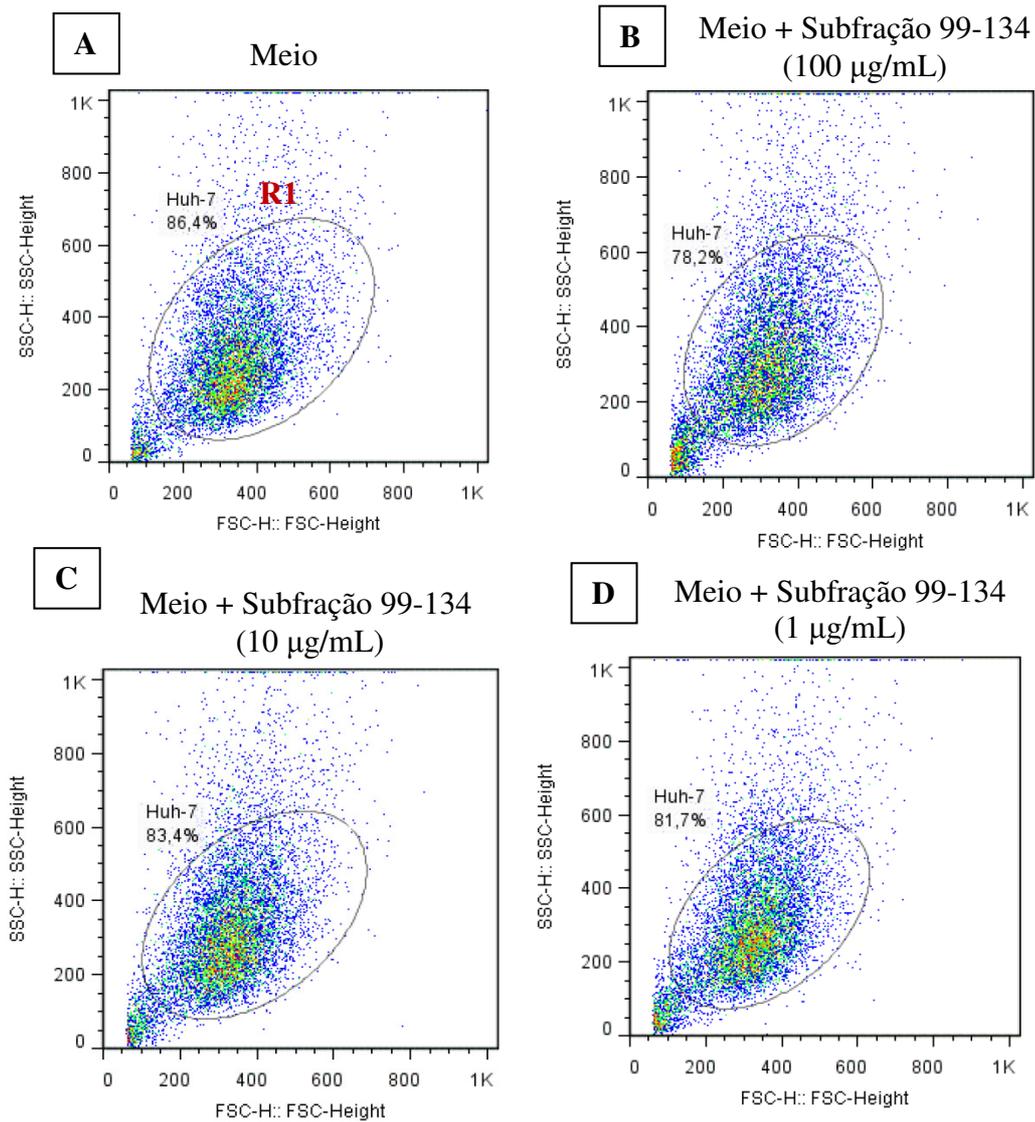


Figura 4.13. Alteração do perfil de tamanho e granulosidade evidenciando possível efeito citotóxico da subfração 99-134 no tratamento de células Huh-7 não infectadas. R1- região representativa da população de células Huh-7 a partir dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). **A.** Meio de cultura sem tratamento. **B.** Efeito do tratamento com a subfração 99-134 na concentração de 100 µg/mL. **C.** Efeito do tratamento com a subfração 99-134 na concentração de 10 µg/mL. **D.** Efeito do tratamento com a subfração 99-134 na concentração de 1 µg/mL. Nas concentrações de 100 µg/mL é observado a perda percentual de células na R1, possivelmente por morte celular.

4.3- Seleção das frações/subfrações de *Marcgraviaceae*

A partir dos resultados obtidos na triagem das amostras para avaliação das atividades antiviral e imunomoduladora, foram selecionadas duas frações/subfrações para serem mais bem caracterizadas, sendo assim avaliadas de acordo com os ensaios descritos a seguir. No processo de seleção foi dada prioridade aquelas amostras que apresentaram ação imunomoduladora e, posteriormente, antiviral. Com base nisso, foram selecionadas a fração butanólica e sua subfração 89-98, pois além de apresentarem uma atividade imunomoduladora, reduzindo um importante fator relacionado à gravidade da dengue, demonstraram também atividade antiviral, reduzindo a infecção em células HuH-7. Para as duas amostras selecionadas, foram mantidas apenas as concentrações de 10 e 1 µg/mL, uma vez que a concentração de 100 µg/mL demonstrou um possível efeito citotóxico por citometria de fluxo.

4.4- Avaliação do efeito do tratamento com as amostras selecionadas em células HuH-7 infectadas com DENV-2

Após todo o processo de triagem e seleção das amostras, as mesmas foram testadas para avaliação de outros fatores/citocinas relacionados à resposta imunológica que ocorre no curso da infecção pelo DENV. Dentre estes fatores, foram avaliados quanto à ação antiviral e imunomoduladora das amostras selecionadas: óxido nítrico (NO), interleucina-8 e a proteína viral não-estrutural, NS1. Novamente, foram utilizados sobrenadantes de culturas de células não-infectadas, tratadas ou não com frações/subfrações, para determinação do nível basal de produção das citocinas.

4.4.1- Avaliação do efeito antiviral das amostras selecionadas através da dosagem de NS1 no sobrenadante das culturas de células HuH-7

A fração butanólica e sua subfração 89-98, ambas previamente selecionadas, foram avaliadas quanto à sua ação antiviral através da dosagem da proteína viral não-estrutural – NS1, a qual representa a carga viral presente nas culturas. Para isso, o sobrenadante das células HuH-7 infectadas e tratadas com as frações/subfrações foi dosado para avaliação desta proteína, por ELISA. Conforme mostra a **Figura 4.14**, a fração butanólica na concentração de 1 µg/mL reduziu de forma significativa a taxa de NS1, caracterizando uma redução na carga viral e,

portanto, comprovando sua atividade antiviral. Sua subfração 89-98, em ambas as concentrações testadas de 1 e 10µg/mL também apresentou efeito antiviral pela redução da taxa de NS1. Esses dados corroboram com aqueles obtidos através da detecção do Ag viral, realizado por citometria de fluxo e comprovam a ação antiviral destas frações/subfrações.

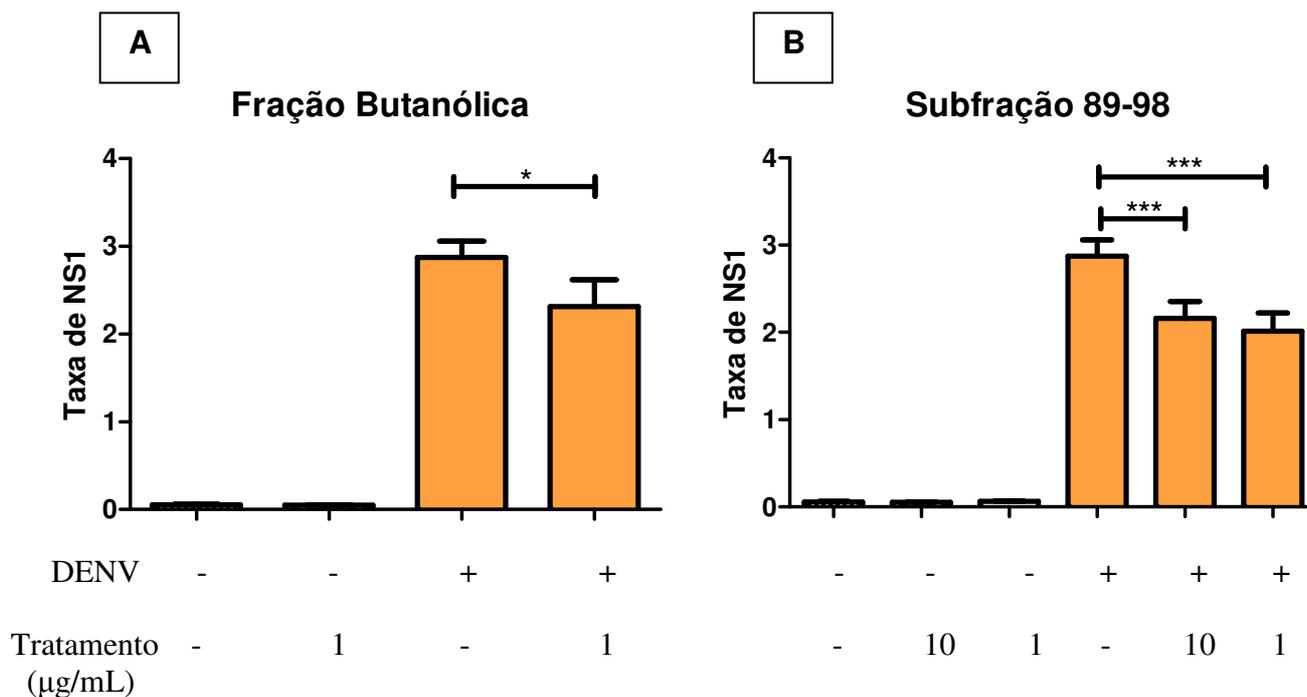


Figura 4.14. Detecção de NS1 em células HuH-7 submetidas a diferentes tratamentos.

Os sobrenadantes das culturas de células HuH-7 infectadas e tratadas com a concentração de 1µg/mL da fração butanólica **(A)** e 10 e 1µg/mL da subfração 89-98 **(B)** foram recolhidos no 2^o dpi para a dosagem da proteína viral, NS1. As taxas de produção de NS1 foram calculadas pela divisão das D.O. da amostra pela D.O. da amostra padrão de *cutoff* (vide materiais e métodos). *P<0,05 e ***P<0,001 representam diferenças significantes, comparados ao grupo de células infectadas e não tratadas, pelo teste t pareado. Gráficos representam 3 experimentos realizados em triplicata cada (n=3).

4.4.2- Avaliação do efeito antiviral das amostras selecionadas através da dosagem de óxido nítrico (NO) no sobrenadante das culturas de células HuH-7

Um modo de avaliarmos o possível mecanismo antiviral através do qual as frações/subfrações de *Marcgraviaceae* atuam, é a dosagem de NO em culturas de células HuH-7 infectadas e tratadas. Para isso, os sobrenadantes das culturas infectadas ou não e tratadas com as amostras selecionadas, foram analisados quanto à produção de nitrito, através da reação de Griess, como uma medida da produção de NO. De acordo com a **Figura 4.15**, a fração butanólica foi capaz de aumentar de forma significativa a produção de NO pelas células HuH-7 quando comparadas à cultura de células infectadas e não tratadas (**Figura 4.15A**). Sua subfração 89-98 também demonstrou este efeito, porém, apenas na concentração de 10 µg/mL (**Figura 4.15B**). Estes dados sugerem que tais amostras utilizem como mecanismo de ação antiviral em células HuH-7, o aumento na produção de NO, um fator já descrito como inibidor do DENV em modelos de infecção *in vitro* (92, 161). Porém, este ainda é um resultado preliminar, correspondente a apenas um experimento, realizado em triplicata, e que precisa ser confirmado em novos ensaios.

4.4.3- Comparação do efeito antiviral avaliado por citometria de fluxo, detectando antígeno viral intracelular, e pela dosagem de NS1 e NO no sobrenadante das culturas de células HuH-7

Com base nos resultados de avaliação da atividade antiviral das frações/subfrações selecionadas, podemos observar que os dados dos ensaios de citometria de fluxo, dosagem de NS1 e de NO demonstraram concordância, com relação à fração butanólica. A mesma obteve sua ação antiviral comprovada, pela redução na taxa de infecção e detecção de NS1, a qual foi relacionada inversamente à produção de NO. O mesmo ocorreu com sua subfração 89-98, embora o ensaio de NS1 tenha se mostrado mais sensível, detectando um efeito com maior significância e, também, na concentração de 1 µg/mL, a qual não teve seu efeito caracterizado pela citometria de fluxo e dosagem de NO. Embora seja um dado preliminar, o efeito de NO se relacionou inversamente a atividade antiviral.

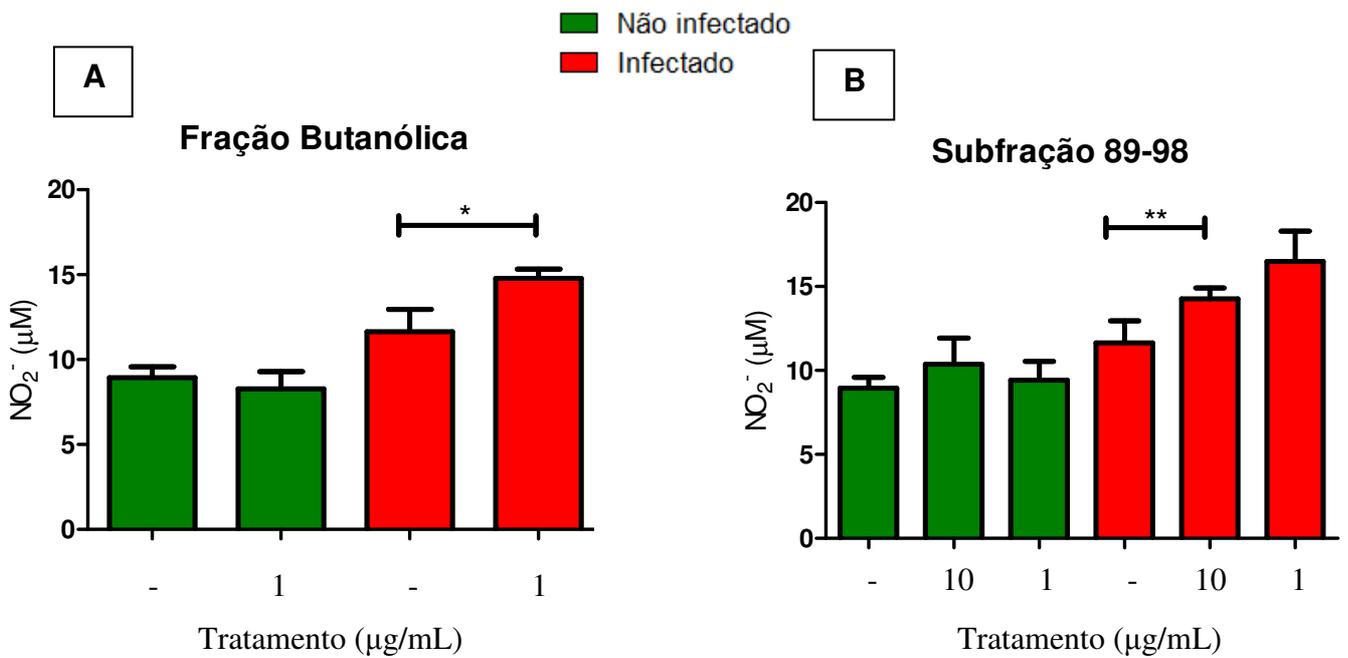


Figura 4.15. Dosagem de NO_2^- em culturas de células HuH-7 submetidas a diferentes tratamentos. Os sobrenadantes das culturas de células HuH-7 infectadas com DENV-2 e tratadas com a concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da fração butanólica **(A)** e 10 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da subfração 89-98 **(B)** foram recolhidos no 2^o dpi para a dosagem dos níveis de NO, através da reação de Griess. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam diferenças significantes, comparados ao grupo de células infectadas e não tratadas, pelo teste t pareado. Gráficos representam 1 experimento realizado em triplicata ($n=1$).

4.4.4- Avaliação do efeito imunomodulador das amostras selecionadas através da dosagem de interleucina-8

As frações/subfrações selecionadas foram novamente avaliadas quanto à sua ação imunomoduladora para outra importante citocina envolvida na gravidade da dengue, a IL-8, que também pode induzir permeabilidade endotelial. Com isso, o sobrenadante das culturas de células HuH-7 infectadas e tratadas foi utilizado para avaliação da produção desta citocina, dosada por ELISA. Os resultados apresentados na **Figura 4.16** demonstram que dentre as frações/subfrações testadas, apenas a subfração 89-98 na concentração de 10µg/mL apresentou redução significativa na produção de IL-8 em células HuH-7 infectadas e tratadas com esta amostra, quando comparadas às células infectadas e não tratadas (**Figura 4.16B**). Este dado indica a importância desta subfração na regulação da resposta imune durante a infecção pelo DENV-2. A fração butanólica não apresentou ação imunomoduladora para a IL-8, pois não alterou a produção desta citocina em células HuH-7 infectadas (**Figura 4.16A**).

4.4.5- Comparação do efeito antiviral com o imunomodulador de IL-8 e MIF

Os resultados apresentados acima, demonstram que a fração butanólica apresentou uma atividade antiviral em concordância com uma imunomodulação de MIF, em nosso modelo de infecção de células HuH-7. Porém, sua ação imunomoduladora não foi comprovada para outra citocina importante na patogenia da dengue, a IL-8. Os dados obtidos dos ensaios com sua subfração 89-98 demonstrou igual concordância quanto às atividades antiviral e imunomoduladora, porém, de uma maneira oposta, a imunomodulação foi comprovada para a IL-8. No caso do MIF, apenas a concentração de 100µg/mL demonstrou reduzir a produção deste fator, porém, tal concentração foi descartada, como dito anteriormente. Portanto, estes resultados demonstram, de uma forma geral, que houve uma concordância das atividades antiviral e imunomoduladora das frações/subfrações selecionadas, embora a imunomodulação tenha ocorrido para diferentes citocinas.

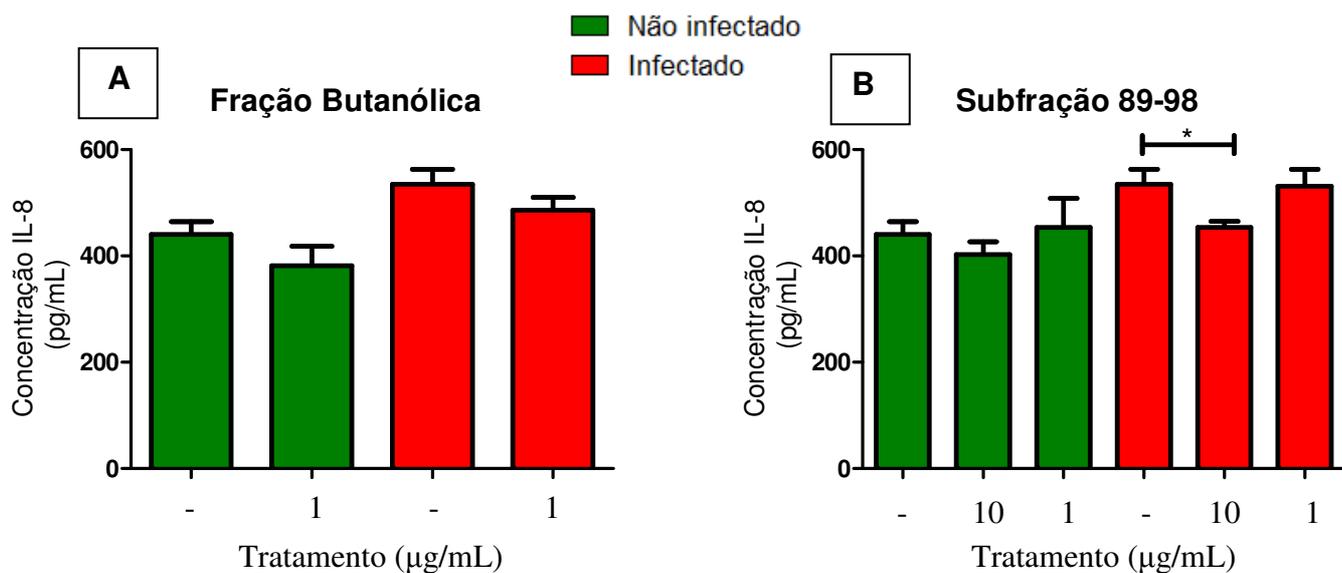


Figura 4.16. Dosagem de IL-8 em células HuH-7 submetidas a diferentes tratamentos.

Os sobrenadantes das culturas de células HuH-7 infectadas e tratadas com a concentração de 1µg/mL da fração butanólica **(A)** e 10 e 1µg/mL da subfração 89-98 **(B)** foram recolhidos no 2^o dpi para a dosagem da citocina IL-8, através da técnica de ELISA. *P<0,05 representa diferenças significantes, comparados ao grupo de células infectadas e não tratadas, pelo teste t pareado. Gráficos representam 3 experimentos realizados em triplicata (n=3).

5- DISCUSSÃO

Acredita-se que diversas citocinas tenham um papel importante na patogenia da dengue. A equipe do Laboratório de Imunologia Viral (IOC) já detectou, no soro de pacientes brasileiros com dengue, níveis elevados de IL-15, IL-18 e ICAM-1 solúveis na fase inicial, enquanto que TNF- α foi consideravelmente mais elevado na fase de convalescença, sugerindo um papel das citocinas na modulação das diferentes fases da resposta imunológica no curso da infecção (193, 194). Estudos associam TNF- α , IL-6 e IL-8 à gravidade da dengue (136, 137, 195, 196). Estas citocinas podem estar relacionadas às manifestações hemorrágicas (193), ativação da cascata de coagulação, fibrinólise (197) e ainda estar envolvidas na permeabilidade vascular, fenômeno importante para o início do agravamento da doença (39).

Neste trabalho, foi utilizado um modelo de infecção de células HuH-7, linhagem contínua de hepatócitos, para o estabelecimento de um ensaio de triagem de agentes, tais como as plantas medicinais, com possíveis ações antivirais e imunomoduladoras, regulando a resposta de fatores envolvidos com a gravidade.

Várias doenças relacionadas à desregulação do sistema imunológico têm sido há muito tempo tratadas com medicina herbária. Diversos efeitos terapêuticos induzidos por plantas medicinais podem ser causados pela modulação de citocinas. O termo imunomodulador tem sido usado na literatura para descrever plantas medicinais que alterem a atividade do sistema imunológico através da regulação dinâmica de moléculas sinalizadoras: citocinas, hormônios neurotransmissores e peptídeos. O uso da fitoterapia pode ser considerado como alternativa terapêutica para regulação da rede de citocinas modificando, assim, o balanceamento destas moléculas e de suas funções nas repostas imunológicas inata e adaptativa (198).

As células HuH-7, já foram utilizadas em outros estudos para avaliação de compostos com atividade antiviral contra o DENV (61, 165). As células HuH-7 mostraram-se bastante permissivas à infecção pelo DENV, além de serem capazes de produzir citocinas e outros fatores importantes na patogênese da dengue, como MIF, IL-8 e NO. Estudos anteriores já haviam demonstrado a habilidade de células HuH-7 se infectarem com o DENV (69, 199). Portanto, o uso desta linhagem mostrou-se um bom modelo para a triagem de plantas medicinais, uma vez que permite reproduzir a infecção de uma forma rápida e eficiente.

Outra célula importante para o ensaio *in vitro* da infecção pelo DENV são os monócitos. Investigações que utilizaram monócitos humanos primários para testes de produtos naturais apresentaram a vantagem de culturas com uma das principais células-alvo do DENV, reproduzindo, ao máximo, a situação de infecção que acomete as pessoas durante as epidemias. Por outro lado, pode ser observada uma grande variabilidade na taxa de infecção destas células (162). Em nosso estudo anterior, também foi possível observar certas limitações com o uso de monócitos humanos para a triagem de compostos efetivos. A variabilidade genética dos doadores utilizados foi um fator limitante deste modelo, uma vez que certos doadores são menos suscetíveis à infecção pelo DENV, dificultando, assim, a reprodutibilidade dos ensaios (192).

Deste modo, o uso das células HuH-7, apresenta-se como uma boa ferramenta para os estudos *in vitro* de infecção com DENV, uma vez que tal variabilidade não é algo comum de ocorrer.

Para o estabelecimento do nosso modelo, foi realizada uma cinética de infecção do vírus e do perfil de produção de diferentes citocinas, utilizando-se a cepa padrão universal 16681, do DENV-2, a qual já vem sendo utilizada por diversas equipes de pesquisa (200-203) e em nosso laboratório (204-206). A técnica de citometria de fluxo e imunofluorescência indireta foram empregadas para a detecção do antígeno viral nas células HuH-7. A análise por citometria de fluxo demonstra que, o pico de replicação do vírus ocorreu no 1° dia após a infecção (dpi), mas os antígenos virais se mantiveram presentes até o 3° dia. Já na observação por microscopia, não foi possível observar uma diferença muito marcante entre o 1° e 2° dia após a infecção, por ter sido uma técnica avaliada de uma forma apenas qualitativa. Ainda assim, foi coincidente a presença do antígeno viral durante toda a cinética, corroborando os dados obtidos pela citometria de fluxo. Ambas as técnicas são bastante utilizadas para a detecção do antígeno DENV em diferentes modelos celulares (49, 162) (207-211). Outros estudos que utilizaram a mesma cepa do DENV-2, em modelo de monócitos humanos primários, observaram um pico de replicação viral em 48 horas após a infecção (162, 202, 205). Este fato sugere que o vírus necessite de um tempo maior para atingir o máximo de sua replicação em monócitos, comparando-se às células HuH-7, onde o pico ocorre mais precocemente.

Através da técnica de ELISA, foi avaliada, quantitativamente, a capacidade das células HuH-7, infectadas pelo DENV, a secretarem ou não algumas citocinas

envolvidas na patogenia da dengue, tais como MCP-1, TNF- α , IL-8, MIF e IFN- α . Como demonstrado, a produção de TNF- α pelas células HuH-7 foi muito baixa, sendo que sua produção máxima ocorreu no 3° dpi e correspondeu a cerca de 50 pg/mL, não podendo ser utilizada nos ensaios de triagem das amostras. A produção de IL-8 ocorreu de forma crescente, e também apresentou um pico máximo de produção no 3° dpi. Finalmente, o MIF apresentou um pico máximo de produção mais precoce, no 2° dpi, seguido por um declínio em sua produção. Chuang e col. observaram a secreção de MIF, em células HuH-7, mais precocemente, em 3 horas após a infecção, e sua maior produção, também no 2° dpi, sendo este o tempo máximo avaliado por eles (59). Em relação às demais citocinas, MCP-1 e IFN- α , não foram produzidos níveis detectáveis das mesmas pelas células HuH-7. As citocinas, portanto, que se mostraram adequadas para os ensaios de avaliação das atividades antiviral e imunomoduladora das amostras foram IL-8 e MIF, pois foram produzidas de forma eficaz por células HuH-7, como já havia sido demonstrado em outros trabalhos (59, 212). Ambas as citocinas – MIF e IL-8 - estão envolvidas na gravidade da dengue. Pacientes com FHD apresentaram uma produção maior de MIF, quando comparados aos pacientes FD. Ainda, quando pacientes FHD, sobreviventes ou não, foram comparados, essa produção foi muito maior naqueles não-sobreviventes, relacionando o MIF aos casos fatais de dengue (142). Um outro papel descrito para o MIF durante a infecção pelo DENV foi o de aumentar a permeabilidade vascular (59)

O papel da IL-8 é bastante parecido ao do MIF. Seus níveis estão aumentados entre pacientes com FHD (143) e sua produção pelo endotélio, sob infecção, parece estar envolvida na reorganização da actina e deslocamento da ocludina, levando à um aumento da permeabilidade (145).

Conforme os dados obtidos através das cinéticas de infecção e de produção das citocinas, o melhor ponto a ser utilizado nos ensaios de testes dos compostos vegetais, foi o 2° dpi. Neste ponto, todas as citocinas apresentaram uma boa produção pelas células HuH-7, com concentrações ideais, que permitem a análise da ação imunomoduladora das frações/subfrações. O mesmo ponto foi escolhido para a análise da atividade antiviral das amostras, uma vez que no 2° dpi, já nota-se um percentual significativo de células HuH-7 infectadas, o que permite a realização dos ensaios. Este ponto já foi previamente utilizado em um ensaio de atividade antiviral da vitamina D3, utilizando-se o mesmo modelo de células HuH-7, porém, com outro sorotipo viral (61).

Para a realização da triagem das amostras vegetais, primeiramente foi avaliado a citotoxicidade das mesmas, em células HuH-7, através do ensaio de MTT. Esta técnica é uma das mais empregadas como indicadora colorimétrica de viabilidade, avaliando-se a função mitocondrial da célula. A maioria dos estudos envolvendo compostos antivirais utiliza este tipo de ensaio, importante para a determinação da concentração da amostra a ser avaliada (164, 166, 167, 213, 214). As células foram tratadas com as amostras, por 48 horas, o mesmo tempo de duração que foi usado, posteriormente, para os ensaios das atividades antivirais e imunomoduladora. Como demonstrado, a viabilidade das células HuH-7 não foi reduzida após o tratamento com as frações/subfrações, nas três concentrações testadas (1, 10 e 100µg/mL). Os estudos envolvendo plantas medicinais utilizam diferentes concentrações de seus compostos, de acordo com o seu grau de pureza. Muhamad e colaboradores avaliaram concentrações de compostos derivados de flavonoides que variavam de 2 à 45µg/mL, em uma outra linhagem de hepatócitos, HepG2 (164). Em outro estudo, envolvendo extratos metanólicos foram testadas concentrações maiores, entre 0,05 à 2,5 mg/mL, porém, em outro tipo celular, Vero E6 (167). Já testes com bioflavonoides utilizou concentrações que variavam de 0 à 225µg/mL, também em linhagem de células Vero e C6/36 (166). Um estudo anterior realizado por nossa equipe, com monócitos humanos primários, utilizando-se a espécie *Uncaria tomentosa*, avaliou concentrações de 0,1 à 500µg/mL (162). A definição das concentrações a serem testadas nestes ensaios é dependente do tipo celular, dos compostos e do tempo de tratamento a serem utilizados. Nosso resultado revelou que, as amostras de *Marcgraviaceae* utilizadas, não possuem um efeito citotóxico em nosso modelo de ensaio, por outro lado, elas foram capazes de aumentar a viabilidade celular, em algumas concentrações avaliadas. Esta característica das frações/subfrações de *Marcgraviaceae*, pode se dar pela presença de constituintes que estimulem a proliferação celular. Caso este efeito seja comprovado em hepatócitos, de uma forma geral, o uso de tais amostras poderia ser explorado, posteriormente, para outras finalidades, como no caso de doenças degenerativas do fígado, estimulando à proliferação de células hepáticas normais.

Apesar de não ter sido observado efeito citotóxico das amostras pelo ensaio de MTT, nos demais ensaios envolvendo a técnica de citometria de fluxo, foi possível observar que houve uma alteração morfológica, de células HuH-7, quando as mesmas foram tratadas com a fração butanólica e suas subfrações, na concentração mais alta, de 100µg/mL. Estas alterações foram representadas pela

diminuição no percentual de células dentro da região delimitada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Este fato demonstra que, as frações/subfrações de *Marcgraviaceae* utilizadas, estão afetando o padrão morfológico das células e podem estar causando necrose ou apoptose. Para comprovar se as amostras estariam, de fato, levando à morte das células, diversas metodologias poderiam ser empregadas. A técnica mais comumente utilizada para avaliar morte celular é a marcação de Anexina V/PI, já utilizada para vários tipos celulares, inclusive células HuH-7 (215). Como as células HuH-7 tendem a se proliferar, o ensaio colorimétrico de MTT, pode não ter tido uma sensibilidade capaz de identificar essa possível alteração de viabilidade das células, sendo necessário o uso de um outro método.

Durante a triagem das amostras, foi demonstrada a ação antiviral da fração butanólica e de três subfrações, 26-30, 40-43 e 89-98, avaliadas através do ensaio de citometria de fluxo. Ainda, a subfração 99-134 apresentou uma forte tendência à esta ação. Puerta-Guardo e col. também demonstraram ação antiviral, da vitamina D3, através desta metodologia, porém, a ação foi observada contra o DENV-4 (61). Estudos envolvendo DENV-2 também constataram a ação antiviral de substâncias, com o uso da citometria de fluxo. Tong e colaboradores utilizaram esta técnica para identificar em qual etapa do ciclo de infecção do DENV, a droga WSS45 estaria atuando para efetuar sua ação antiviral (214). Além disso, Reis e col. avaliaram a atividade antiviral de *Uncaria tomentosa* contra o DENV-2, através da mesma técnica, em monócitos humanos (162). Vários estudos envolvendo ação antiviral contra o DENV, no entanto, utilizam outras metodologias. Outra técnica usada por diversos autores é o ensaio de inibição *in vitro*, onde se avalia o efeito citopático causado pela infecção, com e sem o tratamento (164, 167). Este método tem a desvantagem de que o vírus poderia perder a capacidade de induzir o efeito citopático sem perder totalmente a sua infectividade. Além disso, o efeito citopático do vírus utilizado por nós apresenta um efeito inespecífico de descolamento da superfície aderente, dificultando a avaliação. A detecção por imunofluorescência é, portanto, mais específica do que o efeito citopático. Outras técnicas, como Western blotting, quantificação do RNA viral, através do RT-PCR e imagens de ultraestrutura também são utilizadas para avaliação da atividade antiviral de compostos contra o DENV (165, 166). Como descrito abaixo, outra metodologia utilizada neste trabalho para avaliação da atividade antiviral das amostras, foi a dosagem de NS1 pela técnica de ELISA. De uma forma geral, esta metodologia, associada à citometria de

fluxo mostra-se vantajosa, em relação às demais técnicas utilizadas por outros autores, uma vez que é mais rápida e avalia a presença do antígeno viral intracelular (citometria de fluxo) e secretado (NS1).

Observamos, também, durante a triagem, uma atividade imunossupressora marcante da fração butanólica e suas subfrações 89-98 e 99-134, que inibiram a produção de MIF, no sobrenadante após a infecção das células HuH-7. Esta observação torna o presente trabalho, pioneiro em avaliar a produção deste fator na busca de plantas medicinais com ação imunomoduladora contra o DENV. No estudo de Reis e col. diversas outras citocinas foram avaliadas com essa finalidade, tais como TNF- α , IFN- α , IL-10 e IL-6 (162), porém, é a primeira vez que o MIF é utilizado para este fim. A técnica utilizada em nosso estudo foi um ensaio imunoenzimático, ELISA, porém, outras técnicas são utilizadas para avaliação de citocinas, em geral, como tecnologia de análise múltipla de citocinas e um sistema de arranjo de microesferas, para citometria (Cytometric Bead Array System- CBA) (61, 162). A vantagem dessas outras técnicas é a possibilidade de avaliação de diversas citocinas simultaneamente, na mesma célula, embora esses ensaios sejam de alto custo.

Com base nos resultados da triagem, a fração butanólica e sua subfração 89-98, foram selecionadas para os demais testes avaliados neste trabalho, pois ambas apresentaram ação antiviral e imunomoduladora em células HuH-7. Além disso, devido aos resultados obtidos através da citometria de fluxo, a concentração de 100 μ g/mL das amostras não foi utilizada em outros ensaios, devido ao seu potencial efeito citotóxico neste tipo celular. Uma confirmação desse efeito tóxico com outra metodologia se torna necessário. Embora a subfração 89-98 tenha apresentado ação imunomoduladora para o MIF, apenas nesta concentração (100 μ g/mL), é possível que para avaliação dos demais fatores, as concentrações mais baixas possam ser também eficazes. Ou ainda, há a possibilidade de que concentrações intermediárias demonstrem um efeito imunomodulador para este fator, em estudos posteriores. Por outro lado, a subfração 99-134, poderá ser explorada futuramente, uma vez que demonstrou forte ação imunomoduladora para o MIF e uma tendência à ação antiviral.

Após a seleção das amostras, outras técnicas foram utilizadas para comprovação de suas atividades antivirais, como a dosagem de NS1 e NO, no sobrenadante de células HuH-7 tratadas após a infecção. Nosso estudo anterior foi pioneiro em utilizar a técnica de dosagem de NS1 para avaliação da ação antiviral

de amostras vegetais, a qual demonstrou ser bastante útil para esta finalidade (192). A NS1, é uma glicoproteína não-estrutural do DENV, altamente conservada, e está envolvida na replicação viral (37). Ainda, seus níveis plasmáticos foram associados com casos de FHD, sugerindo sua relação com a gravidade (38). Estudos sugerem que os níveis de NS1 secretados estariam associados com os níveis de viremia em infecções secundárias pelo DENV-2, sendo usada como diagnóstico (39).

Mais recentemente, foi demonstrado seu possível papel em contribuir para a indução de hemorragias, em pacientes FHD, devido à sua capacidade de inibir a ativação da protrombina e prolongar o tempo de tromboplastina parcial ativada (42). Baseado no fato de que a NS1 é produzida e secretada, em cultura de células infectadas, assim como a infecção humana, e que a quantidade desta proteína está relacionada com a eficiência da replicação viral, foi avaliado, neste estudo, o potencial antiviral das amostras em reduzir a carga viral, através da dosagem de NS1. Conforme foi demonstrado, a fração butanólica e sua subfração 89-98 tiveram suas atividades antivirais comprovadas, através da capacidade de reduzirem a proteína viral, NS1, refletindo na redução da carga viral. Estes dados corroboram com aqueles obtidos pela técnica de citometria de fluxo, mostrando-se provavelmente ainda mais sensível, uma vez que demonstrou ação antiviral da fração 89-98 em sua concentração mais baixa (1µg/mL), a qual não foi detectada pela citometria de fluxo.

Também foi avaliado o potencial das amostras em induzirem a produção de NO pelas células HuH-7, após infecção e tratamento. O NO tem sido descrito como um importante fator antiviral na resposta do hospedeiro contra o DENV. Monócitos infectados, *in vitro*, apresentaram expressão da enzima iNOS em uma relação inversa à expressão do antígeno DENV. Comprovando esta relação, monócitos de pacientes com dengue apresentavam a expressão de iNOS, diferentemente de doadores saudáveis, que não expressavam esta enzima (49). Levy e col. demonstraram que tanto pacientes com FD quanto pacientes com FHD apresentaram níveis elevados de nitritos, uma medida da produção de NO, onde pacientes com FD apresentaram um teor de nitrito aumentado. Essa associação do aumento dos níveis de NO com manifestações brandas da doença sugere um papel protetor do NO nas infecções pelo DENV, *in vivo*. Seus níveis elevados, também foram observados em sobrenadante de cultura de monócitos infectados, sugerindo o envolvimento do NO na infecção pelo DENV (160). Chareonsirisuthigul e col. também relataram que células THP-1 infectadas estimulam a produção de NO,

sendo que esta observação foi relacionada à diminuição do número de cópias do RNA viral detectado (92). Dessa forma, o NO parece exercer um papel protetor nas infecções pelo DENV, estimulando uma resposta antiviral. O uso deste modelo para triagem de produtos com atividades antivirais pode ser, assim, bastante útil.

Porém, gostaríamos de ressaltar que o NO possui um papel duplo durante as infecções. Em concentrações ótimas, o NO possui ação protetora e regulatória nas células, porém, em altas concentrações, possui efeitos tóxicos. Para uma toxicidade aguda, o NO reage com o ânion superóxido e forma o peroxinitrito (ONOO^-), o qual possui um grande número de alvos químicos. Ele é capaz de oxidar proteínas, lipídios, DNA e RNA. Os efeitos tóxicos do NO são devido à sua habilidade de modular a respiração mitocondrial, síntese do DNA e metabolismo energético. As reações do NO diferem-se entre sistemas *in vivo* e *in vitro*. O principal produto de degradação do NO *in vitro* é o NO_2^- (nitrito), enquanto, *in vivo*, é o NO_3^- (nitrato). Nas infecções virais, ele é capaz de inibir a replicação viral ou causar mutações no vírus, enquanto no hospedeiro, pode levar ao dano celular e patologia (216). Em nosso estudo, observamos que a fração butanólica e sua subfração 89-98 ($10\mu\text{g/mL}$) foram capazes de aumentar a produção de NO, representado pela dosagem de nitrito, em células HuH-7, após a infecção pelo DENV-2. Estes dados demonstram que esta via pode participar de um dos mecanismos antivirais utilizados por esses compostos em nosso modelo de ensaio, uma vez que a redução na taxa de infecção e na carga viral, também foi observada nas mesmas amostras e concentrações. Porém, esses são resultados bastante preliminares, e deverão ser reproduzidos para sua comprovação. Além disso, não podemos excluir a participação de outros mecanismos antivirais como controladores da replicação do DENV, em células HuH-7 tratadas com as amostras em questão. Ressaltamos, ainda, que não há como afirmar, no momento, se esses níveis aumentados iriam propiciar à formação dos superóxidos e causar dano às células. Possivelmente, uma dosagem de superóxido e/ou avaliação da apoptose nas células tratadas poderia ajudar a esclarecer essa questão, assim como, elucidar o papel do NO em nosso modelo de ensaio.

A ação imunomoduladora das amostras selecionadas foi avaliada também, quanto à produção de IL-8. Esta citocina está relacionada à gravidade da dengue e sua expressão parece ser modulada pela proteína viral, NS5. Diversos estudos já demonstraram que seus níveis encontram-se elevados em pacientes FHD, comparados aos pacientes brandos (143, 217). Além disso, seus níveis foram associados com a trombocitopenia e com os níveis de alanina transaminase (218).

Como descrito anteriormente, esta citocina parece exercer um papel fundamental no aumento da permeabilidade endotelial (145). Em nosso trabalho, foi demonstrado que apenas a subfração 89-98 (10µg/mL) foi capaz de inibir a produção desta citocina, em células HuH-7 infectadas. Estudos para avaliação do potencial imunoregulador de compostos anti-DENV, já utilizaram a dosagem de IL-8 em seu modelo com linhagem de células monocíticas, mas tal potencial não foi comprovado para o composto testado (61). Outro estudo, realizado anteriormente por nossa equipe, não encontrou diferença na produção desta citocina em monócitos infectados pelo DENV-2 (204). Mais uma vez, o presente trabalho aponta um efeito diferencial de uma fração vegetal, em modular a resposta imunológica contra o DENV, reduzindo uma importante citocina envolvida na gravidade da dengue.

Conforme os resultados apresentados neste estudo, a fração butanólica e sua subfração 89-98, derivadas de um extrato bruto etanólico de folhas de uma espécie de *Marcgraviaceae*, são fortes candidatas à produção de um fitoproduto, para o tratamento da dengue. Ambas foram capazes de reduzir a taxa de infecção de células HuH-7, além de inibir a proteína viral, NS1, demonstrando atividade antiviral contra o DENV. Além disso, foram capazes de regular a produção de dois importantes fatores envolvidos na gravidade da doença, a IL-8 e o MIF. Ambas as amostras demonstraram que, possivelmente, o mecanismo de ação antiviral, deva estimular a produção de NO, em células HuH-7. No entanto, até o momento, não se conhece qual das duas frações/subfrações seria melhor em seu provável uso como um fitoproduto, uma vez que ambas reduziram a infecção, e, por outro lado, a fração butanólica foi capaz de reduzir apenas a produção de MIF, enquanto a subfração 89-98 foi capaz de reduzir a produção de IL-8, ambos importantes fatores envolvidos na gravidade da dengue. Estudos posteriores de novas atividades, como, por exemplo, avaliação de seus efeitos como inibidoras da permeabilidade endotelial poderiam ser realizados para elucidar esta dúvida.

De acordo com os dados demonstrados nesta dissertação, nota-se a relevância da busca de agentes que tenham como fonte as plantas medicinais e apresentem ação contra o DENV, uma vez que não há uma vacina aprovada para uso clínico e nem uma terapia antiviral efetiva. Estudos realizados para o estabelecimento de uma vacina anti-DENV utilizam tanto modelo murino como de primatas não-humanos (219-223), porém, esses modelos não reproduzem plenamente as características físiológicas e imunopatológicas da doença (224). Assim sendo, o presente trabalho, utilizando o

modelo *in vitro* de infecção de células HuH-7, propiciou a descoberta de uma nova planta medicinal com propriedades imunomoduladoras e antivirais contra o DENV.

Spelman e colaboradores têm uma visão otimista sobre a medicina herbária e nutrição, como provedores potenciais para terapêuticas futuras (198). Produtos originários de plantas medicinais poderão ser uma alternativa terapêutica para a dengue, agindo em combinação com os tratamentos sintomáticos usados atualmente.

Diante de tamanha diversidade da flora brasileira, este trabalho reforça a possibilidade de se encontrar plantas medicinais que apresentem ação, não somente contra a dengue, mas contra diversas outras doenças que ainda não possuem um tratamento e ressalta o incentivo à busca por essas substâncias para a produção de fitoterápicos.

6- CONCLUSÃO

- Inicialmente, estabelecemos um modelo de infecção *in vitro* pelo DENV, utilizando-se a linhagem de células hepáticas HuH-7, eficiente para a triagem de amostras vegetais com propriedades antivirais e imunomoduladora;
- Nessas células HuH-7, a infecção por DENV pôde ser determinada pela taxa de detecção de antígenos virais intracelulares e extracelulares. Ainda, o vírus foi capaz de induzir a produção de importantes mediadores inflamatórios, por essas células, como IL-8, MIF e NO;
- Uma fração butanólica e uma subfração de uma espécie da família *Marcgraviaceae* apresentaram atividade antiviral verificada pela redução da detecção de antígenos virais e da taxa de NS1 em células HuH-7.
- A dosagem de NS1 mostrou-se mais indicada para avaliação da atividade antiviral de plantas medicinais em nosso modelo, por ter apresentado uma maior sensibilidade em comparação com o teste de marcação intracelular do antígeno viral;
- Foi detectado, ainda, um aumento na produção de NO após o tratamento das células HuH-7 infectadas, sugerindo que este possa ser um dos mecanismos envolvidos na atividade antiviral das amostras;
- Os mesmos compostos estudados demonstraram atividade imunomoduladora através da redução na produção de MIF e IL-8, por células HuH-7 em modelo de infecção com o DENV;
- Dessa forma, o modelo utilizado apresentou resultados facilmente reprodutíveis e que possibilitam a avaliação de várias amostras de maneira simultânea, sendo adequado para a triagem de compostos com possível atividade no controle da infecção pelo DENV. Além disso, o trabalho ressaltou a importância de uma espécie de *Marcgraviaceae* na busca de agentes contra a dengue.

7- PERSPECTIVAS

A redução significativa da carga viral pelos compostos estudados nesta dissertação, acompanhada de suas propriedades imunomoduladoras, resultam numa boa perspectiva para o futuro uso da família *Marcgraviaceae* como alternativa durante as epidemias de dengue.

O uso de monócitos humanos primários, uma das principais células-alvo para o DENV, como modelo celular para novos ensaios das amostras já indicadas durante a triagem poderá reproduzir, de uma forma mais real, a doença que acomete às pessoas, pois a variabilidade genética dos doadores que serão utilizados nos aproxima da heterogeneidade genética da população.

Os compostos originados de *Marcgraviaceae* serão, assim, testados quanto aos seus efeitos em monócitos, visando o estudo do mecanismo de ação com ênfase, por exemplo, na regulação da apoptose e de vias de sinalização, tais como NF- κ B e STAT-1. Pretende-se ainda avaliar o efeito das amostras na expressão da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e na indoleamina 2,3 – dioxigenase (IDO) e sua associação com a carga viral e outros fatores circulantes. Ainda, será avaliado o potencial dessas amostras em reduzir a permeabilidade endotelial, importante evento na fisiopatologia, ampliando o conhecimento do espectro de atividades destes compostos antes que os estudos *in vivo* em modelos experimentais sejam abordados e dar continuidade ao processo de validação de um medicamento.

Compostos derivados de plantas medicinais como os originados da família *Marcgraviaceae*, que possuem efeito imunomodulador e antiviral, são bons atrativos e, portanto, uma abordagem de investigação relevante à pesquisa de candidatas a fitoterápicos para o tratamento da dengue.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gubler DJ. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2004;27(5):319-30. Epub 2004/07/01.
2. Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in microbiology*. 2002;10(2):100-3. Epub 2002/02/06.
3. Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *Int J Infect Dis*. 2004;8:69-80.
4. Kindhauser MK. Dengue y fiebre hemorrágica dengue. Ginebra: Organización Mundial de La Salud: In: *Defensa Global ante la amenaza de Enfermedades Infecciosas.*; 2003. p. 140-3.
5. Ligon BL. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment, and prevention. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005;16(1):60-5. Epub 2005/02/03.
6. WHO/TDR. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control -- New edition: World Health Organization (WHO) and the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). ; 2009.
7. WHO. Dengue and dengue haemorrhagic fever: Geneva, World Health Organization; 2008. Available from: (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).
8. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as global public health problem. New York: CAB International: In: DJ. Gubler e G. Kuno (ed.); 1997.
9. Guzman MG, Alvarez M, Rodriguez R, Rosario D, Vazquez S, Vald s L, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis*. 1999;3(3):130-5. Epub 1999/08/26.
10. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3):480-96. Epub 1998/07/17.
11. Gubler DJ, Meltzer M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res*. 1999;53:35-70. Epub 1999/12/03.
12. Kouri G. [Dengue, a growing problem of health in the Americas]. *Rev Panam Salud Publica*. 2006;19(3):143-5. Epub 2006/04/28. El dengue, un problema creciente de salud en las Americas.

13. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 2003;27(1):1-13. Epub 2003/05/03.
14. Franco O. The eradication of *Aedes aegypti* in Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop.* 1961;13:43-8.
15. Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* 2000;2(13):1643-9.
16. Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, do Amaral RS, Passos AD, Tauil PL. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1983;25(1):53-4. Epub 1983/01/01. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. Nota previa.
17. Schatzmayr HG, Nogueira RM, Travassos da Rosa AP. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1986;81(2):245-6. Epub 1986/04/01.
18. Nogueira RM, Miagostovich MP, Cunha RV, Zagne SM, Gomes FP, Nicol AF, et al. Fatal primary dengue infections in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1999;93(4):418. Epub 2000/02/16.
19. De Simone TS, Nogueira RM, Araujo ES, Guimaraes FR, Santos FB, Schatzmayr HG, et al. Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(9):553-62. Epub 2004/07/15.
20. Schatzmayr HG. Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95 Suppl 1:179-81.
21. Lourenço-de-oliveira R, Honorio NA, Castro MG, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Alves JC, et al. Dengue virus type 3 isolation from *Aedes aegypti* in the municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. . *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(6):799-800.
22. Temporao JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, do Socorro Silva Azevedo R, Teixeira Nunes MR, et al. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):938-40. Epub 2011/05/03.
23. [cited 2012 20 de Agosto]; Available from: (<http://www.defesacivil-ap.com.br/>).
24. SVS. Boletim epidemiológico: Secretaria de Vigilância em Saúde- Ministério da Saúde; 2012.
25. [cited 2012 setembro]; Available from: <http://www.defesacivil-ap.com.br/portal/noticias/16defesadivulgainformacaodengue.html>.
26. [cited 2012 agosto]; Available from: <http://www.healthmap.org/dengue/pt/>.

27. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):13-22.
28. Rothman AL. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *J Clin Invest.* 2004;113(7):p.946-51.
29. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell.* 2002;108(5):717-25. Epub 2002/03/15.
30. Chang CJ, et al. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) interacts with dengue virus core protein. *DNA Cell Biol.* 2001;20(9):569-77.
31. Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smith JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67:2773-86.
32. Modis YS, Ogata D, Clements S. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6986-91.
33. Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 2002;76(11):5480-91.
34. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990;44:649-88.
35. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:23-61.
36. Wahala WM, Silva AM. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses.* 2011;3(12):2374-95. Epub 2012/02/23.
37. Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol.* 2006;80(23):11418-31. Epub 2006/08/25.
38. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 2002;186(8):1165-8. Epub 2002/10/02.
39. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2006;19(5):429-36. Epub 2006/08/31.
40. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a

potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 2006;193(8):1078-88. Epub 2006/03/18.

41. Srikiatkachorn A, Green S. Markers of dengue disease severity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;338:67-82. Epub 2009/10/06.

42. Lin SW, Chuang YC, Lin YS, Lei HY, Liu HS, Yeh TM. Dengue virus nonstructural protein NS1 binds to prothrombin/thrombin and inhibits prothrombin activation. *J Infect.* 2012;64(3):325-34. Epub 2011/12/06.

43. Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14333-8. Epub 2003/11/13.

44. McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z. Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J Biol Chem.* 2011;286(25):22147-59. Epub 2011/04/23.

45. Kelley JF, Kaufusi PH, Volper EM, Nerurkar VR. Maturation of dengue virus nonstructural protein 4B in monocytes enhances production of dengue hemorrhagic fever-associated chemokines and cytokines. *Virology.* 2011;418(1):27-39. Epub 2011/08/04.

46. Rothman AI. Viral pathogenesis of dengue infections. (Ed.). IDJGeGK, editor. New York: CAB International; 1997.

47. Wu SJ, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, et al. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 2000;6(7):816-20. Epub 2000/07/11.

48. Navarro-Sanchez E, Despres P, Cedillo-Barron L. Innate immune responses to dengue virus. *Archives of medical research.* 2005;36(5):425-35. Epub 2005/08/16.

49. Neves-Souza PC, Azeredo EL, Zagne SM, Valls-de-Souza R, Reis SR, Cerqueira DI, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. *BMC Infect Dis.* 2005;5:64. Epub 2005/08/20.

50. Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science.* 1988;239(4839):476-81. Epub 1988/01/29.

51. Bunyaratvej A, Butthep P, Yoksan S, Bhamarapavati N. Dengue viruses induce cell proliferation and morphological changes of endothelial cells. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1997;28 Suppl 3:32-7. Epub 1997/01/01.

52. Ho LJ, Wang JJ, Shaio MF, Kao CL, Chang DM, Han SW, et al. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol.* 2001;166(3):1499-506. Epub 2001/02/13.
53. Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP, Ennis FA. Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *J Virol.* 2001;75(8):3501-8. Epub 2001/03/27.
54. Lin YW, Wang KJ, Lei HY, Lin YS, Yeh TM, Liu HS, et al. Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. *J Virol.* 2002;76(23):12242-9. Epub 2002/11/05.
55. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis.* 2004;189(8):1411-8. Epub 2004/04/10.
56. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol.* 1997;16(4):204-8. Epub 1997/07/01.
57. Kyle JL, Beatty PR, Harris E. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *J Infect Dis.* 2007;195(12):1808-17. Epub 2007/05/12.
58. King CA, Marshall JS, Alshurafa H, Anderson R. Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J Virol.* 2000;74(15):7146-50. Epub 2000/07/11.
59. Chuang YC, Lei HY, Liu HS, Lin YS, Fu TF, Yeh TM. Macrophage migration inhibitory factor induced by dengue virus infection increases vascular permeability. *Cytokine.* 2011;54(2):222-31. Epub 2011/02/16.
60. Chuang YC, Su WH, Lei HY, Lin YS, Liu HS, Chang CP, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces autophagy via reactive oxygen species generation. *PloS one.* 2012;7(5):e37613. Epub 2012/05/26.
61. Puerta-Guardo H, Medina F, De la Cruz Hernandez SI, Rosales VH, Ludert JE, del Angel RM. The 1alpha,25-dihydroxy-vitamin D3 reduces dengue virus infection in human myelomonocyte (U937) and hepatic (Huh-7) cell lines and cytokine production in the infected monocytes. *Antiviral Res.* 2012;94(1):57-61. Epub 2012/03/06.
62. Paes MV, Lenzi HL, Nogueira AC, Nuovo GJ, Pinhao AT, Mota EM, et al. Hepatic damage associated with dengue-2 virus replication in liver cells of BALB/c

- mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2009;89(10):1140-51. Epub 2009/09/02.
63. Suksanpaisan L, Cabrera-Hernandez A, Smith DR. Infection of human primary hepatocytes with dengue virus serotype 2. *J Med Virol*. 2007;79(3):300-7. Epub 2007/01/25.
64. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*. 2011;3(2):160-71. Epub 2011/11/04.
65. Reyes-Del V, Chavez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol*. 2005;79:4557-67.
66. Mercado-Curiel RF, Esquinca-Aviles HA, Tovar R, Diaz-Badillo A, Camacho-Nuez M, Munoz Mde L. The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol*. 2006;6:85. Epub 2006/10/04.
67. Yazı M, Salas-Benito J, Lanz-Mendoza H, Hernandez-Martinez S, Del Angel R. A putative receptor for dengue virus in mosquito tissues: localization of a 45 kDa glycoprotein. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67:76-84.
68. Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*. 1997;3(8):866-71. Epub 1997/08/01.
69. Hilgard P, Stockert R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology*. 2000;32(5):1069-77. Epub 2000/10/26.
70. Germi R, Crance JM, Garin D, Guimet J, Lortat-Jacob H, Ruigrok RW, et al. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*. 2002;292(1):162-8. Epub 2002/03/07.
71. Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol*. 1999;73(4):2650-7. Epub 1999/03/12.
72. Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol*. 2004;149(5):915-27. Epub 2004/04/21.
73. Thepparit C, Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol*. 2004;78(22):12647-56. Epub 2004/10/28.

74. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. 2009;5(4):318-28. Epub 2009/04/22.
75. Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem*. 2005;280(25):23698-708. Epub 2005/04/28.
76. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep*. 2003;4(7):723-8. Epub 2003/06/05.
77. Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, et al. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003;197(7):823-9. Epub 2003/04/12.
78. Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog*. 2008;4(2):e17. Epub 2008/02/13.
79. Chen ST, Lin YL, Huang MT, Wu MF, Cheng SC, Lei HY, et al. CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease. *Nature*. 2008;453(7195):672-6. Epub 2008/05/23.
80. Carlos CC, Oishi K, Cinco MT, Mapua CA, Inoue S, Cruz DJ, et al. Comparison of clinical features and hematologic abnormalities between dengue fever and dengue hemorrhagic fever among children in the Philippines. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73(2):435-40. Epub 2005/08/17.
81. Guzman MG, Vazquez S. [Notes on the laboratory diagnosis of dengue virus]. *Revista cubana de medicina tropical*. 2002;54(3):180-8. Epub 2005/04/26. Apuntes sobre el diagnostico de laboratorio del virus dengue.
82. Kittigul L, Pitakarnjanakul P, Sujirarat D, Siripanichgon K. The differences of clinical manifestations and laboratory findings in children and adults with dengue virus infection. *J Clin Virol*. 2007;39(2):76-81. Epub 2007/05/18.
83. WHO. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2 ed. Geneva: World Health Organization; 1997.
84. Barniol J, Gaczkowski R, Barbato EV, da Cunha RV, Salgado D, Martinez E, et al. Usefulness and applicability of the revised dengue case classification by

- disease: multi-centre study in 18 countries. *BMC Infect Dis.* 2011;11:106. Epub 2011/04/23.
85. Torres E. Dengue. *Estudos Avançados.* 2008;22(64):33-52.
86. Malavige GN, Fernando S, Fernando DJ, Seneviratne SL. Dengue viral infections. *Postgraduate medical journal.* 2004;80(948):588-601. Epub 2004/10/07.
87. Halstead SB, Nimmannitya S, Cohen SN. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *The Yale journal of biology and medicine.* 1970;42(5):311-28. Epub 1970/04/01.
88. Halstead SB, O'Rourke EJ. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature.* 1977;265(5596):739-41. Epub 1977/02/24.
89. Halstead SB. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Adv Virus Res.* 2003;60:421-67. Epub 2003/12/24.
90. Pierson TC, Xu Q, Nelson S, Oliphant T, Nybakken GE, Fremont DH, et al. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. *Cell Host Microbe.* 2007;1(2):135-45. Epub 2007/11/17.
91. van der Schaar HM, Wilschut JC, Smit JM. Role of antibodies in controlling dengue virus infection. *Immunobiology.* 2009;214(7):613-29. Epub 2009/03/06.
92. Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol.* 2007;88(Pt 2):365-75. Epub 2007/01/26.
93. Randolph VB, Winkler G, Stollar V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology.* 1990;174(2):450-8. Epub 1990/02/01.
94. Huang CY, Silengo SJ, Whiteman MC, Kinney RM. Chimeric dengue 2 PDK-53/West Nile NY99 viruses retain the phenotypic attenuation markers of the candidate PDK-53 vaccine virus and protect mice against lethal challenge with West Nile virus. *J Virol.* 2005;79(12):7300-10. Epub 2005/05/28.
95. Huang KJ, Yang YC, Lin YS, Huang JH, Liu HS, Yeh TM, et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Immunol.* 2006;176(5):2825-32. Epub 2006/02/24.

96. Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de C, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol.* 1999;73(6):4738-47. Epub 1999/05/11.
97. Rico-Hesse R, Harrison LM, Nisalak A, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Green S, et al. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(1):96-101. Epub 1998/02/06.
98. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res.* 2008;72:1-76. Epub 2008/12/17.
99. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997;230(2):244-51. Epub 1997/04/14.
100. Cologna R, Armstrong PM, Rico-Hesse R. Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *J Virol.* 2005;79(2):853-9. Epub 2004/12/23.
101. dos Santos FB, Nogueira FB, Castro MG, Nunes PC, de Filippis AM, Faria NR, et al. First report of multiple lineages of dengue viruses type 1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Virol J.* 2011;8:387. Epub 2011/08/05.
102. Halstead SB, Suaya JA, Shepard DS. The burden of dengue infection. *Lancet.* 2007;369(9571):1410-1. Epub 2007/05/01.
103. Ong A, Sandar M, Chen MI, Sin LY. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. *Int J Infect Dis.* 2007;11(3):263-7. Epub 2006/08/11.
104. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Vazquez S, Morier L, Gonzalez D, et al. Dengue hemorrhagic Fever caused by sequential dengue 1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(6):1113-7. Epub 2006/12/19.
105. Halsey ES, Marks MA, Gotuzzo E, Fiestas V, Suarez L, Vargas J, et al. Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(5):e1638. Epub 2012/05/09.
106. Mentor NA, Kurane I. Dengue virus infection of human T lymphocytes. *Acta virologica.* 1997;41(3):175-6. Epub 1997/06/01.
107. Livingston PG, Toomey S, Kurane I, Janus J, Ennis FA. Modulation of the functions of dengue virus-specific human CD8+ cytotoxic T cell clone by IL-2, IL-7 and IFN gamma. *Immunological investigations.* 1995;24(4):619-29. Epub 1995/05/01.

108. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med*. 2003;9(7):921-7. Epub 2003/06/17.
109. Mathew A, Rothman AL. Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis. *Immunological reviews*. 2008;225:300-13. Epub 2008/10/08.
110. Pang T, Cardoso MJ, Guzman MG. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunol Cell Biol*. 2007;85(1):43-5. Epub 2006/11/30.
111. Srikiatkachorn A. Plasma leakage in dengue haemorrhagic fever. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;102(6):1042-9. Epub 2009/12/08.
112. Cheng HJ, Lin CF, Lei HY, Liu HS, Yeh TM, Luo YH, et al. Proteomic analysis of endothelial cell autoantigens recognized by anti-dengue virus nonstructural protein 1 antibodies. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009;234(1):63-73. Epub 2008/11/11.
113. Lin CF, Wan SW, Cheng HJ, Lei HY, Lin YS. Autoimmune pathogenesis in dengue virus infection. *Viral Immunol*. 2006;19(2):127-32. Epub 2006/07/05.
114. Kouri GP, Guzman MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bulletin of the World Health Organization*. 1989;67(4):375-80. Epub 1989/01/01.
115. Kouri G, Guzman MG, Valdes L, Carbonel I, del Rosario D, Vazquez S, et al. Reemergence of dengue in Cuba: a 1997 epidemic in Santiago de Cuba. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(1):89-92. Epub 1998/03/21.
116. Halstead SB, Streit TG, Lafontant JG, Putvatana R, Russell K, Sun W, et al. Haiti: absence of dengue hemorrhagic fever despite hyperendemic dengue virus transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(3):180-3. Epub 2001/09/20.
117. Chiewsilp P, Scott RM, Bhamarapavati N. Histocompatibility antigens and dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1981;30(5):1100-5. Epub 1981/09/01.
118. Loke H, Bethell DB, Phuong CX, Dung M, Schneider J, White NJ, et al. Strong HLA class I--restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? *J Infect Dis*. 2001;184(11):1369-73. Epub 2001/12/26.
119. LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L, et al. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus

infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Human immunology*. 2002;63(11):1039-44. Epub 2002/10/24.

120. Stephens HA, Klaythong R, Sirikong M, Vaughn DW, Green S, Kalayanaroj S, et al. HLA-A and -B allele associations with secondary dengue virus infections correlate with disease severity and the infecting viral serotype in ethnic Thais. *Tissue antigens*. 2002;60(4):309-18. Epub 2002/12/11.

121. Zivna I, Green S, Vaughn DW, Kalayanaroj S, Stephens HA, Chandanayingyong D, et al. T cell responses to an HLA-B*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. *J Immunol*. 2002;168(11):5959-65. Epub 2002/05/23.

122. Polizel JR, Bueno D, Visentainer JE, Sell AM, Borelli SD, Tsuneto LT, et al. Association of human leukocyte antigen DQ1 and dengue fever in a white Southern Brazilian population. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(6):559-62. Epub 2004/11/24.

123. Loke H, Bethell D, Phuong CX, Day N, White N, Farrar J, et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor 1a genes. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67(1):102-6. Epub 2002/10/05.

124. Fernandez-Mestre MT, Gendzekhadze K, Rivas-Vetencourt P, Layrisse Z. TNF-alpha-308A allele, a possible severity risk factor of hemorrhagic manifestation in dengue fever patients. *Tissue antigens*. 2004;64(4):469-72. Epub 2004/09/14.

125. Chen RF, Wang L, Cheng JT, Chuang H, Chang JC, Liu JW, et al. Combination of CTLA-4 and TGFbeta1 gene polymorphisms associated with dengue hemorrhagic fever and virus load in a dengue-2 outbreak. *Clin Immunol*. 2009;131(3):404-9. Epub 2009/03/10.

126. Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nature genetics*. 2005;37(5):507-13. Epub 2005/04/20.

127. Chao YC, Huang CS, Lee CN, Chang SY, King CC, Kao CL. Higher infection of dengue virus serotype 2 in human monocytes of patients with G6PD deficiency. *PloS one*. 2008;3(2):e1557. Epub 2008/02/14.

128. Bravo JR, Guzman MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987;81(5):816-20. Epub 1987/01/01.

129. Lee MS, Hwang KP, Chen TC, Lu PL, Chen TP. Clinical characteristics of dengue and dengue hemorrhagic fever in a medical center of southern Taiwan during

- the 2002 epidemic. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2006;39(2):121-9. Epub 2006/04/11.
130. Xavier-Carvalho C. Poliformismos em genes da resposta imune e gravidade à dengue. [Dissertação (mestrado em Biologia celular e molecular)]. In press 2012.
131. Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet infectious diseases*. 2002;2(1):33-42. Epub 2002/03/15.
132. Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, et al. Dengue Virus (DV) enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. *J Infect Dis*. 2005;192(3):510-9. Epub 2005/07/05.
133. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(1):37-49. Epub 2000/07/07.
134. Fink J, Gu F, Vasudevan SG. Role of T cells, cytokines and antibody in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. *Rev Med Virol*. 2006;16(4):263-75. Epub 2006/06/23.
135. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology*. 2002;3(3):221-7. Epub 2002/03/05.
136. Hober D, Poli L, Roblin B, Gestas P, Chungue E, Granic G, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48(3):324-31. Epub 1993/03/01.
137. Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignacio SR, Oliveira MJ, Cordeiro MT, et al. Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(2):229-32. Epub 2001/04/04.
138. Chaturvedi UC. Tumour necrosis factor & dengue. *The Indian journal of medical research*. 2006;123(1):11-4. Epub 2006/03/29.
139. Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *Journal of virological methods*. 2004;121(2):171-80. Epub 2004/09/24.
140. Bruchfeld A, Carrero JJ, Qureshi AR, Lindholm B, Barany P, Heimbürger O, et al. Elevated serum macrophage migration inhibitory factor (MIF) concentrations in chronic kidney disease (CKD) are associated with markers of oxidative stress and endothelial activation. *Mol Med*. 2009;15(3-4):70-5. Epub 2008/12/17.

141. Assuncao-Miranda I, Amaral FA, Bozza FA, Fagundes CT, Sousa LP, Souza DG, et al. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(1):218-28. Epub 2009/09/25.
142. Chen LC, Lei HY, Liu CC, Shiesh SC, Chen SH, Liu HS, et al. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(1):142-7. Epub 2006/01/13.
143. Medin CL, Fitzgerald KA, Rothman AL. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol*. 2005;79(17):11053-61. Epub 2005/08/17.
144. Juffrie M, van Der Meer GM, Hack CE, Haasnoot K, Sutaryo, Veerman AJ, et al. Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-8 and its relationship to neutrophil degranulation. *Infect Immun*. 2000;68(2):702-7. Epub 2000/01/20.
145. Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 7):1801-13. Epub 2004/06/26.
146. Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S53-72. Epub 2009/11/26.
147. Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis*. 2008;8:86. Epub 2008/06/27.
148. Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, et al. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 12):3623-30. Epub 2006/11/14.
149. de-Oliveira-Pinto LM, Gandini M, Freitas LP, Siqueira MM, Marinho CF, Setubal S, et al. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1beta and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(1):48-56. Epub 2012/02/09.

150. Rodriguez-Madoz JR, Bernal-Rubio D, Kaminski D, Boyd K, Fernandez-Sesma A. Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells. *J Virol.* 2010;84(9):4845-50. Epub 2010/02/19.
151. Plataniias LC, Uddin S, Domanski P, Colamonici OR. Differences in interferon alpha and beta signaling. Interferon beta selectively induces the interaction of the alpha and betaL subunits of the type I interferon receptor. *J Biol Chem.* 1996;271(39):23630-3. Epub 1996/09/27.
152. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annual review of biochemistry.* 1998;67:227-64. Epub 1998/10/06.
153. Gale M, Katze M. Molecular mechanisms of interferon resistance mediated by viral-directed inhibition of PKR, the interferon-induced protein kinase. *Pharmacol Ther.* 1988;78:29-46.
154. Foy E, Li K, Sumpter R, Jr., Loo YM, Johnson CL, Wang C, et al. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(8):2986-91. Epub 2005/02/16.
155. Ignarro LJ. Physiological significance of endogenous nitric oxide. *Seminars in perinatology.* 1991;15(1):20-6. Epub 1991/02/01.
156. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews.* 1991;43(2):109-42. Epub 1991/06/01.
157. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329(27):2002-12. Epub 1993/12/30.
158. Bogdan C. The multiplex function of nitric oxide in (auto)immunity. *J Exp Med.* 1998;187(9):1361-5. Epub 1998/06/06.
159. Charnsilpa W, Takhampunya R, Endy TP, Mammen MP, Jr., Libraty DH, Ubol S. Nitric oxide radical suppresses replication of wild-type dengue 2 viruses in vitro. *J Med Virol.* 2005;77(1):89-95. Epub 2005/07/21.
160. Levy A, Valero N, Espina LM, Anez G, Arias J, Mosquera J. Increment of interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, nitric oxide, C-reactive protein and apoptosis in dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104(1):16-23. Epub 2009/09/08.
161. Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J Gen Virol.* 2006;87(Pt 10):3003-11. Epub 2006/09/12.

162. Reis SR, Valente LM, Sampaio AL, Siani AC, Gandini M, Azeredo EL, et al. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *International immunopharmacology*. 2008;8(3):468-76. Epub 2008/02/19.
163. Allen-Hall L, Arnason JT, Cano P, Lafrenie RM. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF- α inhibitor through NF- κ B. *J Ethnopharmacol*. 2010;127(3):685-93. Epub 2009/12/10.
164. Muhamad M, Kee LY, Rahman NA, Yusof R. Antiviral actions of flavanoid-derived compounds on dengue virus type-2. *International journal of biological sciences*. 2010;6(3):294-302. Epub 2010/06/23.
165. Low JS, Wu KX, Chen KC, Ng MM, Chu JJ. Narasin, a novel antiviral compound that blocks dengue virus protein expression. *Antiviral therapy*. 2011;16(8):1203-18. Epub 2011/12/14.
166. Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, Abubakar S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology*. 2011;8:560. Epub 2011/12/29.
167. Tang LI, Ling AP, Koh RY, Chye SM, Voon KG. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:3. Epub 2012/01/17.
168. Di Stasi LC. *Plantas Medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora UNESP; 1995. 230 p.
169. Halberstein RA. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Ann Epidemiol*. 2005;15(9):686-99. Epub 2005/06/01.
170. Huffman M. Current evidence for self-medication in primates: A multidisciplinary perspective. *Yearbook Physical Anthropol*. 1997;40:171-200.
171. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy reviews*. 2012 Jan:1-5.
172. Junior V. Plantas medicinais: Cura segura? *Quim Nova*. 2005;28(3):519-28.
173. Maciel MAM. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova*. 2002;25(3):429-38.
174. Schultes RE. The role of the ethnobotanist in the search for new medicinal plants. *Lloydia*. 1962;25:257-66.
175. Botsaris AS. *Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras*. São Paulo: Ícone Editora Ltda; 1995.

176. Di Stasi LC. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia*. 1993;65:529-40.
177. Verpoorte R, van der Heijden R, Memelink J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Res*. 2000;9(4-5):323-43; discussion 1. Epub 2000/12/29.
178. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med*. 2006;27(1):1-93. Epub 2005/08/18.
179. Dewick PM. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat Prod Rep*. 2002;19(2):181-222. Epub 2002/05/16.
180. Williams DH, Stone MJ, Hauck PR, Rahman SK. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *J Nat Prod*. 1989;52(6):1189-208. Epub 1989/11/01.
181. Garcia ES. Workshop biodiversidade: Perspectivas e Oportunidade Tecnológicas. 1996.
182. Rocha MEN. Potencialidades Biodinâmicas de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)]. In press 2002.
183. Elisabetsky E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. *J Ethnopharmacol*. 1991;32(1-3):235-9. Epub 1991/04/01.
184. Giraldo-Cañas D. Un Nuevo Género de la Familia Neotropical Marcgraviaceae (Ericales) y Circunscripción del Complejo *Norantea*. *Caldasia*. 2007;29(2):203-17.
185. Giraldo-Cañas D. Las Marcgraviaceae de la Amazonia Colombiana: Estudio Preliminar sobre su Diversidad, Distribución y Fitogeografía. *Darwiniana*. 1999;37:15-24.
186. da Silva VP. Estudo Químico e Atividade Biológica de *Norantea brasiliensis* Choisy (Marcgraviaceae). 2012.
187. Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. 1981.
188. Soares C. O Livro de Ouro das Flores - As Cem Variedades mais Belas, suas Características e Histórias. Rio de Janeiro: Ediouro Publicações S/A; 2002.
189. [cited 2012 25 de setembro]; Available from: <http://www.arboretto.blogspot.com.br>.
190. Schultz ARH. Introdução a botânica sistemática. 4 ed: Editora Universidade; 1984.
191. Saleh N, Towers GHN. Flavonol glycosides of *Norantea guianensis* flowers. *Phytochemistry*. 1974;13(9):2012-0.

192. Fialho LG. Efeito Imunomodulador e antiviral de Marcgraviaceae em modelo de infecção de monócitos humanos pelo vírus Dengue-2 in vitro [Monografia]. In press 2010.
193. Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, et al. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology*. 2001;204(4):494-507. Epub 2002/01/05.
194. Azeredo EL, Zagne SM, Alvarenga AR, Nogueira RM, Kubelka CF, de Oliveira-Pinto LM. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(4):437-49. Epub 2006/09/05.
195. Bethell DB, Flobbe K, Cao XT, Day NP, Pham TP, Buurman WA, et al. Pathophysiologic and prognostic role of cytokines in dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1998;177(3):778-82. Epub 1998/03/14.
196. Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, et al. Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. *J Infect Dis*. 1999;179(4):755-62. Epub 1999/03/09.
197. Suharti C, van Gorp EC, Setiati TE, Dolmans WM, Djokomoeljanto RJ, Hack CE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. *Thrombosis and haemostasis*. 2002;87(1):42-6. Epub 2002/02/23.
198. Spelman K, Burns J, Nichols D, Winters N, Ottersberg S, Tenborg M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2006;11(2):128-50. Epub 2006/07/04.
199. Nasirudeen AM, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam KP, Liu DX. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1):e926. Epub 2011/01/20.
200. Butrapet S, Huang CY, Pierro DJ, Bhamarapravati N, Gubler DJ, Kinney RM. Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. *J Virol*. 2000;74(7):3011-9. Epub 2000/03/09.
201. Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E. Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *J Virol*. 2000;74(17):7814-23. Epub 2000/08/10.

202. Chen YC, Wang SY. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. *J Virol.* 2002;76(19):9877-87. Epub 2002/09/05.
203. Leardkamolkarn V, Sirigulpanit W. Establishment of a stable cell line coexpressing dengue virus-2 and green fluorescent protein for screening of antiviral compounds. *Journal of biomolecular screening.* 2012;17(3):283-92. Epub 2011/11/10.
204. Reis SR, Sampaio AL, Henriques MG, Gandini M, Azeredo EL, Kubelka CF. An in vitro model for dengue virus infection that exhibits human monocyte infection, multiple cytokine production and dexamethasone immunomodulation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102(8):983-90. Epub 2008/01/23.
205. Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, et al. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(8):1091-9. Epub 2010/02/09.
206. Gandini M, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Freire Mda S, Galler R, et al. Dengue-2 and yellow fever 17DD viruses infect human dendritic cells, resulting in an induction of activation markers, cytokines and chemokines and secretion of different TNF-alpha and IFN-alpha profiles. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(5):594-605. Epub 2011/09/07.
207. Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SR, Torrentes-Carvalho A, Zagne SM, et al. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology.* 2010;130(2):202-16. Epub 2010/02/02.
208. Alen MM, De Burghgraeve T, Kaptein SJ, Balzarini J, Neyts J, Schols D. Broad antiviral activity of carbohydrate-binding agents against the four serotypes of dengue virus in monocyte-derived dendritic cells. *PloS one.* 2011;6(6):e21658. Epub 2011/07/09.
209. Sariol CA, Martinez MI, Rivera F, Rodriguez IV, Pantoja P, Abel K, et al. Decreased dengue replication and an increased anti-viral humoral response with the use of combined Toll-like receptor 3 and 7/8 agonists in macaques. *PloS one.* 2011;6(4):e19323. Epub 2011/05/12.
210. Martins VE, Alencar CH, Kamimura MT, de Carvalho Araujo FM, De Simone SG, Dutra RF, et al. Occurrence of Natural Vertical Transmission of Dengue-2 and

- Dengue-3 Viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceara, Brazil. *PloS one*. 2012;7(7):e41386. Epub 2012/08/01.
211. Alhoot MA, Wang SM, Sekaran SD. RNA interference mediated inhibition of dengue virus multiplication and entry in HepG2 cells. *PloS one*. 2012;7(3):e34060. Epub 2012/03/30.
212. Moriguchi M, Nakajima T, Kimura H, Watanabe T, Takashima H, Mitsumoto Y, et al. The copper chelator trientine has an antiangiogenic effect against hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of interleukin-8 production. *Int J Cancer*. 2002;102(5):445-52. Epub 2002/11/15.
213. de Araújo S, Teixeira M, Dantas T, Miranda A, Lima E, Melo V, et al. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. *Ciência Animal*. 2008;18(1):25-31.
214. Tong XK, Qiu H, Zhang X, Shi LP, Wang GF, Ji FH, et al. WSS45, a sulfated alpha-D-glucan, strongly interferes with Dengue 2 virus infection in vitro. *Acta pharmacologica Sinica*. 2010;31(5):585-92. Epub 2010/04/27.
215. Bo Hui M, Ying-Hong Shi M, Zhen-Bin Ding M, Jian Zhou M, Cheng-Yu Gu M, Yuan-Fei Peng M, et al. Proteasome Inhibitor Interacts Synergistically With Autophagy Inhibitor to Suppress Proliferation and Induce Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma 2012.
216. Chaturvedi UC, Nagar R. Nitric oxide in dengue and dengue haemorrhagic fever: necessity or nuisance? *FEMS immunology and medical microbiology*. 2009;56(1):9-24. Epub 2009/02/26.
217. Houghton-Trivino N, Salgado DM, Rodriguez JA, Bosch I, Castellanos JE. Levels of soluble ST2 in serum associated with severity of dengue due to tumour necrosis factor alpha stimulation. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 3):697-706. Epub 2009/11/06.
218. Priyadarshini D, Gadia RR, Tripathy A, Gurukumar KR, Bhagat A, Patwardhan S, et al. Clinical findings and pro-inflammatory cytokines in dengue patients in Western India: a facility-based study. *PloS one*. 2010;5(1):e8709. Epub 2010/01/22.
219. Freire MS, Marchevsky RS, Almeida LF, Yamamura AM, Caride EC, Brindeiro PA, et al. Wild dengue virus types 1, 2 and 3 viremia in rhesus monkeys. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(2):203-8. Epub 2007/04/12.
220. Mateu GP, Marchevsky RS, Liprandi F, Bonaldo MC, Coutinho ES, Dieudonne M, et al. Construction and biological properties of yellow fever 17D/dengue type 1

recombinant virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(3):289-98. Epub 2006/12/16.

221. Smith KM, Nanda K, Spears CJ, Piper A, Ribeiro M, Quiles M, et al. Testing of Novel Dengue Virus 2 Vaccines in African Green Monkeys: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *Am J Trop Med Hyg.* 2012. Epub 2012/08/15.

222. Li X, Cao H, Wang Q, Di B, Wang M, Lu J, et al. Novel AAV-based genetic vaccines encoding truncated dengue virus envelope proteins elicit humoral immune responses in mice. *Microbes Infect.* 2012;14(11):1000-7. Epub 2012/05/26.

223. Barban V, Munoz-Jordan JL, Santiago GA, Mantel N, Girerd Y, Gulia S, et al. Broad neutralization of wild-type dengue virus isolates following immunization in monkeys with a tetravalent dengue vaccine based on chimeric yellow fever 17D/dengue viruses. *Virology.* 2012;429(2):91-8. Epub 2012/05/01.

224. Bente DA, Rico-Hesse R. Models of dengue virus infection. *Drug discovery today Disease models.* 2006;3(1):97-103. Epub 2007/12/19.