



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS BRUTOS, RICOS EM  
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS, OBTIDOS DE MACROALGAS  
MARRONS E VERDES CONTRA O VÍRUS DENGUE 2**

**FABIANA LIMA BEZERRA**

NATAL/RN  
2016

FABIANA LIMA BEZERRA

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS BRUTOS, RICOS EM  
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS, OBTIDOS DE MACROALGAS  
MARRONS E VERDES CONTRA O VÍRUS DENGUE 2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

**Orientador:** Prof. Dr. Hugo Alexandre de O. Rocha

**Co-orientador:** Dr. Kleber Juvenal Silva Farias

**NATAL/RN  
2016**

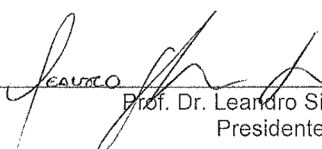
FABIANA LIMA BEZERRA

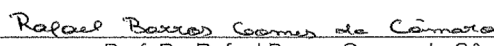
**Atividade antiviral de extratos brutos, ricos em polissacarídeos sulfatados,  
obtidos de algas marrons e verdes contra o vírus dengue 2**

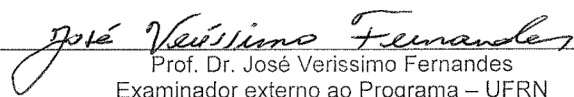
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

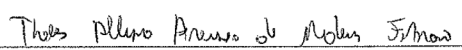
Aprovado em: 14/06/2016

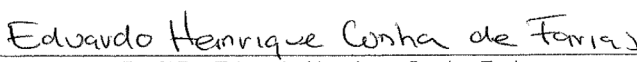
BANCA EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Leandro Silva Costa  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rafael Barros Gomes da Câmara  
Examinador externo ao Programa – UFRN

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes  
Examinador externo ao Programa – UFRN

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Thales Allyrio Araújo de Medeiros Fernandes  
Examinador externo à Instituição – UERN

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Eduardo Henrique Cunha Farias  
Examinador externo à Instituição – UNI-RN

Catálogo da Publicação na Fonte  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Sistema de Bibliotecas Biblioteca Central  
Zila Mamede / Setor de Informação e Referência

Bezerra, Fabiana Lima.

Atividade antiviral de extratos brutos, ricos em polissacarídeos sulfatados, obtidos de macroalgas marrons e verdes contra o vírus dengue 2 / Fabiana Lima Bezerra. - Natal, RN, 2016.

133 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Alexandre de O. Rocha.

Coorientador: Prof. Dr. Kleber Juvenal Silva Farias.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Polissacarídeos sulfatados - Tese. 2. Algas marinhas ó Atividade antiviral - Tese. 3. Dengue ó Sorotipo 2 ó Tese. 4. *Aedes Aegypt* - Tese I. Rocha, Hugo Alexandre de O. II. Farias, Kleber Juvenal Silva. III. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 547.458:614.4

Dedico esta tese aos meus pais  
Margarete (*in memoriam*) e João e aos  
meus filhos Nicolás e Júlia.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente na minha vida, por me dar força, sabedoria e coragem para alcançar meus objetivos e vencer os momentos difíceis que tive que enfrentar a fim de realizar esse estudo.

Aos meus pais Margarete (*In Memoriam*) e João, de quem me orgulho muito, os quais me educaram e me ensinaram a importância do estudo. Vocês são exemplos a serem seguidos. Muito obrigada por iluminarem meu caminho com amor, carinho, respeito, dedicação e apoio. Vocês são meu alicerce! Sou muito grata pela minha formação moral e profissional.

Aos meus filhos Nicolas e Júlia pelo amor, carinho, aprendizado, paciência e compreensão nos momentos difíceis e também pelos momentos de descontração, brincadeiras, sorrisos e travessuras. Vocês dão luz e cor à minha vida. Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos George e Giovani muito obrigada por fazerem parte da vida, pelo amor, amizade e incentivo.

Ao meu orientador, colega e amigo Prof. Dr. Hugo A. O. Rocha agradeço pela confiança, orientação e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao meu co-orientador Dr. Kleber J. S. Farias, sou muito grata pelos ensinamentos e apoio para a execução dos ensaios com os vírus.

Ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte por fornecer as condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho, assim como as agências financiadoras CAPES e CNPq

Ao querido amigo prof. Veríssimo por estar sempre disposto a esclarecer minhas dúvidas em virologia.

Aos professores José Veríssimo Fernandes e Josélio Maria Galvão de Araújo, por permitirem que eu utilizasse a estrutura do Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer (LADIC) para realizar os ensaios com os vírus. Muito obrigada!

Ao grande amigo Tony pelo apoio, incentivo nos momentos difíceis e pela disponibilidade de revisar comigo o abstract da tese.

À querida amiga Jailma, um doce de pessoa, te agradeço por todo carinho, pela solicitude, incentivo e por me ajudar na formatação das figuras desta tese.

Ao amigo Renato Ferreira por ter me ajudado na realização da PCR em tempo real.

Agradeço aos queridos do BIOPOL, com os quais tive a oportunidade de tirar minhas dúvidas e compartilhar momentos de descontração: Jailma, Dayane, Karol, Cíntia, Mariana, Monique, Marília, Ruth, Larisse, Mônica, Ana Karina, Rafael, Rony, Gabriel, Moacir, Pablo, Raniere, Ivan, Vinicius, Max, Almino e Popó. Desejo sucesso pessoal e científico a todos vocês.

Aos queridos do Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer (LADIC) Renato Ferreira, Tábata Lima, Yasmin Mesquita, Ana Alice e Daniel, pelas discussões científicas e por compartilharem os ajustes de protocolo para padronização das técnicas. Que todos vocês sejam bem sucedidos na vida pessoal e profissional. Muito obrigada!

Aos colegas de disciplina Ariane, Adriana, Amanda, Maíra, Patrícia, Ralfo, Ruth, Rafael, Renato, Tábata e Virgínia.

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra Vanessa de Paula Soares Rachetti, Prof. Dr. Leandro Silva Costa e ao Dr. Leonardo Thiago Duarte Barreto Nobre pelos pertinentes apontamentos que engrandeceram este estudo.

A todos os professores e técnicos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, meu agradecimento especial pela amizade e colaboração em todos os aspectos.

Ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia, onde minha vida profissional foi construída desde a minha graduação.

A todas as pessoas que acreditaram em mim e que direta ou indiretamente cooperaram com a realização deste trabalho.

## RESUMO

A dengue é a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui-se em um grave problema de saúde pública. A doença é endêmica em regiões tropicais e subtropicais, abrangendo mais de 100 países, correspondendo à metade da população mundial. As epidemias são recorrentes e estima-se que os vírus da dengue causem 390 milhões de infecções a cada ano, sendo uma importante causa de morbidade. Apesar desse cenário, atualmente, ainda não se dispõe de um antiviral contra a dengue. Neste contexto, diversos estudos relatam a atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados obtidos das algas marinhas contra vírus envelopados, cuja ação está associada à interferência nas etapas iniciais do processo de infecção viral. Neste estudo, avaliou-se a potencial atividade antiviral de extratos brutos ricos em polissacarídeos sulfatados obtidos das algas marrons *Dictyota menstrualis* (EBDMens) e *Dictyota mertensii* (EBDM) e das algas verdes *Codium isthmocladum* (EBCI) e *Caulerpa sertularioides* (EBCS) contra o vírus dengue 2 (DENV-2), em linhagem de células Vero, usando diferentes estratégias metodológicas (tratamento simultâneo, tratamento pós-infecção, pré-tratamento da célula, pré-tratamento do vírus, adsorção, pós-adsorção e penetração). A citotoxicidade dos extratos foi analisada pelo ensaio de redução do MTT. O estudo da atividade antiviral foi determinado pela quantificação do número de cópias do RNA viral por RT-qPCR após 120 h de infecção. Nenhum extrato exibiu toxicidade para as células Vero no ensaio de redução do MTT na concentração de 100 µg/mL. Todos os extratos exibiram atividade antiviral quando adicionados durante os primeiros 90 minutos de infecção, demonstrando redução significativa no número de cópias do RNA viral após 120 horas. Os extratos EBDMens e EBDM foram mais eficazes nos ensaios de pré-tratamento da célula e do vírus, e o primeiro exerceu atividade antiviral superior ao EBDM durante a adsorção viral. Os extratos EBCI e EBCS apresentaram atividade antiviral semelhante no ensaio de pré-tratamento da célula. O EBCI foi mais eficaz na redução da adsorção do DENV-2 em células Vero. Porém, o EBCS se mostrou mais eficiente nos ensaios de pré-tratamento do vírus e penetração. Dentre os extratos avaliados, o EBCS parece ser o mais efetivo no combate ao DENV-2. Estes resultados revelam o potencial desses extratos ricos em polissacarídeos sulfatados como compostos com ação antiviral, sugerindo que eles atuam nos estágios iniciais da infecção por DENV-2.

**Palavras-chave:** Polissacarídeos sulfatados. Algas marinhas. Vírus dengue sorotipo 2. Agentes antivirais.

## ABSTRACT

Dengue is considered the most important human arboviruses, and is a serious public health problem. This disease is endemic in tropical and subtropical regions, reaching more than 100 countries, which means the half of world population, and those epidemics have been appellant. It is estimated that Dengue virus could cause 390 millions of infections each year, and is an important cause of morbidity. Although this scenario, actually doesn't exist a dengue antivirals still. Sorts of studies have showed antivirus activity of seaweed sulfated polysaccharides against enveloped viruses, which action seems to be associated to initials steps of infection process. In this study, was evaluated the potential antiviral activity of crude extracts rich in sulfated polysaccharides obtained from the brown algae *Dyctiota menstrualis* (EBDMens) and *Dyctiota mertensii* (EBDM), and green algae *Codium isthmocladium* (EBCI) and *Caulerpa sertularioides* (EBCS), tested against Dengue virus 2 (DENV-2) in Vero cell line, by using different methodological strategies (simultaneous treatment, post-infection treatment, cell pre-treatment, virus pre-treatment, adsorption, post-adsorption and penetration). The extracts cytotoxicity was evaluated by MTT reduction assay. The study of antiviral activity was determined by quantifying viral RNA load using RT-qPCR, after 120 hours of infection. None extract has showed toxicity against Vero Cells in MTT reduction assay with 100 µg/mL concentration. All extracts have shown antiviral activity when added during the first 90 minutes of infection, and a significant reduction of viral RNA number of copies after 120 hours. The EBDMens and EBDM extracts were more efficient to cell and virus pre-treatment assays, and the first has showed higher antiviral activity than EBDM during viral adsorption. The EBCI and EBCS extracts have presented antiviral activity very similar in cell pre-treatment assay. EBCI was more efficient in the reduction of DENV-2 adsorption in Vero cell. However, EBCS has showed more efficient in cell pre-treatment and penetration assays. Between the extracts evaluated, EBCS seems to be more effective against DENV-2. These results have showed potential action of extracts rich in sulfated polysaccharides with antivirus activity, suggesting that they act in the initials steps of infection process of DENV-2.

**Keywords:** Sulfated polysaccharides. Seaweed. Dengue virus serotype 2. Antiviral agents.

## LISTA DE FIGURAS

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Transmissão urbana do DENV por mosquitos <i>Aedes</i>   | 25 |
| <b>Figura 2.</b>  | Inoculação subcutânea do DENV pelo vetor <i>Aedes</i>   | 26 |
| <b>Figura 3.</b>  | Representação esquemática do genoma e poliproteína do vírus dengue.                               | 27 |
| <b>Figura 4.</b>  | Estrutura da superfície do vírus dengue e da proteína do envelope (E)                             | 31 |
| <b>Figura 5.</b>  | Etapas ciclo de replicação do vírus dengue  | 33 |
| <b>Figura 6.</b>  | Representação esquemática da partícula viral imatura e madura.                                    | 35 |
| <b>Figura 7.</b>  | Sugestão de classificação de casos e níveis de severidade.  | 36 |
| <b>Figura 8.</b>  | Etapas do curso clínico da dengue.  | 37 |
| <b>Figura 9.</b>  | Modelo da amplificação da replicação viral mediada por anticorpos.                                | 40 |
| <b>Figura 10.</b> | Interação entre o NS1 solúvel e o heparam sulfato expresso no endotélio.                          | 41 |
| <b>Figura 11.</b> | Fenômeno de pecado antigênico original.   | 42 |
| <b>Figura 12.</b> | Representação esquemática do GAG heparam sulfato.   | 47 |
| <b>Figura 13.</b> | Representação esquemática da interação do DENV com o heparam sulfato.                             | 48 |
| <b>Figura 14.</b> | Representação esquemática da heparina.  | 49 |
| <b>Figura 15.</b> | Estrutura da proteína E com o sítio de ligação da heparina.                                       | 50 |
| <b>Figura 16.</b> | Representação esquemática dos ensaios antivirais.   | 77 |
| <b>Figura 17.</b> | Imunofluorescência indireta para detecção do DENV-2 em células C6/36.                             | 80 |
| <b>Figura 18.</b> | Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por RT-PCR para identificação do DENV-2. | 81 |

|                   |   |    |
|-------------------|---|----|
| <b>Figura 19.</b> | Ensaio de placa para a titulação do vírus dengue-2  | 82 |
| <b>Figura 20.</b> | Comportamento eletroforético do EBDMens da alga <i>D. mesntrualis</i> .   | 83 |
| <b>Figura 21.</b> | Capacidade redutora do MTT em células Vero expostas ao EBDMens por 120 h.   | 84 |
| <b>Figura 22.</b> | Efeito do EBDMens no tratamento das células Vero após a infecção pelo DENV-2.   | 85 |
| <b>Figura 23.</b> | Efeito do tratamento simultâneo com EBDMens sobre a replicação do DENV-2 em células Vero.   | 86 |
| <b>Figura 24.</b> | Efeito do tratamento simultâneo com EBDMens sobre a replicação do DENV-2 em células Vero.   | 87 |
| <b>Figura 25.</b> | Quantificação do número de cópias de RNA viral por RT-qPCR do sobrenadante das células Vero pré-tratadas com o EBDMens.               | 88 |
| <b>Figura 26.</b> | Efeito pré-tratamento do DENV-2 com o EBDMens antes da infecção das células Vero.   | 89 |
| <b>Figura 27.</b> | Efeito do EBDMens na adsorção do DENV-2 em células Vero.  | 90 |
| <b>Figura 28.</b> | Efeito do EBDMens no período pós-adsorção sobre o DENV-2 adsorvidos na membrana de células Vero.                                      | 91 |
| <b>Figura 29.</b> | Efeito do EBDMens na penetração do DENV-2 em células Vero.  | 92 |
| <b>Figura 30.</b> | Comportamento eletroforético dos extratos brutos das algas <i>D. mertensii</i> , <i>C. isthmocladum</i> e <i>C. sertularioides</i> .. | 93 |
| <b>Figura 31.</b> | Atividade redutora de MTT da linhagem de célula Vero exposta aos extratos EBDM, EBCI e EBCS por 120h.                                 | 95 |
| <b>Figura 32.</b> | Efeito do tratamento simultâneo da célula Vero com DENV-2 e com os extratos EBDM, EBCI e EBCS.  | 7  |
| <b>Figura 33.</b> | Quantificação do número de RNA viral por RT-qPCR do sobrenadante das células Vero pré-tratadas com EBDM, EBCI e EBCS.                 | 96 |
| <b>Figura 34.</b> | Efeito do pré-tratamento do DENV-2 com EBDM, EBCI e EBCS antes da infecção das células Vero.  | 97 |

**Figura 35.** Efeito do EBDM, EBCI e EBCS na adsorção do DENV- 98  
2 em células Vero.

**Figura 36.** Efeito do extrato do EBDM, EBCI e EBCS na 99  
penetração do DENV-2 em células Vero.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações para detecção dos sorotipos de Dengue..... | 68 |
| <b>Tabela 2.</b> Volume dos reagentes para reação de RT-PCR.....  | 68 |
| <b>Tabela 3.</b> Teor de açúcares totais, sulfato e proteína do EBDMens.....                            | 83 |
| <b>Tabela 4.</b> Resultados das dosagens de açúcares totais sulfato e proteína do EBDM, EBCI EEBCS..... | 94 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                        |  |
|------------------------|--|
| <b>AAD</b>             | Agente antiviral direto  |
| <b>ABS</b>             | Absorbância  |
| <b>ADA</b>             | Amplificação da infecção dependente de anticorpo   |
| <b>BHK-21</b>          | Linhagem contínua de células de rim de hamster   |
| <b>BIOPOL</b>          | Laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais   |
| <b>BSA</b>             | Albumina sérica bovina   |
| <b>C</b>               | Capsídeo   |
| <b>C3a</b>             | Proteína C3a do complemento  |
| <b>C5a</b>             | Proteína C5a do complemento  |
| <b>C5b-9</b>           | Proteína C5b, C6, C7, C8 e C9 do complemento<br>(Complexo de Ataque à Membrana)  |
| <b>CC50</b>            | Concentração citotóxica 50   |
| <b>CCL5</b>            | Quimiocina ligante 5   |
| <b>CD 14</b>           | Grupo de diferenciação 14  |
| <b>Cap 5'</b>          | Capacete   |
| <b>CTLA-4</b>          | Antígeno 4 de linfócito T citotóxico   |
| <b>CXCL8</b>           | Quimiocina de migração de neutrófilos  |
| <b>CXCL9</b>           | Monocina induzida por IFN- $\gamma$  |
| <b>CXCL10</b>          | Interferon induzido por proteína 10  |
| <b>CXCL11</b>          | Quimioatraente $\alpha$ de célula T induzida por interferon  |
| <b>CYD-TDV</b>         | Vacina dengue tetravalente e vírus vacinal atenuado da febre amarela cepa 17D.<br>Ligante não integrina ICAM-DC não específica |
| <b>DC-SING</b>         | (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin).   |
| <b>DENV</b>            | Vírus Dengue   |
| <b>DENV1, 2, 3 e 4</b> | Vírus Dengue 1-4   |
| <b>DMSO</b>            | Dimetilsulfóxido   |
| <b>DNA</b>             | Ácido desoxirribonucleico  |
| <b>DO</b>              | Densidade óptica   |
| <b>DSS</b>             | Síndrome do Choque da Dengue   |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>E</b>                       | Envelope   |
| <b>EBDMens</b>                 | Extrato bruto de <i>Dictyota menstrualis</i>   |
| <b>EBDM</b>                    | Extrato bruto de <i>Dictyota mertensii</i>   |
| <b>EBCI</b>                    | Extrato bruto de <i>Codium isthmocladium</i>   |
| <b>EBCS</b>                    | Extrato bruto de <i>Caulerpa sertularioides</i>  |
| <b>ED-I</b>                    | Domínio do Envelope I  |
| <b>ED-II</b>                   | Domínio do Envelope II   |
| <b>ED-III</b>                  | Domínio do Envelope III  |
| <b>ELISA</b>                   | Ensaio de Imunoabsorção Ligado à Enzima  |
| <b>Fc<math>\gamma</math>R</b>  | Receptor do fragmento constante gama   |
| <b>FDA</b>                     | Órgão Norte-Americano de controle sobre produtos farmacêuticos ( <i>Food and Drug Administration</i> ) |
| <b>FHD</b>                     | Febre Hemorrágica da Dengue  |
| <b>FITC</b>                    | Isotiocianato de fluoresceína  |
| <b>HBV</b>                     | Vírus da Hepatite B  |
| <b>HIV</b>                     | Vírus da Imunodeficiência Humana   |
| <b>HSV</b>                     | Vírus Herpes Simplex   |
| <b>HLA</b>                     | Antígeno Leucocitário Humano   |
| <b>HS</b>                      | Heparam sulfato  |
| <b>HSV-1 e 2</b>               | Vírus Herpes Simples tipo 1 e 2  |
| <b>IFI</b>                     | Imunofluorescência indireta  |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | Interferon gama  |
| <b>IgG</b>                     | Imunoglobulina G   |
| <b>Kb</b>                      | Kilobase   |
| <b>kDA</b>                     | Kilodaltons  |
| <b>L-15</b>                    | Meio de Cultura Leibovitz-15   |
| <b>M</b>                       | Membrana   |
| <b>MAbs</b>                    | Anticorpos monoclonais   |
| <b>MIAF</b>                    | Fluido ascítico imune de camundongo  |
| <b>MOI</b>                     | Multiplicidade de infecção   |
| <b>MT</b>                      | Motivo metiltransferase  |
| <b>MTT</b>                     | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenil tetrazolium bromide  |
| <b>NS1</b>                     | Proteína não estrutural 1  |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>NS1s</b>                    | Proteína não estrutural 1 secretada  |
| <b>NS2 A e B</b>               | Proteína não estrutural 2 A e B  |
| <b>NS3</b>                     | Proteína não estrutural 3  |
| <b>NS4 A e B</b>               | Proteína não estrutural 4 A e B  |
| <b>NS5</b>                     | Proteína não estrutural 5  |
| <b>OPAS</b>                    | Organização Pan-America de Saúde   |
| <b>ORF</b>                     | Fase de leitura aberta ( <i>Open Reading frame</i> )   |
| <b>PBS</b>                     | Tampão Fosfato-Salino  |
| <b>PCR</b>                     | Reação da Polimerase em Cadeia   |
| <b>prM</b>                     | Pré-membrana   |
| <b>OS</b>                      | Polissacarídeo sulfatado   |
| <b>PSA</b>                     | Antibiótico penicilina, estreptomicina e anfotericina  |
| <b>RER</b>                     | Retículo Endoplasmático Rugoso   |
| <b>RNA</b>                     | Ácido ribonucleico   |
| <b>RT-PCR</b>                  | Reação da transcriptase reversa, seguida de reação da polimerase em cadeia.<br>Reação da transcriptase reversa, seguida de reação da polimerase em cadeia em tempo real. |
| <b>RT-Qpcr</b>                 |  |
| <b>SBF</b>                     | Soro Fetal Bovino  |
| <b>SCD</b>                     | Síndrome de Choque da Dengue   |
| <b>TIM e TAM</b>               | Família de receptors de fosfatidilserina   |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | Fator transformador de crescimento $\beta$   |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Fator de necrose tumoral $\alpha$  |
| <b>TNFR1</b>                   | Receptor de Fator de Necrose Tumoral 1   |
| <b>TNG</b>                     | Trans-Golgi  |
| <b>UTR</b>                     | Região terminal não traduzida ( <i>Untranslated region</i> )   |
| <b>VEGF</b>                    | Fator de crescimento endotelial vascular A   |
| <b>VLP</b>                     | Partícula semelhante à vírus   |
| <b>WHO</b>                     | Organização Mundial de Saúde   |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>21</b> |
| 1.1. Considerações Gerais.....  | 21        |
| 1.2. Aspectos Históricos.....   | 22        |
| 1.3. Vetor e transmissão.....   | 24        |
| 1.4. Vírus.....   | 27        |
| 1.5. Proteínas do DENV.....   | 28        |
| 1.6. Ciclo de replicação viral.....   | 32        |
| 1.7. Dengue: Sintomas.....  | 36        |
| 1.8. Patogênese.....  | 39        |
| 1.9. Vacina.....  | 42        |
| 1.10. Antivirais.....   | 44        |
| 1.11. Heparan sulfato: receptor para o vírus dengue.....  | 46        |
| 1.12. Atividade antiviral dos Polissacarídeos sulfatados.....                                   | 51        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>57</b> |
| 2.1. Objetivo geral.....  | 57        |
| 2.2. Objetivos específicos.....   | 57        |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>59</b> |
| 3.1. Material biológico.....  | 59        |
| 3.1.1. Coleta.....  | 59        |
| 3.2. Outros materiais.....  | 59        |
| 3.2.1. Reagentes.....   | 59        |
| 3.2.2. Equipamentos.....  | 60        |
| 3.3. Extração dos Polissacarídeos.....  | 61        |
| 3.3.1. Delipidação.....   | 61        |
| 3.3.2. Proteólise.....  | 61        |
| 3.3.3. Precipitação de polissacarídeos.....   | 62        |
| 3.4. Eletroforese em gel de agarose dos extratos brutosõ .....                                  | 62        |
| 3.5. Caracterização química.....  | 62        |
| 3.5.1. Dosagem de açúcares totais.....  | 62        |
| 3.5.2. Dosagem de proteínas totais.....   | 63        |
| 3.5.3. Dosagem de sulfato.....  | 63        |
| 3.6. Preparo da solução estoque de trabalho.....  | 63        |
| 3.7. Culturas celulares.....  | 64        |
| 3.8. Linhagem viral.....  | 65        |
| 3.9. Preparo das suspensões-estoques virais.....  | 65        |
| 3.9.1. Propagação do vírus em células C6/36.....  | 65        |
| 3.9.2. Confirmação da identidade do DENV-2 pela técnica de Imunofluorescência Indireta.....     | 65        |
| 3.10. Extração do RNA viral.....  | 66        |
| 3.11. Confirmação da identidade do DENV-2 pelo método de RT-PCR.....                            | 67        |
| 3.12. Titulação do DENV-2 por quantificação do número de unidade formadora de placa (PFU) ..... | 69        |
| 3.13. Avaliação da capacidade redutora do sal de tetrazolium (MTT) de                           |           |

|   |           |
|---|-----------|
| células Vero.....   | 70        |
| 3.14. Avaliação do efeito do tempo de adição do extrato no ciclo de replicação viral.....                                   | 71        |
| 3.15. Quantificação do número de cópias de RNA viral do DENV-2 por PCR em tempo real.....                                   | 71        |
| 3.16. Tratamento das células Vero com o extrato bruto após a infecção por DENV-2 (Tratamento pós-infecção) .....            | 72        |
| 3.17. Tratamento das células Vero com o extrato bruto simultaneamente à infecção por DENV-2 (Tratamento simultâneo). .....  | 72        |
| 3.18. Tratamento das células Vero com o extrato bruto e posterior infecção com DENV-2 (Pré-tratamento da célula) .....      | 73        |
| 3.19. Avaliação do efeito dos extratos sobre pré-tratado antes da infecção das células Vero (Pré-tratamento do vírus) ..... | 73        |
| 3.20. Tratamento durante a adsorção viral.....  | 74        |
| 3.21. Tratamento pós-adsorção viral.....  | 74        |
| 3.22. Tratamento durante a penetração viral.....  | 75        |
| 3.23. Análise estatística.....  | 78        |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>   | <b>80</b> |
| 4.1. Isolamento do sorotipo do vírus dengue 2 .....   | 80        |
| 4.2. Determinação dos títulos virais.....   | 81        |
| 4.3. Eletroforese em gel de agarose do EBDMens da alga <i>D. mesntrualis</i> .....  | 82        |
| 4.4. Caracterização química da amostra.....   | 83        |
| 4.5. Capacidade redutora do MTT por células Vero quando expostas a EBDMens.....   | 83        |
| 4.6. Avaliação da potencial ação antiviral do EBDMens.....  | 84        |
| 4.6.1. Efeito do EBDMens no tratamento pós-infecção.....  | 84        |
| 4.6.2. Efeito do EBDMens no tratamento simultâneo à infecção.....   | 85        |
| 4.6.3. Efeito do pré-tratamento da célula Vero com EBDMens antes da infecção pelo DENV-2.....                               | 87        |
| 4.6.4. Efeito do pré-tratamento do com EBDMens antes da infecção das células.....   | 88        |
| 4.6.5. Efeito do EBDMens na adsorção do DENV-2 nas células Vero.....  | 89        |
| 4.6.6. Efeito do EBDMens na após-adsorção do DENV-2 nas células Veroõ .....   | 90        |
| 4.6.7. Efeito do EBDMens na penetração do DENV-2 nas células Vero. .....  | 91        |
| 4.7. Caracterização química, capacidade redutora do MTT e atividade antiviral de outras algas.....                          | 92        |
| 4.7.1. Eletroforese em gel de agarose dos extratos EBDM, EBCI e EBCS.....   | 93        |
| 4.7.2. Caracterização química das amostras.....   | 94        |
| 4.7.3. Capacidade redutora do MTT por células Vero quando expostas a EBDM, EBCI e EBCS.....                                 | 94        |
| 4.7.4. Avaliação da potencial ação antiviral do EBDM, EBCI e EBCS.....  | 95        |
| 4.7.5. Efeito do EBDM, EBCI e EBCS no tratamento simultâneo à infecçãoõ .....   | 95        |
| 4.7.6. Efeito do pré-tratamento da célula Vero com EBDM, EBCI e EBCS antes da infecção pelo DENV-2.....                     | 96        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.7.7. Efeito do pré-tratamento do com EBDM, EBCI e EBCS antes da infecção das células Vero..... | 97         |
| 4.7.8. Efeito dos extratos EBDM, EBCI e EBCS na adsorção do DENV-2 nas células Vero.....         | 98         |
| 4.7.9. Efeito dos extratos EBDM, EBCI e EBCS na penetração do DENV-2 nas células Vero.....       | 98         |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>   | <b>101</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>116</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>119</b> |

*Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Considerações Gerais

A dengue é uma doença infecciosa de etiologia viral, de início abrupto, causada por quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus dengue (DENV1-4), que são transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*. Os vírus da dengue (DENV) pertencem à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. Atualmente, a dengue é a arbovirose mais importante que ocorre em países tropicais e subtropicais, sendo caracterizada por elevada morbidade (HORSTICK; TOZAN; WILDER-SMITH, 2015).

Quase metade da população mundial vive em áreas afetadas por dengue (WHO, 2012), doença que acomete tanto a população rica quanto a pobre, contudo é mais frequente em indivíduos que vivem em áreas densamente povoadas e empobrecidas. Segundo estimativas recentes, cerca de 390 milhões de infecções pelo vírus dengue ocorrem anualmente em todo o mundo, dos quais 96 milhões de pessoas apresentam as manifestações clínicas (BHATT *et al.*, 2013). Desses casos, 250 mil evoluem para as formas graves da doença, que provocam a morte em cerca de 25 mil pacientes (VALLE; PIMENTA; DA CUNHA, 2015)

A dengue evoluiu a partir de uma doença esporádica para um grave problema de saúde pública em escala global. Desde a década de 1980, o número de casos de dengue tem aumentado em escala exponencial, tornando a doença endêmica em mais de 100 países e, sua incidência tem aumentado mais de 30 vezes nos últimos 50 anos (GUBLER, 2002; THOMAS; STRICKMAN; VAUGHN, 2003; BRADY *et al.*, 2012; WHO, 2012). Dentre os fatores associados à expansão da doença destacam-se a rápida urbanização não planejada, o aumento da densidade populacional aliada às precárias condições de vida, a falta de ações de vigilância e controle do vetor, precariedade dos programas de saúde pública, viagens internacionais, bem como a evolução do vírus e do vetor (WHO, 1997; GUBLER, 2002; HORSTICK; TOZAN; WILDER-SMITH, 2015). Aliado a esse aumento da expansão geográfica, a frequência e magnitude dos surtos, bem como a severidade da

doença são responsáveis pelo grande impacto social e econômico gerados nos países onde esta doença é endêmica (GUBLER, 2002; MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013; GUZMAN; HARRIS, 2015).

## 1.2. Aspectos Históricos e epidemiológicos

Os primeiros relatos, mais bem documentados de epidemias de uma doença compatível com a dengue, antes do isolamento do vírus, ocorreram na Ásia, África e América do Norte, entre 1779-1780 (GUBLER; CLARK, 1995). Desde então, várias epidemias atribuídas ao vírus dengue foram registradas em várias partes do mundo, abrangendo todos os continentes (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Apesar de sua ampla distribuição, a dengue afetava principalmente os países asiáticos, ocorrendo sob a forma clássica da enfermidade. Contudo, como consequência da Segunda Guerra Mundial (1939-1945), a movimentação de tropas favoreceu a disseminação dos sorotipos do vírus principalmente em países do sudeste asiático, onde a dengue não era tão comum, propiciando a ocorrência do primeiro surto, em 1953, de uma doença febril hemorrágica grave em crianças, que foi denominada de febre hemorrágica das Filipinas. Porém, a confirmação de que a doença era causada pelo vírus da dengue só se deu em 1958, com a epidemia que ocorreu na Tailândia (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994; GUBLER; CLARK, 1995; BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Nas Américas, a dengue ocorreu como entidade clínica, desde o século XIX até as primeiras décadas do século XX, quando se observou uma reticência epidemiológica, possivelmente em razão da eliminação do *Aedes aegypti* em vários países desse continente (PINHEIRO, 1996; BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Após a década de 50 até os dias atuais, houve a intensificação dos casos de dengue no continente americano, havendo redução entre os períodos pandêmicos, e o envolvimento de novas áreas geográficas anteriormente não atingidas (PONTES; RUFFINO-NETTO, 1994b).

Desde então, a circulação do vírus dengue vem se intensificando nas Américas e os surtos epidêmicos se tornaram cada vez mais frequentes nos grandes centros urbanos (SAN MARTIN *et al.*, 2010). Em 2013, foi relatada a

maior epidemia de dengue nesse continente, sendo registrados 2,4 milhões de casos da doença com aproximadamente 1,6% dos casos graves ( VALLE; PIMENTA; DA CUNHA, 2015).

A primeira evidência de uma epidemia de dengue no Brasil data de 1982, na cidade de Boa Vista (Roraima), quando foram isolados os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (OSANAI, 1983). Em 1986, uma nova epidemia de dengue voltou a ocorrer, com a reintrodução do sorotipo DENV-1, agora na região metropolitana do Rio de Janeiro, área densamente povoada, com graves problemas de infraestrutura urbana e com grande fluxo populacional (tanto migratório, quanto turístico) (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; ROSA, 1986; NOGUEIRA *et al.*, 1990). A partir daí, este mesmo sorotipo se disseminou para outros estados do País.

A década de 90 foi marcada pelo recrudescimento da dengue, tanto pelo aumento da transmissão do DENV-1, como pela introdução do DENV-2 no estado do Rio de Janeiro, o qual provocou a primeira epidemia de febre hemorrágica do dengue no país (SIQUEIRA JR. *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005). Nos anos seguintes, os sorotipos DENV-1 e DENV-2 se disseminaram para outras áreas do território brasileiro, acompanhados da expansão do vetor *Aedes aegypti* (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

Em 2001, no estado do Rio de Janeiro, foi confirmada a introdução do sorotipo DENV-3, o qual foi responsável pela epidemia de 2002 no Brasil (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Este sorotipo predominou no país até o ano de 2006. Entretanto, no período entre 2007 e 2010 houve a substituição do DENV-3 pelo DENV-2. Essa permuta foi responsável por epidemias em vários estados e pelo aumento do número de casos graves da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014)

Após um hiato de 28 anos, o DENV-4 foi reintroduzido no Brasil, novamente pelo estado de Roraima, no ano de 2010, de onde se disseminou para todo o país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O sorotipo DENV-4 foi o principal responsável pela grande epidemia de 2013, sendo detectado em mais de 70% dos municípios brasileiros (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

Durante o período de janeiro a abril de 2016, foram registrados no país 802.429 casos prováveis de dengue, sendo confirmados 2.727 casos da doença, dos quais 244 com sinais de alarme, sendo registrado 140 óbitos.

Nesse período, a região Sudeste registrou o maior número de casos prováveis de dengue 463.807, o que representa 57,8%, do total de casos notificados no país, seguida pela região Nordeste, que ocupou o segundo lugar no ranking desta casuística com 158.235 casos (19,7%). No momento atual, o sorotipo viral de maior prevalência é o DENV- 1, que corresponde a 94,8 % das amostras que foram positivas para o isolamento do vírus dengue (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a).

No estado do Rio Grande do Norte (RN), o primeiro caso de dengue, confirmado laboratorialmente, ocorreu no município de Assu, em 1994. Desde então, a doença se disseminou por vários municípios do estado (BRANCO *et al.*, 2015). No últimos anos, a taxa de incidência de casos prováveis de dengue vem aumentando drasticamente no estado, passando 318,4 casos/100 mil habitantes, registrados em 2015 para 857,0 casos/100 mil hab., notificados até abril de 2016. Considerando-se os municípios com menos de 100 mil habitantes, o estado do RN se destaca por apresentar três municípios com as maiores taxas de incidência de dengue no mês de fevereiro deste ano, merecendo destaque o município de Guamaré que lidera esse ranking com 12.929,7 casos/ 100mil hab. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a).

Diversos são os fatores que favorecem a ocorrência das recorrentes epidemias de dengue nos países tropicais e subtropicais. Dentre eles podemos destacar o papel do mosquito vetor na transmissão e circulação do vírus da dengue (BARRETO; TEIXEIRA, 2008)

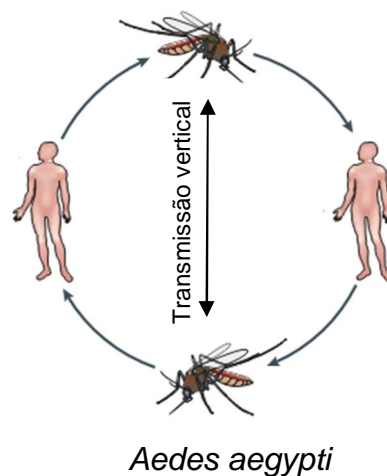
### 1.3. Vetor e Transmissão

Os vetores dos vírus dengue são mosquitos culicídeos do gênero *Aedes*, cujos principais representantes são as espécies *A. aegypti* (Linnaeus, 1762) e *A. albopictus* (Skuse, 1894). Ambas são espécies exóticas nas Américas, sendo a primeira oriunda da África subsaariana e a segunda proveniente do continente asiático. Sobre o mosquito *A. albopictus*, embora esteja presente no Brasil, ainda não foi comprovada sua participação na transmissão do DENV. A principal espécie responsável pela transmissão do vírus no país é o vetor *A. aegypti* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001; PONLAWAT; HARRINGTON, 2005).

O mosquito *Aedes aegypti* é a espécie que está mais associada ao homem e esse hábito está diretamente relacionado aos comportamentos estritamente sinantrópico, endofílico e antropofílico do vetor (NATAL, 2002; PONLAWAT; HARRINGTON, 2005). O *A. aegypti* é, essencialmente, um mosquito urbano, contudo já foi localizado em zonas rurais. É considerada uma espécie bastante domiciliada, uma vez que compartilha o mesmo ambiente e os mesmos horários de atividade com o homem, o que propicia os repastos sanguíneos, garantindo assim sua perpetuação (NATAL, 2002).

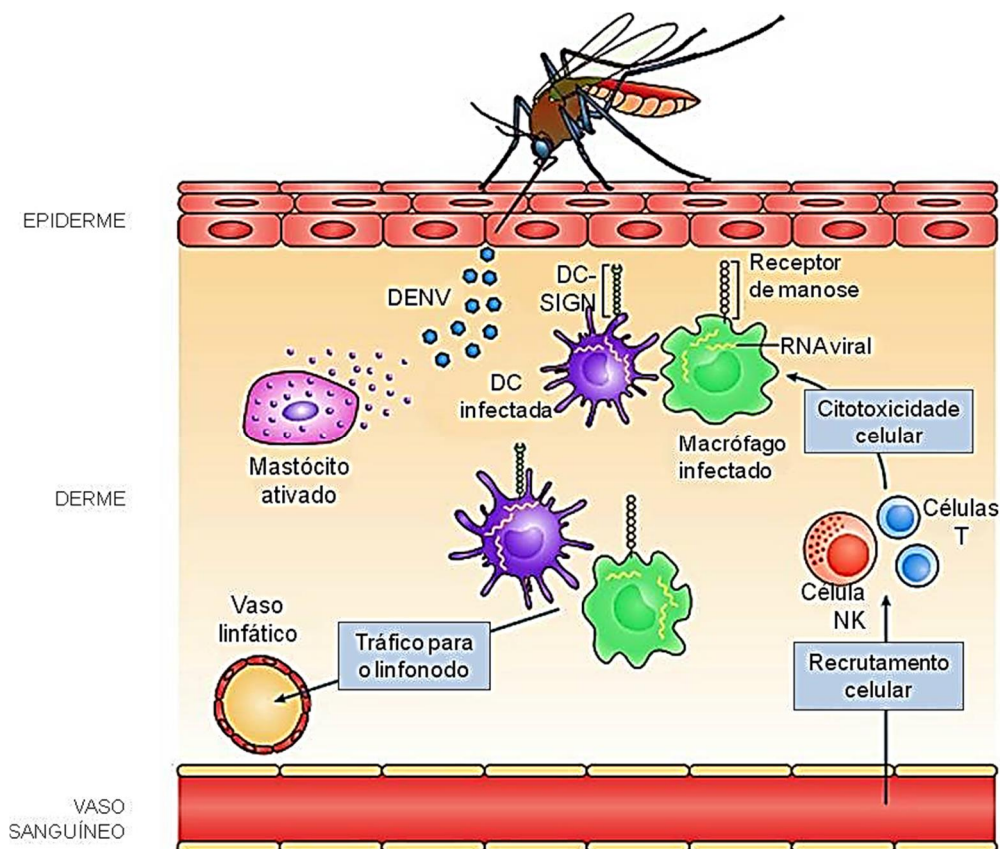
O ciclo de transmissão urbana do vírus da dengue inclui o homem infectado por qualquer um dos sorotipos do vírus, o mosquito vetor e o homem suscetível (figura 1). O ciclo urbano se expressa na forma endêmico-epidêmica, onde o aumento da densidade populacional nos centros urbanos, aliado as condições ambientais e climáticas favoráveis à manutenção e proliferação do vetor, propiciam a transmissão horizontal do vírus (homem-mosquito) (WHITEHEAD *et al.*, 2007). Por outro lado, a manutenção do ciclo endêmico da doença, também é favorecida pela transmissão vertical ou transovariana, onde a fêmea do mosquito infectada é capaz de transmitir o vírus à sua progênie, o que explica em parte a manutenção do vírus dengue na natureza durante o período interepidêmico (KYLE; HARRIS, 2008; ARUNACHALAM *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2012).

#### Ciclo urbano endêmico/epidêmico



**Figura 1.** Transmissão urbana do DENV por mosquitos *Aedes aegypti*. Adaptado de Whitehead *et al.*, 2007.

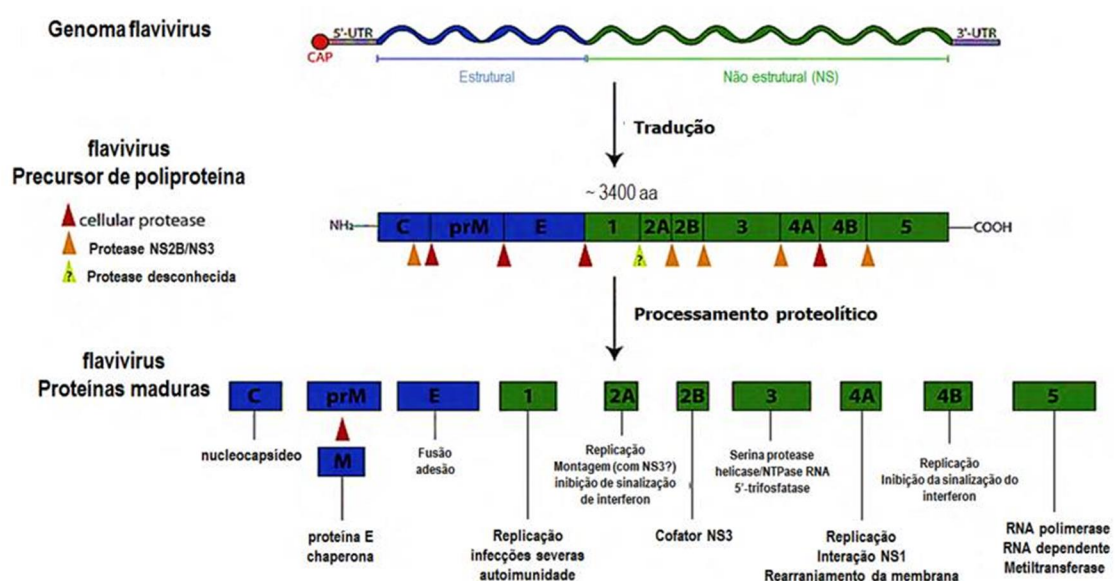
O mecanismo de transmissão horizontal dos DENV se dá durante o repasto sanguíneo de fêmeas do gênero *Aedes* infectadas, que durante a hematofagia inoculam o vírus na epiderme e derme do hospedeiro, resultando a partir daí na infecção de células dendríticas da pele (LIMON-FLORES *et al.*, 2005; ST JOHN; ABRAHAM; GUBLER, 2013) (Figura 2). Estas células infectadas migram para os linfonodos drenantes, onde monócitos e macrófagos são recrutados e se tornam alvos de infecção. Conseqüentemente, a infecção é amplificada nessas células e os vírus são disseminados através do sistema linfático para o ducto torácico e daí para circulação sanguínea, com tropismo para as células mononucleares circulantes no sangue e macrófagos esplênicos e hepáticos (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). Os vírus também infectam os megacariócitos, células precursoras das plaquetas, presentes na medula óssea, causando a trombocitopenia característica da dengue (KHARYA *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Inoculação subcutânea do DENV pelo vetor *Aedes* com o trânsito de células dendríticas (DC) infectadas pelo vírus dengue (DENV) para os linfonodos drenantes. Adaptado de St. John *et al.*, 2013.

## 1.4. Vírus

Morfologicamente, o DENV é uma partícula esférica com cerca de 50 nm de diâmetro, contendo genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva e um nucleocapsídeo envolvido por um envelope lipídico que é adquirido pelo brotamento das partículas virais imaturas a partir da membrana do retículo endoplasmático (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; KAUFMANN; ROSSMANN, 2011). O genoma, de aproximadamente 11 kilobases (Kb), apresenta uma única fase de leitura aberta (ORF - *open reading frame*), sendo flanqueada por regiões terminais não traduzidas (*untranslated region*, UTR) 5' e 3' ambas importantes para a tradução e replicação do vírus (CHAMBERS *et al.*, 1990; BÄCK; LUNDKVIST, 2013). O RNA apresenta a estrutura cap ( $m^7GpppAmpN_2$ ) na extremidade 5' no entanto, não possui cauda poliA na porção 3' (figura 3). O genoma com uma única ORF, que funciona como RNA mensageiro polistrônico é diretamente traduzido em um longo precursor de poliproteína, o qual é co- e pós-traducionalmente processado por proteases do vírus e do hospedeiro para gerar três proteínas estruturais (C, prM e E), que são constituintes da partícula viral e sete não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) envolvidas na replicação e montagem das partículas virais (PERERA; KUHN, 2008) (figura 3).



**Figura 3.** Representação esquemática do genoma e poliproteína do vírus dengue. Adaptado de Pastorino *et al.*, 2010.

### 1.5. Proteínas do DENV

As proteínas não estruturais (NS) estão envolvidas na replicação do RNA viral, montagem do vírus e na evasão da resposta imune do hospedeiro (MUÑOZ-JORDAN *et al.*, 2003; LINDENBACH; RICE, 2007).

A glicoproteína NS1 é expressa sob três formas: intracelular, na superfície da membrana da célula e solúvel. Na forma intracelular, se encontra na membrana do retículo endoplasmático e está envolvida na replicação do genoma viral (MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996). Quando presente na superfície da célula infectada, serve de alvo para os anticorpos, os quais ativam o sistema complemento ocasionando a lise celular (LINDENBACH; RICE, 2003). Já na forma secretada, o antígeno NS1s pode ser detectado na circulação sanguínea do primeiro ao nono dia de infecção, permitindo assim, o diagnóstico precoce. Por essa razão, o antígeno NS1s é um importante marcador da infecção viral (ALCON *et al.*, 2002). Além disso, essa proteína aciona a resposta imune humoral, estando envolvida na defesa contra o vírus, e na patogênese da doença (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; ROTHMAN, 2011; SCREATON *et al.*, 2015).

NS4A, NS4B, NS2A e NS2B são pequenas proteínas hidrofóbicas. As três primeiras são proteínas transmembrana que ancoram o complexo de replicação viral na membrana do retículo endoplasmático (RE) (MILLER; SPARACIO; BARTENSCHLAGER, 2006; MILLER *et al.*, 2007; LINDENBACH; RICE, 2007). Elas também são capazes de bloquear a transdução de sinal mediada pelo Interferon tipo I (IFN tipo I) (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). Já a proteína NS2B forma um complexo estável com a NS3 e atua como um cofator necessário da serino protease NS3 (FALGOUT *et al.*, 1991). A NS2B é também responsável pela associação do complexo NS2B/NS3 à membrana do RE (CLUM; EBNER; PADMANABHAN, 1997).

NS3 é uma proteína multifuncional que apresenta atividades enzimáticas de serino protease, RNA helicase, 5q nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e RNA 5q trifosfatase (RTase), que estão relacionadas ao processamento da poliproteína e a replicação do RNA viral (PERERA; KUHN, 2008). Quando está associada à proteína NS2B (cofator), a proteína NS3 apresenta atividade serino-protease, que catalisa a clivagem das junções entre as proteínas virais

NS2-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A E NS4B-NS5 (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH; RICE, 2007). Como helicase, catalisa a separação entre as fitas de RNA-molde e RNA recém sintetizada, também exerce atividade NTPase, necessária para a síntese do RNA viral. Já a RNA 5' trifosfatase está comprometida na formação do cap na extremidade 5' do genoma viral (FALGOUT *et al.*, 1991; ZHANG; MOHAN; PADMANABHAN, 1992; LI *et al.*, 1999; BENARROCH *et al.*, 2004).

NS5 é a maior e mais conservada proteína entre os flavivírus, apresenta mais de 67% de identidade entre todos os sorotipos do DENV. Ela também possui duas atividades enzimáticas distintas, separadas por uma região interdomínio, sendo uma metiltransferase (MTase) no domínio N-terminal e a outra uma RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp) (PERERA; KUHN, 2008). A MTase está envolvida na formação do cap no RNA viral, enquanto a RdRp promove a replicação do RNA viral (GRUN; BRINTON, 1986; TAN *et al.*, 1996; ACKERMANN; PADMANABHAN, 2001).

Como já mencionado o vírus DENV apresenta três proteínas estruturais, a proteína do capsídeo (C), a proteína associada à membrana (M) e a proteína do envelope (E). Essas proteínas determinam a estrutura do vírus (LINDENBACH; RICE, 2007)

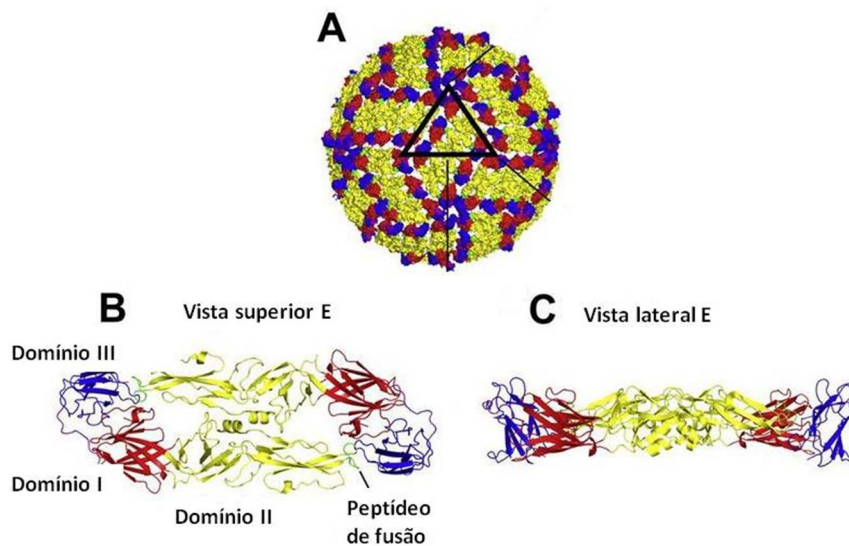
A proteína C está envolvida no empacotamento do RNA viral para formar juntamente com este genoma o nucleocapsídeo viral de simetria icosaédrica. Essa estrutura encontra-se envolta pelo envelope viral, o qual é formado por uma bicamada lipídica derivada do RE. Nesse envelope estão ancoradas a proteína M, processada a partir de uma proteína precursora maior (prM) e a glicoproteína do envelope (proteína E), as quais juntas formam homodímeros que determinam a morfologia da partícula viral (LINDENBACH; RICE, 2007; PERERA; KUHN, 2008).

A proteína M é a proteína estrutural de membrana dos vírus maduros que é sintetizada como uma proteína precursora prM. Esta proteína é encontrada na partícula imatura do DENV interagindo com a proteína E, tendo a função de estabilizar a proteína do envelope e impedir que ela sofra um rearranjo para a forma fusogênica, o que pode ser mediado pelo pH ácido, durante o trânsito do vírus através da via secretora no trans-Golgi (TNG) (ZHANG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2009; ZHENG; UMASHANKAR;

KIELIAN, 2010). O amadurecimento das partículas virais imaturas para os vírions maduros ocorre nesta via secretora e está associada com a clivagem da prM em proteína M e proteína pr pela ação de protease da furina, enzima presente no Golgi (LINDENBACH; RICE, 2007). Após a clivagem, a proteína pr permanece associado ao vírion no ambiente de pH ácido, que acredita-se ser um mecanismo para prevenir fusão do vírus no TNG (YU *et al.*, 2009).

A glicoproteína E é a maior proteína estrutural ancorada no envelope, atua como hemaglutinina viral e é o principal componente antigênico do DENV, o qual distingue os quatro sorotipos entre si. Ela é o principal alvo da imunidade humoral, mediada por anticorpos neutralizantes, bem como da resposta imune celular mediada por linfócitos T. Contudo, os anticorpos anti-E são predominantemente de reação cruzada aos sorotipos heterólogos do DENV (BELTRAMELLO *et al.*, 2010; DE ALWIS *et al.*, 2011), e estão relacionados com a Amplificação Dependente de Anticorpo (ADA). Este processo tem sido associado ao aumento da carga viral e a maior incidência de casos mais graves da doença em infecções secundárias (GONCALVEZ *et al.*, 2007; BELTRAMELLO *et al.*, 2010; ROTHMAN, 2011). A proteína E desempenha um papel fundamental no processo de replicação e maturação do vírus, uma vez que está envolvida na adsorção do vírus ao receptor da célula hospedeira, na entrada por fusão do envelope do vírus com a membrana do endossoma formado a partir da membrana citoplasmática da célula e na montagem da partícula viral (MODIS *et al.*, 2004; HEINZ; STIASNY, 2012). A proteína E apresenta três domínios denominados EDI, EDII e EDIII (MODIS *et al.*, 2003; MODIS *et al.*, 2004; MODIS *et al.*, 2005) (figura 4).

O EDI é a estrutura central, enquanto o EDII apresenta o peptídeo de fusão que está diretamente envolvido com a fusão das partículas virais às membranas celulares das vesículas endocíticas, durante a entrada do vírus. O EDIII, tipo imunoglobulina, está exposto na superfície do DENV e contém epítomos e motivos de ligação na superfície celular (ZHANG *et al.*, 2004; MONDOTTE *et al.*, 2007). Este domínio da proteína E é o que vai interagir com o receptor na superfície da célula alvo para iniciar o ciclo da replicação viral.

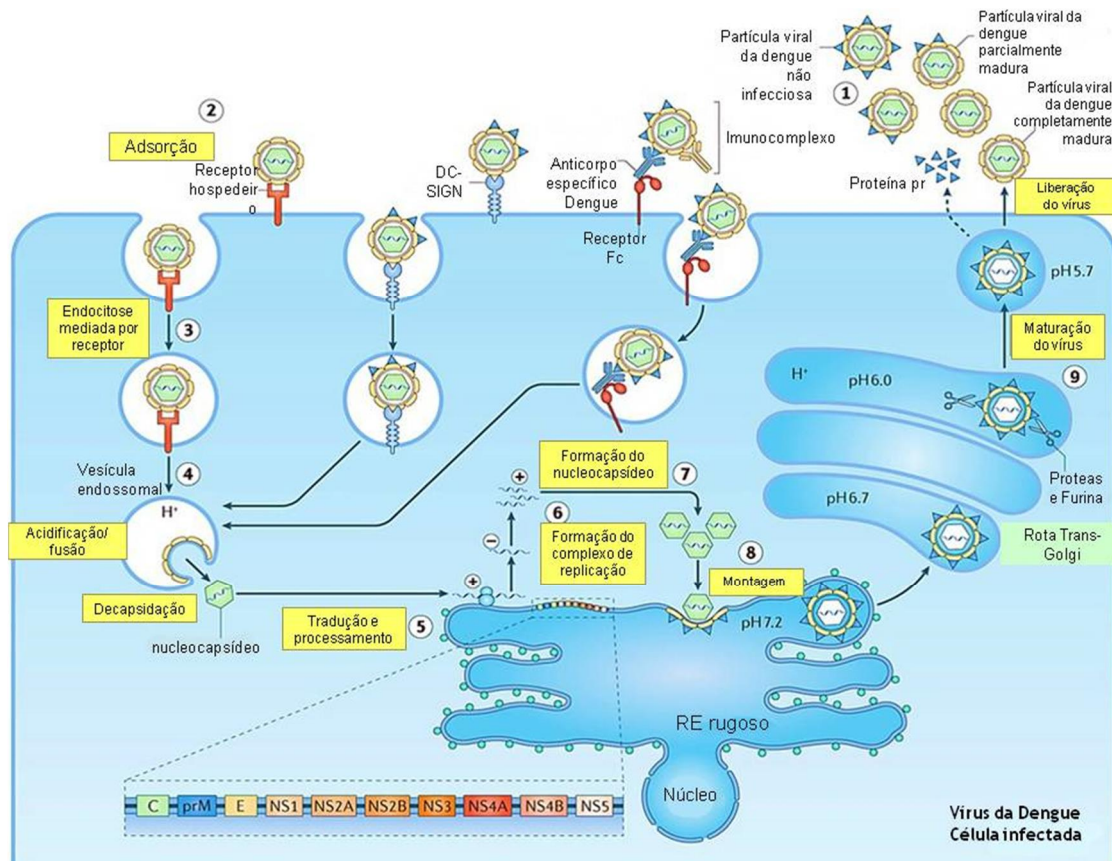


**Figura 4.** (A) Estrutura da superfície do vírus maduro formada por 90 dímeros da proteína E. (B) vista superior da proteína E, com o DI em vermelho, o DII em amarelo e o DIII em azul, o peptídeo de fusão em cinza. (C) vista lateral da proteína E, com os três domínios representados nas mesmas cores da figura anterior. Adaptado de HEINZ; STIASNY, 2012.

## 1.6. Ciclo de replicação viral

O ciclo de replicação do DENV começa com a interação entre a glicoproteína E de superfície de partículas virais maduras (figura 5 . etapa 1) e moléculas de adesão/receptores na superfície das células hospedeiras (figura 5 . etapa 2). Em geral, os fatores de adesão na superfície das células são responsáveis pelo primeiro contato com o vírus. Esta ligação ocorre de maneira inespecífica, concentrando o vírus na superfície das células e facilitando a sua ligação com receptores específicos que promovem a entrada deles nas células alvo (GROVE; MARSH, 2011). Embora os receptores celulares necessários para a infecção viral ainda não estejam bem caracterizados, alguns candidatos já foram propostos, como por exemplo, os proteoglicanos de heparan sulfato, as lectinas do tipo C DC-SIGN (moléculas de adesão de células dendríticas), os receptores de manose dos macrófagos, o receptor CD14 de lipopolissacarídeos (CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015) e os membros das famílias dos receptores TIM e TAM (MEERTENS *et al.*, 2012). Isto demonstra que o DENV não usa um único receptor específico para sua entrada na célula, mas

que ele reconhece e se liga a diversas moléculas possivelmente de uma maneira sorotipo-específica, estando de acordo com o amplo número de células que são suscetíveis à infecção. Dessa forma, o DENV pode se ligar e entrar em várias células do hospedeiro usando um painel de moléculas. Isto sugere que o vírus pode ter evoluído para ser inespecífico, e poder infectar uma maior variedade de alvos celulares ou órgãos (CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2014). Além desses receptores, o vírus utiliza os receptores  $Fc\gamma$  ( $Fc\gamma R$ ) para potencializar sua entrada e replicação nos monócitos e macrófagos. A penetração via  $Fc\gamma R$  ocorre nas infecções secundárias, quando anticorpos heterólogos anti-dengue pré-existentes, da classe IgG, não neutralizantes, opsonizam o vírus, formando imunocomplexos, os quais são endocitados pelas células, via  $Fc\gamma R$  o que aumenta a infectividade das partículas virais, tanto maduras como imaturas (MURPHY; WHITEHEAD, 2011; GUZMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013).



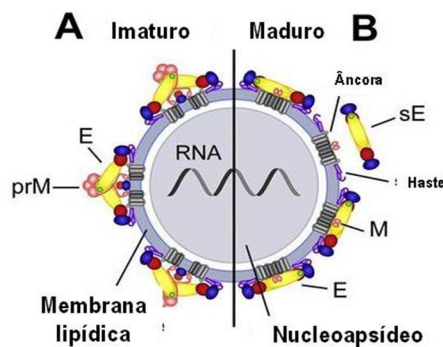
**Figura 5.** Esquema das etapas do ciclo de replicação do vírus dengue. (etapa 1) Partículas virais maduras e partículas virais parcialmente maduras infecciosas; (etapa 2) Adsorção do vírus à receptores da célula hospedeira; (etapa 3) Endocitose mediada pelo receptor; (etapa 4) Fusão dependente da acidificação do endossoma, liberação do capsídeo e do RNA viral no citoplasma; (etapa 5) Tradução e processamento da poliproteína viral; (etapa 6) Formação do complexo de replicação viral e replicação do genoma viral; (etapa 7) Empacotamento do RNA viral recém sintetizado pelas proteínas do capsídeo (C), formando o nucleocapsídeo; (etapa 8) Montagem das partículas virais imaturas no lúmen do RE; (etapa 9) Partículas virais imaturas são transportadas pela rota secretora do *trans*-Golgi, onde acidificação expõe o sítio de clivagem da proteína prM à protease furina, fazendo com que a proteína pr permaneça associada ao vírus até sua liberação para o meio extracelular. Adaptado de SCREATON *et al.*, 2015.

Após reconhecimento do DENV pelos receptores celulares, as partículas virais são internalizadas em vesículas endocíticas (figura 5 . etapa 3), por diferentes rotas, que incluem a endocitose mediada por clatrina e a via endocítica independente de clatrina. A rota de entrada do vírus vai depender da célula hospedeira, do sorotipo do vírus e também de fatores tais como, a maturação das partículas virais e do reconhecimento de imunocomplexos por receptores Fc $\gamma$  (CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2014). No interior da vesícula endocítica, a proteína E do envelope viral sofre uma série de alterações

conformacionais, induzidas pelo pH ácido (6,2 a 5,1), que expõe o peptídeo de fusão, culminando com a fusão da membrana interna do endossoma com o envelope viral (MODIS *et al.*, 2004).

No momento da fusão, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e o RNA viral é desnudado (figura 5 . etapa 4). Uma vez liberado no citoplasma, o RNA viral é direcionado para o retículo endoplasmático rugoso (RER), onde é traduzido em uma única poliproteína que é processada por proteases virais e do hospedeiro, dando origem as proteínas estruturais e não estruturais do vírus (figura 5 . etapa 5). Paralelamente, a RNA polimerase viral dependente de RNA (NS5), juntamente com proteínas virais e celulares formam o complexo de replicação que encontra-se ancorado na face externa das membranas do RER (figura 5 . etapa 6). Esse complexo gera cópias de RNA de polaridade negativa, a partir do genoma viral, que serve como molde para a síntese de RNA de polaridade positiva (MULLER; YOUNG, 2013). Após a replicação, o genoma viral interage com a proteína do capsídeo (C), formando o nucleocapsídeo e é direcionado para as membranas do RER (Figura 5 . etapa 7), de onde os vírus brotam para dentro do *lúmen*, envolvidos por uma bicamada lipídica, onde estão inseridos heterodímeros das proteínas prM/E, resultando em partículas virais imaturas (figura 5 . etapa 8).

Estes vírus imaturos são transportados através de vesículas até o Complexo de Golgi, seguindo a rota secretora do *trans*-Golgi, onde ocorre a clivagem da proteína prM em M, e a glicosilação da proteína E, resultando na maturação dos vírions (ZHANG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2009; ZHENG; UMASHANKAR; KIELIAN, 2010). Inicialmente, a acidificação da vesícula induz mudanças conformacionais nos vírus, expondo sítios de clivagem para a ação da furina, uma endoprotease do hospedeiro que cliva entre a proteína pr e M, gerando a proteína M e a proteína pr (ZHANG *et al.*, 2003). A proteína pr permanece associada à partícula viral até que ela seja liberada para o meio extracelular (figura 5 . etapa 9). A partir da liberação do vírus da célula hospedeira, a proteína pr se dissocia e se forma a partícula viral madura infectante que tem uma estrutura regular (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010; SCREATON *et al.*, 2015) (figura 6 B).



**Figure 6.** Representação esquemática do vírus dengue. (A) vírus imaturo; (B) vírus maduro. Adaptado de HEINZ; STIASNY, 2012.

Curiosamente, células infectadas com DENV liberam partículas virais imaturas resultantes da clivagem parcial da prM (figura 6A) (VAN DER SCHAAR *et al.*, 2007; ZYBERT *et al.*, 2008). Embora estas partículas de DENV sejam menos infecciosas, a resposta de anticorpos para prM é maior em pacientes com infecção secundária do que naqueles com infecção primária (LAI *et al.*, 2008). Além disso, alguns anticorpos anti-prM não neutralizantes apresentam reação cruzada contra outros sorotipos DENV (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2010), o que tornam estes vírus altamente infecciosos quando interagem com o anticorpo anti-prM, facilitando a ligação e a entrada do vírus imaturo via Fc $\gamma$ R expresso na membrana das células hospedeiras (HUANG *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2006; RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010). Neste contexto, a produção de partículas virais imaturas pode ser interpretada como uma estratégia de evasão imune do vírus, uma vez que a presença da proteína prM, reduz o acesso dos anticorpos protetores aos antígenos de superfície viral que estariam disponíveis para a sua neutralização. Dessa forma, o anticorpo anti-prM facilita a entrada do vírus e exacerba a infecção (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2010)

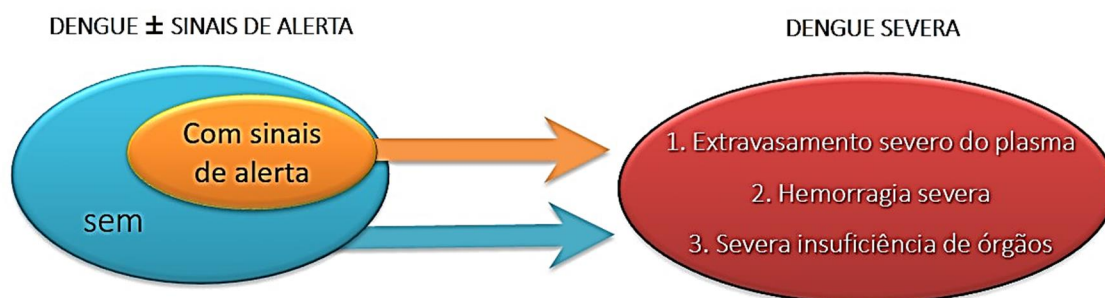
Após a exocitose das partículas virais maduras ou imaturas para o meio extracelular, elas caem na corrente sanguínea e se disseminam pelo organismo, onde irão estabelecer a infecção viral que poderá se expressar por meio de um amplo espectro clínico.

## 1.7. Dengue: Sintomas

A infecção pelo vírus dengue pode se manifestar por um amplo espectro clínico que varia desde formas assintomáticas ou subclínicas, a uma doença febril aguda autolimitada, conhecida como dengue, até as formas graves da doença que podem até culminar na morte do paciente. Geralmente, as formas mais severas ocorrem mais comumente em áreas hiperendêmicas, onde há múltiplos sorotipos do DENV circulando (JULANDER; PERRY; SHRESTA, 2011).

Muitas infecções pelo vírus da dengue ocorrem na forma assintomática, já outras podem se apresentar de forma oligossintomática com manifestações clínicas brandas, de difícil diagnóstico clínico (DIETZ *et al.*, 1990; DA CUNHA *et al.*, 1995). Essas formas representam a maioria dos casos de infecção por DENV, entretanto, uma minoria evolui para formas com maior expressão clínica (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015).

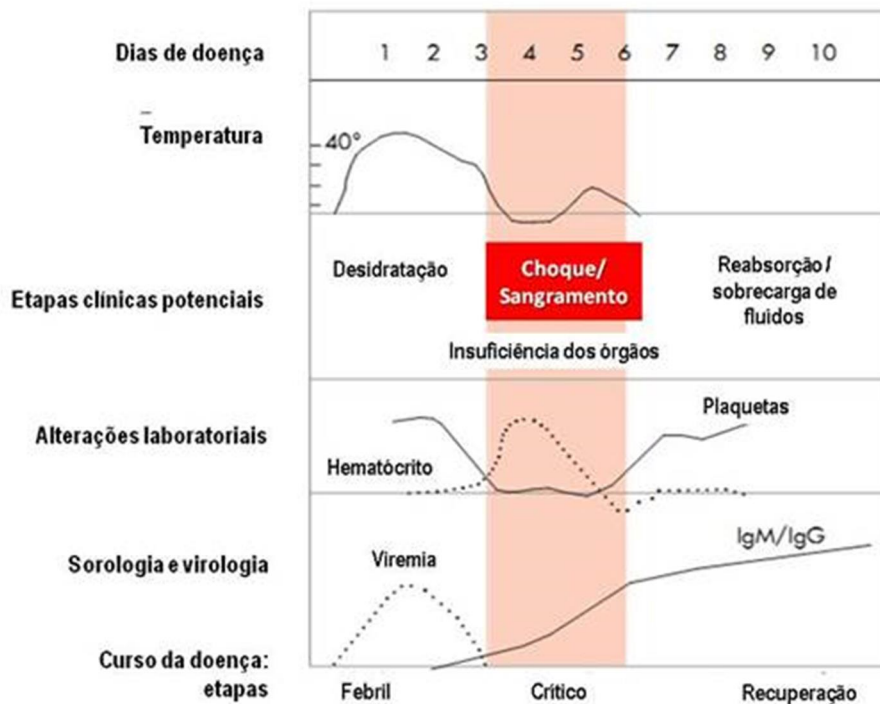
Por décadas, a dengue foi classificada clinicamente em duas formas distintas: a dengue clássica, ou a febre do dengue, e a dengue hemorrágica, ou febre hemorrágica do dengue. Contudo, devido à dinâmica e a complexidade de evolução dos casos de dengue, a doença passou por uma nova classificação. Em 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reviu o esquema de classificação da doença, passando a identificar os pacientes nas seguintes categorias: dengue sem sinais de alerta, dengue com sinais de alerta e dengue severa (WHO, 2009) (Figura 7).



**Figura 7.** Sugestão de classificação de casos e níveis de severidade. Adaptado de WHO, 2009.

Na forma clínica da dengue, os sintomas aparecem após um período de incubação de 3 a 7 dias, surgindo abruptamente e seguem três fases: uma fase

inicial febril, uma fase crítica durante a defervescência e uma fase de recuperação (SIMMONS *et al.*, 2012) (figura 8).



**Figura 8.** Principais etapas e manifestações durante o curso clínico da dengue. Adaptado de WHO, 2009.

Na etapa febril, a doença caracteriza-se por uma febre alta de início abrupto, cefaléia, dor retroorbitária, mialgia e artralgia, prostração, anorexia, náusea, vômitos, exantemas e prurido cutâneo (WHO, 1997). Nessa fase também pode ocorrer alguns fenômenos hemorrágicos sem maiores conseqüências na pele (petéquias), em gengivas (gengivorragias) e em narinas (epistaxes) (KALAYANAROOJ *et al.*, 1997). Os sangramentos cutâneos espontâneos ou provocados pela prova do laço apresentam importância clínica, contudo, não tem valor prognóstico e nem pode ser considerado como sinal de alerta (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Essas manifestações clínicas caracterizam a dengue sem sinais de alerta. Nessa forma, a doença geralmente é autolimitada, dura de cinco a sete dias, contudo a prostração pode persistir por dias a semanas após o desaparecimento da febre (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Com a defervescência, a maioria dos pacientes

melhora, contudo, uma pequena parcela, geralmente crianças e adultos jovens, vão manifestar os sinais de alerta (SIMMONS *et al.*, 2012).

Para os pacientes que não apresentam melhora do quadro, a queda da febre, em geral, marca o início da fase crítica da dengue, a qual se traduz pelo agravamento do quadro clínico, caracterizando a dengue com sinais de alerta (MARTINEZ, 2008; WHO, 2009). Nessa fase é evidenciado extravasamento de plasma para o espaço extravascular, resultante do aumento da permeabilidade vascular, razão pela qual se deve iniciar de imediato a reposição hidroeletrólítica a fim de regular o equilíbrio do organismo do paciente. Entre os sinais de alerta estão os derrames cavitários (na pleura, no pericárdio e no peritônio), dor abdominal intensa e contínua, elevação do hematócrito, diminuição da contagem de plaquetas, hepatomegalia, sangramento de mucosas e vômitos persistentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016b). Os casos de dengue com sinais de alerta, geralmente têm bom prognóstico, quando diagnosticados e tratados precocemente e o paciente se recupera após hidratação intravenosa (WHO, 2009; WHO, 2012), caracterizando a etapa de recuperação (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2010)

Na fase de convalescença, a permeabilidade vascular alterada é de curta duração, revertendo espontaneamente para o nível normal depois de cerca de 48 a 72 horas, e é concomitante com a melhora dos sintomas do paciente, retorno do apetite, abrandamento dos sintomas gastrointestinais e o aumento da diurese. Durante a fase de recuperação, uma segunda leva de erupções podem aparecer, que vão desde uma erupção maculopapular leve a grave, e também podem ocorrer lesões pruriginosas (SIMMONS *et al.*, 2012).

Lamentavelmente, alguns pacientes não evoluem de forma satisfatória e apresentam complicações do quadro clínico e desenvolvem a dengue severa (WHO, 2012). Um caso de dengue severa é definido pela presença dos seguintes critérios: choque causado por extravasamento plasmático, acúmulo de líquido seroso, suficiente para provocar dificuldade respiratória, ou ambos; hemorragia grave e comprometimento grave dos órgãos (coração, pulmões, rins, fígado e o sistema nervoso central (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016b).

## 1.8. Patogênese

Os mecanismos que levam as manifestações severas da dengue ainda não são completamente compreendidos, contudo eles são multifatoriais. Entre os elementos associados ao risco de desenvolver as formas graves da doença devem-se considerar os fatores ligados ao vírus e ao hospedeiro (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

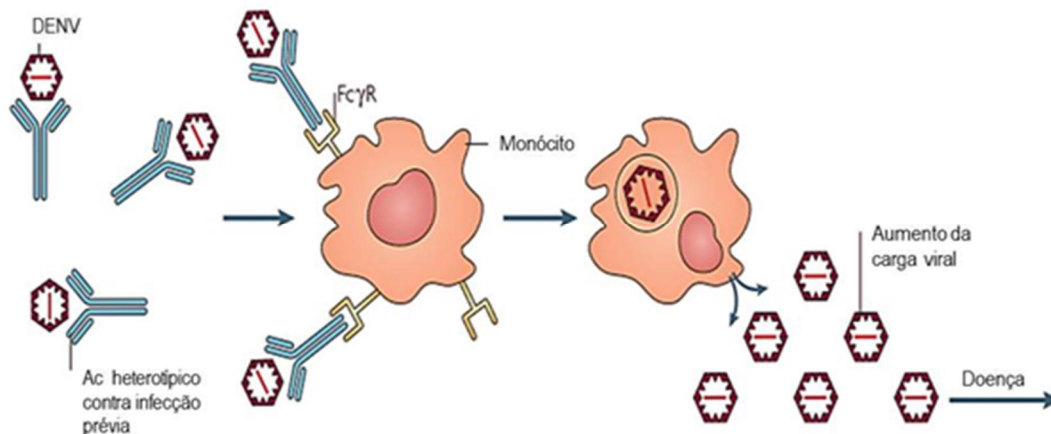
A hipótese da virulência viral postula que determinados genótipos do vírus podem desempenhar um papel importante na patogênese da infecção por DENV, uma vez que algumas linhagens do vírus são mais virulentas, sendo responsáveis por doenças mais severas. Essa hipótese pode ser evidenciada pelo surto de febre hemorrágica do dengue observada nas Américas, pela introdução de uma cepa mais virulenta do DENV-2 (RICO-HESSE *et al.*, 1997; MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Entre os fatores do hospedeiro associados à gravidade da doença pode-se listar a idade, o estado nutricional e fatores genéticos (MATHEW; ROTHMAN, 2008; JULANDER; PERRY; SHRESTA, 2011).

Dentre os fatores genéticos relacionados à suscetibilidade às formas graves da doença, alguns estudos estabelecem uma associação entre alelos HLA de classe I e II, polimorfismo nos genes do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), receptor Fc $\gamma$ , receptor de vitamina D, CTLA-4, e fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Geralmente as formas mais graves da dengue surgem com maior frequência nas infecções secundárias (HALSTEAD; DEEN, 2002), isso ocorre quando o indivíduo é infectado por um sorotipo diferente daquele que causou a infecção primária. Uma possível explicação para este evento é a teoria do aumento da replicação viral mediada por anticorpos, conhecida como ADA (Amplificação Dependente de Anticorpo) (LUO *et al.*, 2013). Este fenômeno ocorre porque anticorpos pré-existentes da classe IgG subneutralizantes específicos para as proteínas E e prM, gerados na infecção primária, contra um determinado sorotipo de DENV, reagem cruzadamente com partículas virais do outro sorotipo, numa infecção secundária heterotípica. Dessa forma, a entrada do vírus nas células é facilitada, uma vez que os complexos vírus-anticorpos (IgG) não neutralizantes são internalizados nas células dendríticas e

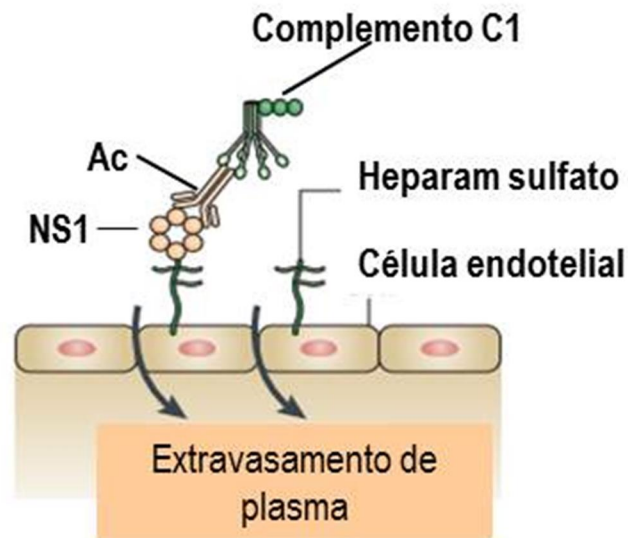
macrófagos via receptores  $Fc\gamma$  ( $Fc\gamma R$ ), havendo, portanto, a potencialização da entrada e replicação dos vírus. Isso resulta num aumento do número total de células infectadas e na quantidade de vírus produzido, o que está associado às formas graves da doença (MURPHY; WHITEHEAD, 2011; GUZMAN *et al*, 2013) (figura 9).



**Figura 9.** Modelo da amplificação da replicação viral mediada por anticorpos heterotípicos pré-existentes que podem reagir de forma cruzada com outro sorotipo do DENV. Adaptado de WHITEHEAD *et al.*, 2007.

Em áreas endêmicas, o risco de febre hemorrágica da dengue aumenta com a diminuição da idade, especialmente em crianças com 6 a 12 meses. Isso está associado à transferência transplacentária de anticorpos heterólogos IgG maternos não neutralizantes, com especificidade diferente daquele sorotipo de DENV adquirido pelo filho (LIBRATY *et al.*, 2009)

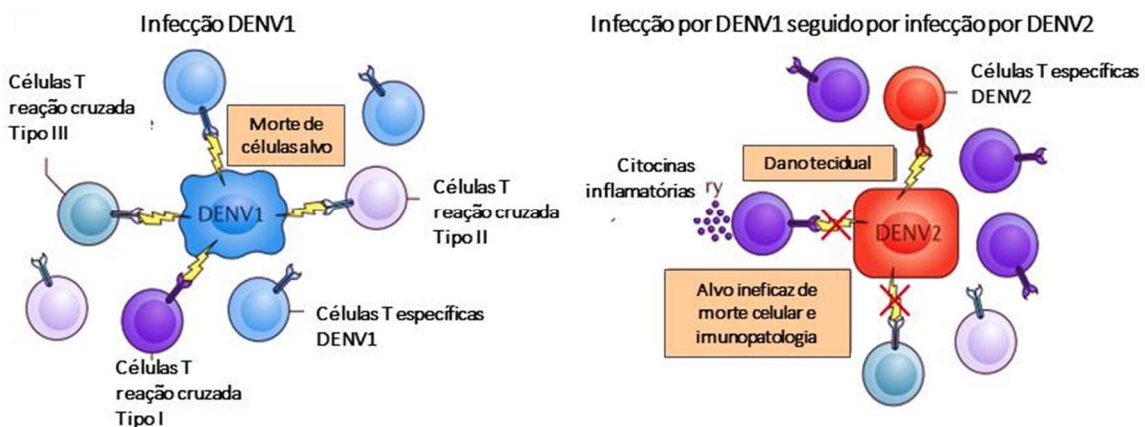
Além da ADA, os anticorpos podem também contribuir para a gravidade da doença através da interação entre anticorpos e proteínas NS1. Por exemplo, durante a infecção, as proteínas NS1 solúveis podem interagir com o heparan sulfato, o principal componente da camada de glicocálix endotelial, que regula a permeabilidade capilar. O reconhecimento subsequente da proteína NS1 por anticorpos específicos pode ativar a via clássica do sistema complemento, resultando na formação das anafilatoxinas C3a e C5a e do complexo terminal do complemento C5b. C9 que estão relacionadas com o extravasamento de plasma (AVIRUTNAN *et al.*, 2006) (figura 10).



**Figura 10.** Interação entre o NS1 solúvel e o heparan sulfato expresso no endotélio, seguida da ligação do anticorpo, culminando na ativação do sistema complemento, o qual irá gerar anafilatoxinas e fatores quimiotáticos, os quais podem contribuir para o extravasamento de plasma. Adaptado de Sreaton *et al.*, 2015.

Além da teoria do aumento da replicação viral mediada por anticorpos (ADA), existe também a teoria do ~~pecado~~ <sup>pecado</sup> antigênico original, que está relacionada a uma resposta imune celular, mediada por linfócitos T de memória gerados em uma infecção primária que são ativados preferencialmente na infecção secundária em detrimento de células T virgens (SCREATON *et al.*, 2015). Nesta situação, algumas células T de memória, específicas para o sorotipo da infecção primária, que apresentam baixa afinidade para o sorotipo heterólogo (infecção secundária), geram uma resposta imune citotóxica ineficiente, caracterizada pela redução da lise das células infectadas, uma vez que estes linfócitos não secretam perforinas e granzimas, mediadores necessários para que ocorra a eliminação dos vírus (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003; DUANGCHINDA *et al.*, 2010; SCREATON *et al.*, 2015). Como consequência dessa capacidade diminuída de matar as células infectadas pelo vírus ocorre o aumento da carga viral. Por outro lado, verifica-se também que uma elevada proporção de células T secretam uma tempestade de citocinas, que é caracterizada por altos níveis circulantes de muitos mediadores pró-inflamatórios tais como o fator de necrose tumoral (TNF), receptor de TNF solúvel 1 (TNFR1), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), ligante de quimiocina CXC-8 (CXCL8),

CXCL9, CXCL10, CXCL11, ligante 5 de CC-quimiocinas (CCL5) e do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF), bem como a citocina anti-inflamatória interleucina-10 (IL-10) (ROTMAN, 2011; SCREATON *et al.*, 2015). Esta tempestade de citocinas tem sido associada ao desencadeamento do aumento da permeabilidade vascular que se resolve de forma relativamente rápida no período de convalescença do paciente (SCREATON *et al.*, 2015) (figura 11)



**Figura 11.** Fenômeno de pecado antigênico original mediado pela ativação das células T memória numa infecção secundária por um sorotipo diferente daquele que causou a infecção primária. Três tipos de células T de reação cruzada são ilustrados: tipo I produzem apenas citocinas inflamatórias durante a infecção secundária, o tipo II pode desgranular e potencialmente matar de forma eficaz as células alvo infectadas por DENV2 e células T tipo III com reatividade cruzada de baixa avidéz que podem reconhecer células infectadas por DENV2, mas não induzem uma resposta. Se houver elevada proporção de células T tipo I haverá uma tempestade de citocinas inflamatórias que podem predispor a forma grave da doença. Adaptado de SCREATON *et al.*, 2015.

Considerando a complexidade da patogenia da dengue e que a resposta imune está implicada tanto na defesa contra o vírus, como na gravidade da doença, torna-se um grande desafio para a comunidade científica, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra os quatro sorotipos do DENV.

### 1.9. Vacina

Ao contrário dos programas de vacinação contra outros flavivírus, como por exemplo, o vírus da febre amarela, o vírus da encefalite japonesa e o vírus da encefalite do carrapato, até o momento, ainda não existe nenhuma vacina licenciada contra a dengue (PIERSON; DIAMOND, 2014; GUY; JACKSON,

2016). Apesar de mais de 70 anos de pesquisa, existem vários obstáculos a serem vencidos para a obtenção de uma vacina segura e efetiva contra a dengue. Um dos grandes desafios está no desenvolvimento de uma vacina tetravalente, que confira proteção simultânea, equivalente e de longa duração contra os 04 sorotipos do DENV (BÄCK; LUNDKVIST, 2013; GUZMAN; HARRIS, 2015; HERMANN *et al.*, 2015). Essa característica visa evitar a evolução para as formas severas da doença a febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome do choque da dengue (SCD já que existe esse fator de risco causado pela sensibilização imunológica contra os sorotipos diferentes daquele que induziu a resposta imune primária (WHO, 1997). Sendo assim, a vacina não pode predispor as pessoas imunizadas à intensificação da infecção viral dependente de anticorpo (ADA) (PIERSON; DIAMOND, 2014).

Até o momento, várias tecnologias têm sido adotadas para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue, incluindo vacinas de vírus atenuados, vacinas inativadas purificadas, subunidades recombinantes, partículas semelhantes a vírus (VLP), e vacinas de vetor plasmidial ou viral (CHMITZ *et al.*, 2011; THOMAS, 2014;). Atualmente, seis candidatas encontram-se em fase de ensaio clínico (HERMANN *et al.*, 2015). Dessas, a que está em estágio mais avançado, é a vacina quimérica dengue febre amarela (CYD-TDV), desenvolvida pelo laboratório francês Sanofi Pasteur. Essa vacina é tetravalente (vacina dengue tetravalente - VTD), composta por 4 cepas recombinantes atenuadas do DENV, que expressam os genes das proteínas pré-membrana (prM) e do envelope e tem como base, a cepa da vacina 17D contra a febre amarela (YF17D) (GUY *et al.*, 2010; GUY; JACKSON, 2016). Os resultados da eficácia dessa vacina variam de 56 a 64%, sendo a melhor opção atualmente. Contudo, ela ou qualquer outra vacina contra dengue, nunca poderá ser considerada a única solução de combate à dengue, dada a sua complexidade (WILDER-SMITH, 2004). Nesse sentido, o investimento para o desenvolvimento de outras estratégias inovadoras, como por exemplo, os antivirais, devem ser incentivados.

Para que a vacina contra a dengue seja considerada eficaz, ela deve: (i) ser protetora sem ser reatogênica, (ii) conferir imunidade contra os quatro sorotipos do vírus da dengue, por causa do risco de ADA, (iii) ser segura especialmente para as crianças, uma vez que, a maioria das infecções graves

pelo vírus da dengue ocorrem em crianças pequenas, (iv) ser econômica, com um número mínimo de imunizações ou nenhuma repetição, visto que a dengue é endêmica em muitos países em desenvolvimento e (v) induzir uma resposta imunitária protetora de longa duração (WHITEHEAD *et al.*, 2007; MURPHY; WHITEHEAD, 2011; GUZMAN; HARRIS, 2015).

Mesmo considerando que a vacina seja a melhor forma de prevenção em massa contra uma doença infecciosa, o investimento para o desenvolvimento de fármacos contra o vírus da dengue se faz necessário, pois uma série de fatores que alicerçam essa necessidade devem ser considerados. Por exemplo, atualmente, a vacina que se encontra em nível mais avançado de desenvolvimento contra a dengue confere eficácia apenas parcialmente contra o vírus (GUY; JACKSON, 2016). Além disso, deve-se levar em conta o custo da vacina e como seria a disponibilização dela para a população, visto que ela deve abranger o maior número possível de indivíduos, a fim de interromper a circulação do vírus nas áreas endêmicas. Há de se considerar também o deslocamento de pessoas não imunizadas para estas áreas, que se tornam alvos de infecção. Neste sentido, a vacina contra dengue, nunca poderá ser vista como uma única solução de combate à doença, portanto, deve-se considerar que esta lacuna pode ser minimizada com o uso de fármacos antivirais.

### **1.10. Antivirais**

Atualmente, cinquenta fármacos antivirais que agem especificamente contra os vírus, denominados de agentes antivirais diretos (AAD), já foram aprovados pelo Órgão Norte-Americano de Controle Sobre Produtos Farmacêuticos - FDA (Food and Drug Administration). Vinte e seis deles são dirigidas contra o HIV, os outros alvos são os vírus da hepatite B e C, diferentes vírus herpes e vírus influenza (MARTINEZ *et al.*, 2015). Esses fármacos atuam diretamente contra componentes do vírus, incluindo as proteínas e o genoma viral. Na maioria dos casos, elas agem sobre polimerases e proteases virais, no entanto, as etapas de entrada e saída dos vírus ou integração cromossômica de retrovírus são também pontos de interferência delas.

Até o momento, a FDA não aprovou nenhum medicamento contra a dengue. Dessa forma, o tratamento é apenas de suporte e limitado ao manejo de fluido durante o período de extravasamento de plasma (WHO, 2009; BHATT *et al.*, 2013).

Várias são as dificuldades para o desenvolvimento de um fármaco antiviral, dentre elas deve-se destacar o elevado custo, o longo tempo de investigação, uma vez que o processo de pesquisa envolve múltiplas etapas e especificamente no caso da dengue, a falta de um bom modelo animal que possa ser utilizado para a realização dos testes antivirais, o que dificulta ainda mais a obtenção desse fármaco (NOBLE *et al.*, 2010). Além desses fatores, um dos grandes obstáculos está relacionado ao fato de que o fármaco antiviral deve bloquear a replicação do vírus sem afetar a célula hospedeira, aspecto difícil de eliminar, uma vez que os vírus são patógenos intracelulares obrigatórios, cujo ciclo de replicação é dependente do metabolismo da célula infectada. Esta limitação está diretamente associada ao fato da ausência de seletividade, uma vez que, a droga pode afetar simultaneamente o vírus e a célula hospedeira. Desta forma, o fármaco antiviral deve inibir seletivamente diferentes funções virais, sem afetar as funções celulares. Aliado a esse fator, deve-se considerar a toxicidade do antiviral, bem como a emergência de cepas virais resistentes aos fármacos (GHOSH *et al.*, 2009; MARTINEZ *et al.*, 2015).

Apesar das dificuldades, várias pesquisas estão em andamento na busca de fontes que possam fornecer compostos antivirais que atuem sobre alvos moleculares no vírus e/ou no hospedeiro, que sejam capazes de agir diretamente sobre uma etapa do processo de replicação do vírus (NOBLE *et al.*, 2010; LIM *et al.*, 2013).

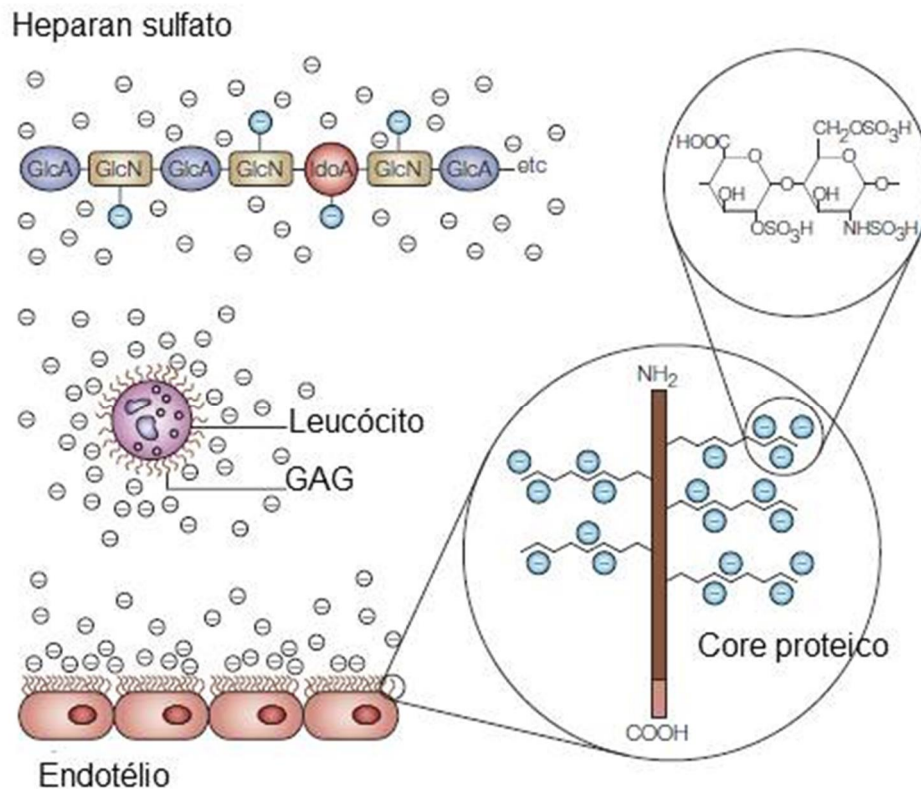
Nessa perspectiva, a etapa inicial da infecção que corresponde a entrada do DENV na célula hospedeira é um alvo atraente para a obtenção de antivirais específicos. Uma vantagem dessas moléculas é que elas podem exercer os seus efeitos sem ter que entrar nas células. Além disso, o bloqueio da entrada do vírus irá potencialmente limitar a viremia, bem como a hiperativação do sistema imune, resultando na prevenção da dengue grave e reduzindo também a transmissão do vírus dengue (DE LA GUARDIA; LLEONART, 2014 ; CASTILLA; PICCINI; DAMONTE, 2015).

Diferentes abordagens têm sido empregadas para identificar inibidores de entrada do DENV na célula hospedeira, incluindo o rastreamento de moléculas naturais que possam interagir tanto com os receptores celulares como com a proteína E do envelope viral. A vantagem das moléculas que têm como alvo os componentes virais é que elas atuam como inibidores mais específicos e seletivos (ALEN; SCHOLS, 2012; HIDARI; ABE; SUZUKI, 2013) (DE LA GUARDIA; LLEONART, 2014; CASTILLA; PICCINI; DAMONTE, 2015).

A entrada do DENV na célula hospedeira é mediada pela interação da proteína E com diferentes possíveis moléculas receptoras do vírus, expressas na superfície celular, dentre elas o heparam sulfato, um polissacarídeo sulfatado, que constitui uma das primeiras moléculas de adesão envolvidas na adsorção viral (HUNG *et al.*, 2004; CRUZ-OLIVEIRA *et al.*, 2015). Vários estudos relatam o papel de diferentes poliânions que atuam como inibidores de entrada dos vírus, dentre eles vários polissacarídeos sulfatados, que ao mimetizarem o heparam sulfato, exercem sua atividade antiviral contra HIV, HSV, citomegalovírus e o vírus da estomatite vesicular (BABA *et al.*, 1988; LÜSCHER-MATTLI, 2000).

### **1.11. Heparan sulfato: receptor para o vírus dengue**

O heparan sulfato (HS) pertence à família dos glicosaminoglicanos (GAGs) e são ubiquamente expressos na superfície de diferentes tipos de células animais e na matriz extracelular como componente dos proteoglicanos (PGs), os quais consistem de um core proteico e cadeias laterais de polissacarídeos de HS (LIU; THORP, 2002; ZHU; LI; LIANG, 2011) (figura 12).



**Figura 12.** Representação esquemática do GAG heparan sulfato. O HS consiste de unidades de glucosamina (GlcN) com ácido glucurônico (GlcA) ou ácido idurônico (IdoA) alternada com grupos sulfato (ilustrado por círculos azuis). As cadeias de GAG de HS são componentes de proteoglicanos expressos nas superfícies das células. Adaptado de LEVER; PAGE, 2002.

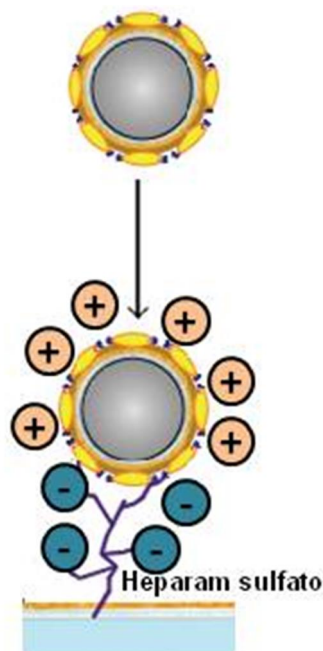
O HS é um polímero linear composto por unidades dissacarídicas repetidas de ácido glucurônico ou idurônico e D-glicosamina, unidas por ligação  $\alpha(1\rightarrow4)$ , cujas unidades são sulfatadas em diferentes posições (LIU; THORP, 2002; KREUGER *et al.*, 2006). (Figura 12).

Adicionalmente, este polímero apresenta um número considerável de cargas negativas sob condições fisiológicas. Esses grupos carregados negativamente proporcionam sítios de ancoragem para os vírus nas células alvo, que são reconhecidos pelas proteínas virais que apresentam cargas positivas (LIU; THORP, 2002). Além disso, as sequências de monossacarídeo do HS nos diferentes tecidos são distintas (NADER *et al.*, 1999). Tal variabilidade estrutural pode desempenhar um importante papel no tropismo tecidual durante a infecção viral (HEROLD *et al.*, 1996; LIU; THORP, 2002).

Alguns estudos demonstram que o HS atua como receptor de adesão para diferentes vírus, como por exemplo, o HIV, HSV, HBV e o DENV, favorecendo dessa forma a infecção e a patogênese viral (WUDUNN; SPEAR,

1989; RODERIQUEZ *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 1997; SCHULZE; GRIPON; URBAN, 2007; ZHU; LI; LIANG, 2011).

A participação do HS na fixação do DENV já foi demonstrada em diferentes linhagens celulares tal como as células VERO, BHK e CHO (CHEN *et al.*, 1997; GERMI *et al.*, 2002; MARTÍNEZ-BARRAGÁN; DEL ANGEL, 2001), bem como em hepatócitos humanos (HILGARD; STOCKERT, 2000) e células endoteliais (DALRYMPLE; MACKOW, 2011) (figura 13).

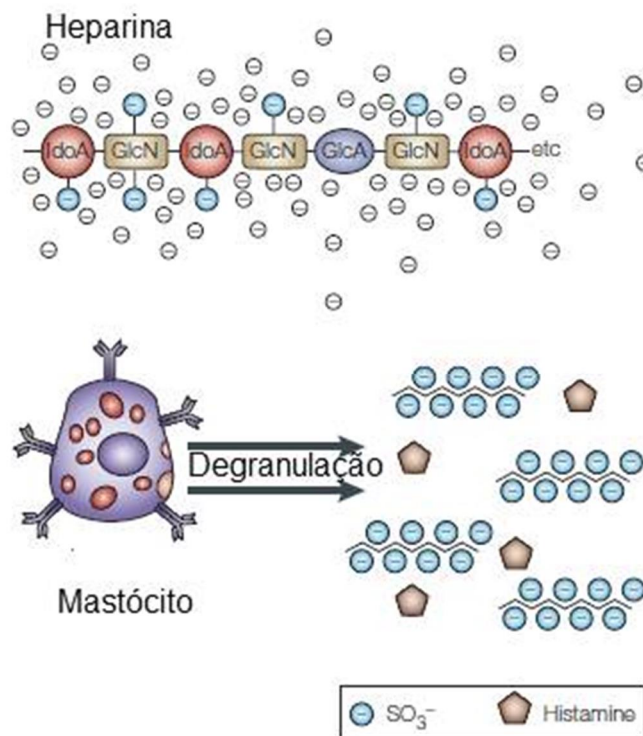


**Figura 13.** Representação esquemática da interação do DENV com o heparan sulfato da membrana celular. Adaptado de DE LA GUARDIA; LLEONART, 2014.

Essa atuação do HS foi validada através de diferentes abordagens experimentais que demonstram a inibição da adsorção/infecção pelo tratamento das células com liases (CHEN *et al.*, 1997; GERMI *et al.*, 2002), pelo uso de anticorpo monoclonal (mAbs), que bloqueia domínios da proteína E, que interagem com heparan sulfato (CRILL; ROEHRIG, 2001) ou pelo uso de compostos que mimetizam o heparan sulfato (LIN *et al.*, 2002; KATO *et al.*, 2010), como por exemplo, a heparina (CHEN *et al.*, 1997; GERMI *et al.*, 2002).

A heparina é também um GAG que apresenta unidades dissacarídicas muito semelhantes ao HS. Contudo, esses biopolímeros diferem sob alguns aspectos, como por exemplo, quanto à localização no organismo. A heparina é encontrada em vesículas dos mastócitos, e do ponto de vista estrutural, ela apresenta um maior número de grupos sulfato e um teor mais elevado de ácido

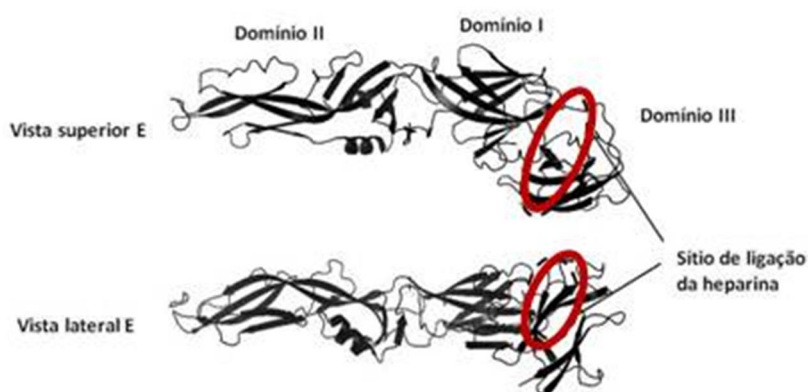
idurônico do que o HS. O dissacarídeo da heparina é formado por *N*-acetil-D-glucosamina ligado por ligação  $-(1 \rightarrow 4)$  com 90% de ácido L-idurônico e 10% de ácido D-glucurônico. Quanto ao grau de sulfatação, a heparina apresenta maior grau de sulfatação (2,3-2,8 sulfatados / dissacarídeo) em relação ao heparan sulfato (0,6-1,5 sulfatos / dissacarídeo) (LIU; THORP, 2002; DREYFUSS *et al.*, 2009) (figura 14).



**Figura 14.** Representação esquemática da heparina. A heparina consiste de unidades de glucosamina (GlcN) com ácido glucurônico (GlcA) ou ácido idurônico (IdoA) alternada com grupos sulfato (ilustrado por círculos azuis). A heparina contém mais IdoA e é mais amplamente sulfatada do que o HS. A Heparina é encontrada nos grânulos dos mastócitos. Adaptado de LEVER; PAGE, 2002.

Dada a sua estrutura, a heparina também apresenta capacidade de se ligar a um grande número de proteínas diferentes, dentre elas as proteínas virais. O primeiro relato de que a heparina possuía propriedades antivirais, data de 1964, cujo trabalho demonstrou que este GAG inibia as etapas iniciais da infecção pelo vírus Herpes simples em cultura de linfócitos, sugerindo que tal efeito estava associado aos grupos sulfatos desta molécula. A partir deste resultado, surgiu a hipótese de que a inibição da interação vírus-heparan-célula estava ocorrendo por um impedimento eletrostático, no qual a heparina estaria impedindo a ligação do vírus à superfície das células (NAHMIAS; KIBRICK, 1964).

O papel da heparina na inibição da etapa inicial da infecção pelo vírus dengue através da sua interação com a proteína de envelope (E) já foi demonstrada por diferentes autores (CHEN *et al.*, 1997; HUNG *et al.*, 1999; GERMI *et al.*, 2002; LIN *et al.*, 2002). O sítio de ligação da heparina está localizado em agrupamentos de aminoácidos básicos no domínio III, provável domínio de ligação da proteína E dos flavivírus ao receptor da célula (CHEN *et al.*, 1997; HIDARI; ABE; SUZUKI, 2013) (figura 15). Recentemente, foi demonstrado que dois resíduos conservados, Lys291 e Lys295, são críticos para a interação entre o GAG e a glicoproteína E (WATTERSON; KOBE; YOUNG, 2012).



**Figura 15.** Estrutura da proteína E com o sítio de ligação da heparina. Adaptado de HIDARI; ABE; SUZUKI, 2013.

Relatos da literatura revelam que diversas substâncias polianiónicas exibem potentes atividades antivirais, essa descoberta impulsionou a investigação dessas moléculas, incluindo os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de um grande número de espécies de algas marinhas. Diversos são os estudos que relatam a atividade antiviral dos polissacarídeos sulfatados obtidos das algas contra importantes vírus envelopados humanos, incluindo o vírus da imunodeficiência humana, o vírus herpes simples, o citomegalovírus, o vírus sincicial respiratório vírus e o vírus da dengue (DAMONTE *et al.*, 2004). Nesse sentido, a investigação desses biopolímeros como alvos terapêuticos, torna-se promissora, visto que eles podem minimizar a infecção antes da adsorção do vírus com a célula e também durante as etapas iniciais do ciclo de replicação viral.

## 1.12. Atividade Antiviral dos Polissacarídeos Sulfatados das Algas

Os polissacarídeos sulfatados (PSs) são biopolímeros formados por unidades monossacarídicas e grupos sulfato [ $OSO_3^-$ ], os quais conferem carga negativa e caráter ácido a essas moléculas. Estes biopolímeros são abundantes nas algas marinhas e apresentam estrutura bastante complexa e heterogênea (POMIN; MOURÃO, 2008), que está relacionada com as várias possibilidades de ligações entre os monossacarídeos e à distribuição de grupos sulfato (ALVES, 2000). Tal complexidade estrutural pode ser verificada entre as espécies e, às vezes, em diferentes partes da mesma alga (DIETRICH *et al.*, 1995), cuja estrutura pode variar também em função da sazonalidade e das condições climáticas, as quais as algas são submetidas (HONYA *et al.*, 1999)

Os polissacarídeos sulfatados são encontrados nos três grandes grupos de algas marinhas, algas vermelhas (Rhodophyta), algas verdes (Chlorophyta) e algas marrons (Phaeophyta). Os principais PSs de algas vermelhas são as galactanas, as quais são classificadas como agaranas e carragenanas. Especificamente as galactanas que apresentam resíduos de alfa-galactose da série L são denominadas de agaranas e aquelas da série D são denominados de carragenanas (KNUTSEN *et al.*, 1994). As carragenanas apresentam diferentes formas e são classificadas de acordo com suas características estruturais, incluindo seu padrão de sulfatação e a presença ou ausência de unidades de D-galactose e anidro-D-galactose (AnGal). Dentre as carragenanas as mais relevantes do ponto de vista industrial são as formas  $\kappa$  (kappa),  $\iota$  (iota) e  $\lambda$  (lambda) (JIAO *et al.*, 2011).

Nas algas verdes os principais PS são heteropolissacarídeos compostos por galactose, xilose, arabinose, manose, ácido glucurônico e/ou glicose (JIAO *et al.*, 2011; NGO; KIM, 2013), também já foram descritos homopolissacarídeos como arabinanas (HAYAKAWA *et al.*, 2000) e galactanas (FARIAS *et al.*, 2008). Algumas espécies do gênero *Codium* são fontes significativas de galactanas sulfatadas, as quais são mais complexas e heterogêneas em sua estrutura do que as encontradas nas algas vermelhas (FARIAS *et al.*, 2008).

As macroalgas marrons são ricas em polissacarídeos sulfatados, denominados de fucanas, cujo principal açúcar é a L-fucose sulfatada. De acordo com a composição dos resíduos de açúcar, as fucanas podem ser

classificadas em homofucanas e heterofucanas (BERTEAU; MULLOY, 2003). As homofucanas contém mais de 90% de L-fucose (ROCHA *et al.*, 2006), enquanto as heterofucanas, além da fucose apresentam pequenas quantidades de outros monossacarídeos, incluindo galactose (ROCHA *et al.*, 2005), manose (DUARTE *et al.*, 2001), xilose (LEITE *et al.*, 1998), ácido urônico (PONCE *et al.*, 2003). As heterofucanas podem também ser denominadas de fucoidan, contudo algumas vezes os termos fucana e fucoidan são usados como sinônimos (ROCHA *et al.*, 2006).

A estrutura das fucanas varia de acordo com a espécie da alga. Porém, elas podem ser divididas em três classes distintas com base no seu comportamento eletroforético, o qual relaciona-se à composição e sequência dos resíduos de açúcar, bem como ao padrão de sulfatação (ROCHA *et al.*, 2006). Em 1995, Dietrich e colaboradores, estudando a alga marrom *Dictyota mertensii* demonstraram que ela apresenta três fucanas sulfatadas (DIETRICH *et al.*, 1995). Já em relação à alga *Dictyota menstrualis*, Albuquerque e colaboradores (2004) verificaram que ela apresenta frações polissacarídicas com uma composição bastante complexa contendo fucose, xilose, galactose, ácido urônico e sulfato. Duas heterofucanas isoladas desta alga apresentaram atividade anticoagulante, contudo, outra fração não apresentou esta atividade, porém revelou potente ação anti-inflamatória e antinociceptivo (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004; ALBUQUERQUE *et al.*, 2013).

A grande complexidade estrutural encontrada nos polissacarídeos das algas faz com que elas apresentem uma conformação estrutural única o que pode influenciar suas atividades farmacológicas (NGO; KIM, 2013; JIAO *et al.*, 2011)

Os PSs isolados de diversas algas apresentam diferentes atividades biológicas, dentre elas pode-se listar: antiadesiva (ROCHA *et al.*, 2001), antioxidante (COSTA *et al.*, 2011; CAMARA *et al.*, 2011), anticoagulante (ROCHA *et al.*, 2004; ALBUQUERQUE *et al.*, 2004), antitumoral (ALMEIDA-LIMA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011), anti-inflamatório (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013), antinociceptiva (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013) e antiviral (PUJOL *et al.*, 2002; TALARICO *et al.*, 2005; HARDEN *et al.*, 2009).

O primeiro relato de que algas marinhas possuíam propriedades antivirais, data de 1958, cujo trabalho demonstrou que polissacarídeos

extraídos da Rhodophyta *Gelidium cartilagenium* protegiam embriões de galinha contra a infecção pelo vírus influenza B e vírus da caxumba (GERBER *et al.*, 1958). Tal descoberta impulsionou a investigação sobre os efeitos antivirais das diversas substâncias polianiônicas, incluindo os polissacarídeos sulfatados obtidos a partir de um grande número de espécies de algas marinhas. O interesse em torno dos efeitos antivirais de polissacarídeos de algas tem crescido substancialmente nos últimos anos com evidências crescentes de que seus efeitos sobre a replicação viral ocorrem através de vários mecanismos e que isso se deve às características estruturais específicas da biomolécula e não simplesmente através de interações inespecíficas (GHOSH *et al.*, 2009a).

A capacidade dos polissacarídeos sulfatados isolados a partir de algas marinhas para inibir a replicação de vírus envelopados, como por exemplo o vírus herpes simples (HSV), o vírus da imunodeficiência humana (HIV), citomegalovírus humano (CMV), vírus da dengue (DENV) e vírus sincicial respiratório (VSR) já vem sendo bem documentada (WITVROUW; DE CLERCQ, 1997; SCHAEFFER; KRYLOV, 2000; DAMONTE; CEREZO, 2004).

Vários estudos foram realizados utilizando polissacarídeos sulfatados isolados de algas marinhas contra o vírus HSV tipos 1 e 2 (HSV-1, HSV-2) (TALARICO *et al.*, 2005; ADHIKARI *et al.*, 2006; GHOSH *et al.*, 2009; HARDEN *et al.*, 2009). Uma xilomana isolada da alga *Sebdenia* inibiu a propagação de HSV-1 em células Vero (GHOSH *et al.*, 2009b). Contudo, sua atividade foi abolida quando ela foi dessulfatada. Por outro lado, quando seus derivados foram supersulfatados sua atividade foi potencializada. Frações de polissacarídeos sulfatados isolados da alga marrom *Sargassum latifolium* inibiram o HSV-1 no ensaio de redução de placa, contudo a fração com maior potencial foi aquela que apresentou maior teor de sulfato e peso molecular (MOHSEN *et al.*, 2007).

Polissacarídeos representativos das algas marrons e vermelhas (galactanas, fucanas e galactofucanas), que diferem em estrutura, nível de sulfatação e peso molecular foram capazes de inibir a infecção HSV-1 e HSV-2 (HARDEN *et al.*, 2009). Estes resultados suportam a teoria de que a atividade biológica dos polissacarídeos sulfatados das algas é determinada por uma combinação de características estruturais dos quais o grau de sulfatação,

distribuição de grupos sulfato no esqueleto do carboidrato e peso molecular são, sem dúvida importantes, mas outros fatores, tais como a composição de açúcar, conformação molecular e a estereoquímica também estão envolvidos (DAMONTE; CERESO, 2004; GHOSH *et al.*, 2009a). Um subconjunto desses polissacarídeos sulfatados também mostrou capacidade de inativar um HSV-2 diretamente por meio de incubação com o vírus. Contudo, essa atividade virucida só tem significado se ela estiver associada com o aumento da atividade antiviral *in vivo* (CARLUCCI *et al.*, 2004).

Uma fucana isolada da alga *Cladosiphon okamuranus* composta por ácido glucurônico e unidades de fucose sulfatadas inibiu potencialmente a infecção de células BHK-21 com vírus dengue tipo 2 (DENV-2), mas mostrou pouco efeito sobre os outros três sorotipos do vírus (HIDARI *et al.*, 2008). Esse estudo também revelou que a sulfatação da fucana era necessária para a atividade antiviral; surpreendentemente a redução carboxílica dos ácidos glucorônico para glucose também aboliu as propriedades antivirais das fucanas. A análise da estrutura das glicoproteínas do envelope dos quatro sorotipos do vírus do dengue sugere que a arginina-323 do DENV2, que é próximo ao suposto sítio de ligação da heparina foi fundamental para a interação da fucana.

Da mesma forma, Talarico e colaboradores relataram que dois polissacarídeos sulfatados obtidos de algas vermelhas, a carragenana isolada de *Gymnogongrus griffithsia* e a galactana de *Cryptonemia crenulata*, inibiram a replicação do DENV-2 em células Vero (TALARICO *et al.*, 2005; TALARICO *et al.*, 2007; TALARICO; DAMONTE, 2007). Seus efeitos foram menos potentes contra DENV-3 e DENV-4 e completamente inexistente contra a infecção por DENV-1 (TALARICO *et al.*, 2005). Estes polissacarídeos interferiram com a adsorção e internalização do DENV-2 nas células e só formam efetivos se adicionados simultaneamente com o vírus ou logo após a infecção.

Pujol e colaboradores (2012) confirmaram que PSs obtidos da alga verde *C. racemosa* mostraram forte ação antiviral. A atividade antiviral do PSs foi avaliada contra os quatro sorotipos do vírus dengue (DENV), contudo o efeito ocorreu principalmente contra o DENV-2 durante a adsorção e internalização do vírus. Em ensaios paralelos os autores demonstraram que o

---

potencial antiviral dos PSs depende do conteúdo de sulfato, posição do grupo sulfato, composição de açúcar e massa molar (PUJOL *et al.*, 2012).

A atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados, obtidos de diferentes algas tem sido evidenciada por várias pesquisas, e considerando que essa atividade não está relacionada unicamente a densidade de cargas negativas e ao tamanho da cadeia, mas também as características estruturais próprias da molécula, a proposta do presente trabalho é investigar a atividade antiviral de extratos brutos de polissacarídeos sulfatados obtidos a partir das algas marrons *D. menstrualis* e *D. mertensii* e das algas verdes *C. isthmocladium* e *C. sertularioides* coletadas no litoral do Rio Grande do Norte. É relevante destacar que o nosso estudo poderá fornecer dados científicos importantes sobre a atividade antiviral desses polissacarídeos sulfatados, o que poderá abrir novas perspectivas de aplicações biotecnológicas destes compostos no tratamento da dengue.

*Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a potencial atividade antiviral de diferentes extratos brutos ricos em polissacarídeos sulfatados obtidos de algas marinhas verdes e marrons contra a infecção pelo vírus dengue 2 (DENV-2) em células Vero.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obter e caracterizar quimicamente o extrato bruto das algas marrons *Dictyota menstrualis* (EBDMens) e *Dictyota mertensii* (EBDM) e algas verdes *Codium isthmocladum* (EBCI) e *Caulerpa sertularioides* (EBCS).
- Determinar a interferência dos extratos brutos das algas na capacidade das células Vero em reduzir o MTT.
- Avaliar a capacidade do extrato bruto da alga *Dictyota menstrualis* (EBDMens) em impedir a replicação do DENV-2 após a infecção das células Vero.
- Investigar a potencial atividade antiviral dos extratos brutos das algas quando adicionados simultaneamente à infecção pelo DENV-2.
- Investigar a capacidade dos extratos brutos das algas de conferir resistência às células contra infecção pelo DENV-2.
- Avaliar o efeito dos extratos brutos das algas sobre o DENV-2 previamente tratado antes da infecção das células Vero.
- Avaliar a potencial atividade antiviral dos extratos brutos das algas em diferentes momentos (adsorção e penetração) durante as etapas iniciais da infecção pelo DENV-2.
- Investigar a potencial atividade antiviral do extrato bruto da alga *Dictyota menstrualis* (EBDMens) no período pós-adsorção do DENV-2 em células Vero.

*Materiais e métodos*

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material biológico

##### 3.1.1. Coleta

Os espécimes das algas marrons *Dictyota menstrualis* e *Dictyota mertensii* e das algas verdes *Codium isthmocladium* e *Caulerpa sertularioides* foram coletados mediante mergulho livre, em período de marés baixas 0,0 - 0,2 m de profundidade, no mês maio de 2012, na praia de Búzios, município de Nísia Floresta . RN (05°58 23 S. 35°04 97 W). Imediatamente após a coleta, a alga foi levada ao laboratório de Biotecnologia de Polímeros Naturais (BIOPOL), do Departamento de Bioquímica, do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foram identificadas pelo Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha. Após identificação, as algas foram lavadas com água doce corrente e triadas para a retirada de inclusões calcárias, epífitas e da fauna acompanhante. Em seguida, os espécimes foram secos em estufa aerada a 45 °C, triturados, pesados e guardados em frascos de vidro, devidamente vedados para posterior realização da etapa de extração.

#### 3.2. Outros materiais

##### 3.2.1. Reagentes

- Ácido acético, ácido sulfúrico, álcool etílico, álcool metílico, cloreto de bário, cloreto de sódio, coomasie brilliant blue R 250, hidróxido de sódio, sulfato de sódio da CRQ (Diadema, SP, Brasil);
- Ácido clorídrico da Synth (Diadema, SP, Brasil);
- Albumina sérica bovina, meio Leibovitz (L-15), meio L-15 sem vermelho fenol, MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio, tripsina, dimetil sulfóxido, carboximetilcelulose, preto de naftaleno, PSA (10.000 U de penicilina, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina), anti-IgG de camundongo marcado com isotiacianato de fluoresceína (FITIC), carboximetilcelulose da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil);
- Azul de Evans (Interlab)

- Kit QIAamp Viral RNA, QuantiFast SYBR Green RT-PCR, Kit Qiagen® OneStep RT-PCR (QIAGEN, USA) (QIAGEN®, California, USA),
- Soro Fetal Bovino Gibco® ;
- Agarose (Standart Løw-MR) da BioRad Laboratories (Richmond, CA, EUA);
- Bacto-Gelatina da Difco Laboratories (Detroit, MI, USA).
- Fenol da Reagen Quimibrás Indústrias Químicas S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- D-galactose e D-glucose da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA);
- Prozima (preparação enzimática a base de protease alcalina PROLAV 750) da Prozyn Biosolutions (São Paulo, SP, Brasil);
- Tampão azul de bromofenol (Amresco, Ohio, USA)
- Tris-Ácido Bórico-EDTA, Gel Red® TRizol®, *primers* (Invitrogen)
- TRizol®(Invitrogen).

### 3.2.2. Equipamentos

Além dos aparelhos usuais do laboratório pode-se destacar:

- 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem),
- Agitador de tubos modelo 251 da FANEM (São Paulo, SP, Brasil);
- Agitador magnético modelo TE-0851 da TECNAL (Piracicaba, SP, Brasil);
- Balança analítica modelo B-TEC-210A da TECNAL (Piracicaba, SP, Brasil);
- Balança de precisão modelo Mark 5000 da TECNAL (Piracicaba, SP, Brasil);
- Banho maria de temperatura ajustável modelo 100 da FANEM (São Paulo, SP, Brasil);
- Bomba à vácuo modelo TE-058 da TECNAL (Piracicaba, SP, Brasil);
- Câmara para eletroforese em gel de agarose (Bio-rad);
- Centrífuga refrigerada CR 21 da Hitachi Koki Co. Ltda (Tóquio, Japão);
- Centrífuga refrigerada 5804 R foi obtida da Eppendorf (São Paulo, SP, Brasil);

- Destilador de água tipo pilsen modelo SL 71/10 da Solab (Piracicaba, SP, Brasil);
- Espectrofotômetro modelo 600S da FEMTO Ltda (São Paulo, SP, Brasil);
- Espectrofotômetro de microplacas Epoch<sup>i</sup> da BioTek Instruments (Califórnia, EUA);
- Estufa modelo 002 CB da FANEM (São Paulo, SP, Brasil);
- Fontes de corrente contínua da BioAgency Biotecnologia Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Medidor de pH modelo TEC-5 da TECNAL (Piracicaba, SP, Brasil);
- Sistema de purificação de água Barnstead<sup>TM</sup> Nanopure<sup>TM</sup> . Discontinued modelo 7155 da Thermo Scientific (Califórnia, EUA);
- Termociclador modelo 22331 (eppendorf AG, Hamburg, GER)

### **3.3. Extração dos Polissacarídeos**

#### **3.3.1. Delipidação**

As algas trituradas foram submetidas ao processo de despigmentação e delipidação de acordo com a metodologia descrita por Farias (1992). As amostras foram recobertas com dois volumes de etanol PA e incubadas por 24 h a temperatura ambiente. A cada saturação do etanol, verificado visualmente, o solvente foi substituído. Após a sexta troca, o pó foi separado do etanol por filtração e seco pela exposição ao sol. Obtendo-se assim o pó da alga delipidada.

#### **3.3.2. Proteólise**

As amostras delipidadas foram ressuspendidas em solução salina (0,25 M) e proteolisadas em pH 8 pela ação da enzima Prozima, durante 18 h, a 60 °C. Posteriormente, as soluções de polissacarídeos foram filtradas e centrifugadas a 9500 g por 15 minutos, 4 °C como descrito por Rocha e colaboradores (2005) para a obtenção dos sobrenadantes rico em polissacarídeos.

### **3.3.3. Precipitação de polissacarídeos**

Aos sobrenadantes provenientes da centrifugação (soluções ricas em polissacarídeos) foram adicionados dois volumes de metanol e as novas soluções foram mantidas a 4 °C, por um período de 18 h. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas a 9500 g por 15 minutos a 4 °C, os precipitados resultantes, denominados extratos brutos, foram secos em pressão reduzida, triturados e estocados, para posterior realização da caracterização química.

### **3.4. Eletroforese em gel de agarose**

O gel de agarose (0,5%) foi diluído em tampão 1,3 diamino propano acetato (PDA) 0,05 M pH 9,0 e aplicado sobre lâminas de vidro. Em seguida, um volume de 5 µL de cada extrato na concentração de 10 µg/µL foi aplicado nas canaletas do gel e submetido a eletroforese em cuba resfriada a 4 °C durante uma hora. Após a corrida eletroforética (100 Volts), cada composto foi precipitado com CETAVLON 0,1% por um período de 2 horas, à temperatura ambiente. Decorrido esse período, o gel foi desidratado sob uma corrente de ar quente contínua e corado com azul de toluidina 0,1%, solução de ácido acético 1% e etanol 50%. O excesso de corante foi removido com uma solução de ácido acético 1% em etanol 49% (solução descorante). A seguir, o gel foi seco à temperatura ambiente (DIETRICH; DIETRICH, 1976). A revelação das bandas polissacarídicas foi feita pela interação do azul de toluidina com o sulfato presente nesses biopolímeros. Os extratos ricos em sulfato apresentaram coloração roxa característica.

### **3.5. Caracterização química**

#### **3.5.1. Dosagem de açúcares totais**

A quantificação de açúcar das amostras foi realizada de acordo com o método fenol/ácido sulfúrico descrito por Dubois e colaboradores (1956). O princípio desta técnica baseia-se na desidratação do açúcar pela ação do ácido sulfúrico, resultando na formação do furfural, o qual reage com o fenol formando um composto de coloração amarelo-alaranjada que é proporcional a quantidade de açúcares presentes na amostra. Os teores de açúcares totais foram determinados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 490

nm utilizando-se uma curva padrão de fucose ou galactose de intervalo de 10 a 70 µg/mL.

### 3.5.2. Dosagem de proteínas totais

As dosagens de proteínas totais foram realizadas de acordo com método descrito por Bradford (1976). O princípio desse método baseia-se na interação entre o corante de %Coomassie brilliant blue+ BG-250 e as cadeias laterais básicas ou aromáticas dos aminoácidos. Esta interação promove o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que por sua vez confere uma coloração azul, que é proporcional à concentração de proteína presente na amostra (COMPTON; JONES, 1985). As quantidades de proteínas foram estimadas através de espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm utilizando albumina sérica bovina (BSA), como uma curva de proteína padrão.

### 3.5.3. Dosagem de sulfato

O teor de sulfato total dos extratos de polissacarídeos foi determinado pelo método gelatina-bário descrito por Dodgson e Price (1962). As amostras foram submetidas à hidrólise ácida com HCl 4 N, por 6 horas a 100 °C, resultando na liberação dos grupamentos sulfato, que interagem com o íon bário, proveniente do cloreto de bário (BaCl<sub>2</sub>). Como resultado dessa interação forma-se um composto insolúvel, o sulfato de bário (BaSO<sub>4</sub>), que se mantém em suspensão devido a presença da gelatina. O conteúdo de sulfato foi quantificado por turbidimetria, sendo a leitura da absorbância realizada no comprimento de onda de 500 nm, utilizando uma curva padrão de sulfato de sódio de 10 a 50 µg/mL.

## 3.6. Preparo da solução estoque de trabalho

Os produtos finais obtidos após as dosagens de açúcares, sulfato e proteínas foram denominados de extratos brutos ricos em polissacarídeos sulfatados. Os extratos brutos obtidos a partir das algas marrons *Dictyota menstrualis* e *Dictyota mertensii* e das algas verdes *Codium isthmocladium* e *Caulerpa sertularioides* foram denominados, respectivamente, EBDMens, EBDM, EBCI e EBCS.

A partir dos extratos brutos foram preparadas soluções estoques, que foram esterilizadas por filtração usando membranas de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Antes do ensaio de citotoxicidade e dos ensaios antivirais, essas soluções estoques foram diretamente diluídas em meio Leibovitz (L-15) (Sigma, USA) na concentração de 1 mg/mL.

### 3.7. Culturas celulares

Foram utilizadas células C6/36 e Vero. A linhagem celular contínua C6/36, originária de larvas de *Aedes albopictus* foi utilizada para a obtenção do estoque viral. Para a realização dos ensaios de citotoxicidade e antivirais, utilizou-se células Vero, que são células contínuas de fibroblastos de rins do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). As células C6/36, mantidas em frascos de 25  $\text{cm}^2$  (Corning Incorporated, NY, USA), foram cultivadas em estufa a 28  $^{\circ}\text{C}$  e as células Vero, cultivadas em frascos de 75  $\text{cm}^2$  (Corning Incorporated, NY, USA), foram incubadas em estufa a 37  $^{\circ}\text{C}$  com atmosfera umedecida e com 5% de  $\text{CO}_2$ . As células C6/36 e Vero foram gentilmente fornecidas pelo Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca, da Escola de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Ambas as células foram crescidas e mantidas no meio de cultura Leibovitz (L-15) (Sigma, USA). Ao meio L-15 foi adicionado 1% de PSA (10.000 U de penicilina, 10.000  $\mu\text{g}$  de estreptomicina e 25  $\mu\text{g}$  de anfotericina (Sigma, USA), 10% de caldo triptose fosfato (Sigma, USA), e Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen, New York, USA), na proporção de 10% para promover o crescimento das células e de 2% para a manutenção das linhagens celulares. Para a obtenção de subculturas celulares, perpetuação das linhagens de células e realização dos experimentos, o meio dos frascos foi aspirado e a monocamada celular lavada uma vez com solução tampão PBS. Para a separação das células utilizou-se como agente dissociante a enzima tripsina (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução EDTA 1:250 (Sigma, USA). As células tratadas com a enzima foram incubadas por 5 minutos, em seguida a tripsina foi inativada pela adição de meio de cultura L-15, contendo soro fetal bovino a 10%, em seguida as células em suspensão foram subcultivadas em novos frascos ou depositadas em placas de 12 e 96 poços para a realização dos experimentos.

### 3.8. Linhagem viral

Os experimentos foram realizados com o vírus dengue 2 (DENV-2) cepa *New Guinea C*. Esta cepa viral também foi gentilmente cedida pelo Dr. Benedito Antônio Lopes da Fonseca, da USP.

### 3.9. Preparo das suspensões-estoques virais

#### 3.9.1. Propagação do vírus DENV-2 em células C6/36

O estoque viral de trabalho foi obtido através da inoculação de suspensões virais de DEN-2 em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, contendo monocamada de células C6/36, com 90% de confluência. Para tanto, o meio L-15 foi aspirado e a monocamada celular lavada duas vezes com tampão fosfato (PBS) pH 7,4, posteriormente, adicionou-se um volume de 400 µL da suspensão viral do vírus DENV-2 e o frasco foi incubado por 1 h e 30 min a 28 °C, com agitação a cada 15 minutos para permitir a adsorção e penetração viral. Em seguida, adicionou-se meio L-15 suplementado com 2% de SFB, sendo as células incubadas a 28 °C por 7 dias. Após esse período, o sobrenadante da cultura celular foi aspirado e centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm, à temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido, ao qual foi adicionado 7,5% de Soro Albumina Bovina (BSA) (Sigma, USA), sendo essa suspensão aliquoteada em criotubos e armazenada no freezer a -70 °C, para posterior confirmação da presença do vírus pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e por reação da transcriptase reversa, seguida de reação da polimerase em cadeia (RT-PCR).

#### 3.9.2. Confirmação da identidade do DEN-2 pela técnica de Imunofluorescência Indireta

O teste de imunofluorescência indireta foi utilizado para confirmação da infecção pelo DENV-2 na cultura de células C6/36. Inicialmente, a monocamada de células C6/36 foi tripsinizada e ressuspensa em meio L-15, suplementado com SBF a 10%. A suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sedimento celular foi lavado três vezes em PBS e a concentração celular foi observada em microscópio óptico comum (aumento de 100X) em aproximadamente 100

células por campo. Um volume de dez microlitros dessa suspensão celular foi adicionado aos círculos delimitados (spots) da lâmina de imunofluorescência. Após a adesão das células à lâmina, elas foram fixadas com acetona PA gelada por 15 minutos. Posteriormente, a lâmina foi lavada e seca à temperatura ambiente. Sucessivamente, adicionou-se em cada spot da lâmina 20 µL de fluido ascítico imune de camundongo (MIAF), purificado anti-DENV-2, diluído 1:100 em PBS contendo 3% de SFB. Após incubação por 30 minutos a 37 °C em câmara úmida, seguiram-se três lavagens da lâmina em PBS, sendo cada uma delas realizada durante cinco minutos. Após seca, adicionou-se em cada spot da lâmina 20 µL de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com isotiacianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, USA), diluído 1:100 em PBS com azul de Evans (1:20.000). Depois da incubação por 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara úmida, a lâmina foi lavadas 3 vezes em PBS e montada com glicerina tamponada e observada em microscópio de fluorescência Zeiss. As células que haviam sido infectadas pelas suspensões virais se mostraram positivas, sendo confirmadas em spots pela presença de intensa fluorescência celular. Os controles negativos (células C6/36 não infectadas, coradas com azul de Evans) foram revelados pela ausência de fluorescência, na mesma lâmina.

### **3.10. Confirmação da identidade do DENV-2 pelo método de RT-PCR**

#### **3.10.1. Extração do RNA viral**

A purificação do RNA viral foi realizada com o objetivo de submeter à amostra ao método de RT-PCR para a confirmação da infecção viral a partir do sobrenadante da cultura de células C6/36 e também para quantificar a carga de RNA viral na superfície da membrana da célula e do sobrenadante dos ensaios antivirais tratados com o extrato.

Para a extração do RNA dos vírus ligados a membrana das células Vero foi utilizado o TRIzol® (Invitrogen). A monocamada de células foi tratada com 1 mL de Trizol e as células foram repetidamente homogeneizadas. Em seguida, a suspensão celular foi aspirada e transferida para um tubo de 1,5 mL, e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e o tubo foi vigorosamente agitado por 5 minutos. Posteriormente, procedeu-se a centrifugação a 12.000 x g a 4 °C por

15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e a partir dessa etapa, o RNA viral associado à membrana da célula foi purificado da mesma forma que o RNA viral do sobrenadante utilizando-se o kit QIAamp Viral RNA (QIAGEN®, California, USA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Para a extração do RNA viral um volume de 140 µL das amostras foi adicionado a 560 µL do tampão de lise AVL e a 5,6 µL do Carrier RNA, seguindo-se de homogeneização vigorosa em agitador de tubos durante 10 segundos. Para o rompimento da partícula viral a amostra foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 560 µL de etanol (96-100%), sendo novamente homogeneizada em agitador de tubos por 10 s. Posteriormente, foram aplicados 630 µL dessa solução em uma coluna com membrana de sílica, seguida de centrifugação a 8.000 rpm por 1 min, para que ocorra a adsorção do RNA viral à coluna. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Após a adsorção do RNA viral, a coluna foi submetida a duas etapas de lavagem, usando-se dois diferentes tampões: AW1 (500 µL) com centrifugação a 8.000 x g por 1 min e AW2 (500 µL) com centrifugação a 14.000 x g por 3 min. As condições de lavagem asseguraram a purificação do RNA e a remoção de resíduos (proteínas e outros contaminantes). Finalmente, a coluna foi transferida para um tubo estéril (livre de DNase e RNase), e o RNA viral foi eluído após adição 60 µL de tampão AVE e centrifugação (8.000 rpm por 1 min). O RNA viral foi armazenado no freezer -70 °C até a utilização nos testes de RT-PCR e RT-qPCR.

### **3.11. Confirmação da identidade do DENV-2 pelo método de RT-PCR**

Para confirmar a presença do DENV-2 no sobrenadante de células C6/36 foi realizada a reação da transcriptase reversa, seguida da reação *semi-nested* de reação da polimerase em cadeia (*semi-nested* RT-PCR), de acordo com a metodologia descrita por Lanciotti e cols. (1992). Para a detecção do RNA viral foi utilizado o Kit Qiagen® OneStep RT-PCR (QIAGEN®, Califórnia, USA). Na primeira etapa foi utilizado 0,75 µL dos oligonucleotídeos D1 e D2 (10µM) que são complementares as sequências dos genes que codificam as proteínas C e prM. Na etapa *semi-nested*, foi utilizado 0,75 µL dos iniciadores TS1, TS2, TS3 e TS4, para os sorotipos DENV-1 a 4 (Tabela 1). Contudo, o

sorotipo de interesse é o DENV-2, que ao ser amplificado gera um fragmento de 119 pares de bases.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados nas amplificações para detecção dos sorotipos de Dengue.

| Oligonucleotídeos | Sequência                              | Especificidade           | Tamanho do fragmento (pb) |
|-------------------|--|--------------------------|---------------------------|
| D1                | 5'TCAATATGCTGAAACGCGCGA<br>GAAACCG 3'  | DENV (sense)             | 511                       |
| D2                | 5'TTGCACCAACAGTCAATGTCTT<br>CAGGTTC-3' | DENV<br>(anti-sense)     | 511                       |
| TS1               | 5' CGTCTCAGTGATCCGGGGG 3'              | DENV-1<br>(anti-sense)   | 482 (D1 e TS1)            |
| TS2               | 5'<br>CGCCACAAGGGCCATGAACAG<br>3'      | DENV - 2<br>(anti-sense) | 119 (D1 e TS2)            |
| TS3               | 5'TAACATCATCATGAGACAGAG<br>C 3'        | DENV - 3<br>(anti-sense) | 290 (D1 e TS3)            |
| TS4               | 5'<br>CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA<br>3'     | DENV - 4<br>(anti-sense) | 392 (D1 e TS4)            |

Para a realização da reação semi-*nested* RT-PCR foi adicionado em um tubo de 200 µL: 2,5 µL de RNA extraído e 22,5 µL dos reagentes da mistura (Tabela 2.).

**Tabela 2.** Volume dos reagentes para reação de RT-PCR.

| Reagentes               | Mistura para RT-PCR<br>(volume para um ensaio) | Mistura para Semi-nested<br>(volume para um ensaio) |
|-------------------------|--|---|
| Água livre de nucleases | 8 µL   | 6,25 µL   |
| D1 (10 µM)              | 0,75 µL  | 0,75 µL   |
| D2 (10 µM)              | 0,75µL   | --  |
| TS1-4 (10 µM)           | --   | 0,75µL  |
| 5 U/µl enzima AMV-RT    | 0,5µL  | --  |
| PCR Master Mix 2X       | 12,5 µL  | 12,5 µL   |

A mistura foi incubada a 45 °C por 45 min, seguindo-se de 30 ciclos subsequentes de desnaturação (94 °C por 35 s), anelamento (56 °C por 1 min), extensão (72 °C por 2 min) com extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos da semi-*nested* RT-PCR foram aplicados em gel de agarose a 1% (BioAmerica,

Inc., Miami, USA) em tampão azul de bromofenol (Amresco, Ohio, USA) a 1% em Tris-Ácido Bórico-EDTA 0,5 X, acrescido de Gel Red<sup>®</sup> 0,1% (Invitrogen). O gel foi submetido a uma corrente de 100 W constante, 50 mA variável por 1 h. Após eletroforese de aproximadamente 1 h a 90 volts, finalizando-se com a etapa de visualização e fotografia dos DNAs utilizando o sistema Gel Doc 1000.

### **3.12. Titulação do DENV-2 por quantificação do número de unidade formadora de placa (PFU)**

Após a confirmação da infecção viral pelas técnicas de imunofluorescência indireta e por RT-PCR, o título infeccioso do vírus, proveniente do sobrenadante da cultura de células C6/36 foi determinado através do método de contagem de placas de lise. Suspensões de células Vero na densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL foram cultivadas em placas de 12 cavidades, com meio L-15 suplementado com 10 % de SFB e, incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após confluência (24 h), o meio de cultura foi aspirado e a monocamada celular lavada com PBS. Em seguida, as células foram infectadas com 400 L da suspensão estoque viral diluída em forma seriada (razão 1:10), em PBS (em duplicata para cada diluição) e incubadas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, durante 90 min, sob agitação a cada 15 min. Após esse período, a suspensão viral foi aspirada e as células foram lavadas com PBS. Em cada cavidade foi adicionado 1000 L de %overlay+, uma solução viscosa contendo carboximetilcelulose (Sigma, Munich, Germany) a 3% estéril e meio L-15 sem vermelho fenol, suplementado com 2% SFB e 1% de PSA. Posteriormente, a placa foi incubada por 7 dias a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término da incubação, a camada de Overlay foi descartada e, as células foram fixadas e coradas pela adição de 200 L do corante preto de naftaleno, por 40 min, à temperatura ambiente. Após este tempo, o corante foi aspirado e as placas colocadas para secar, à temperatura ambiente. Os focos de infecção, que se caracterizam por placas de lise celular, foram quantificados na última diluição viral onde os focos foram visualizados com auxílio de um estereoscópio. O título viral (T) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$T = \frac{N \times d}{V}$$

T = Título viral expresso em Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/mL)

N = número médio de focos da última diluição que apresentou focos;

d = recíproca da última diluição, onde foram contadas as placas de lise;

v = volume de inóculo em mL (0,4 mL).

### **3.13. Avaliação da capacidade redutora do sal de tetrazolium (MTT) de células Vero**

A avaliação do efeito dos extratos brutos das algas sobre a capacidade redutora das células Vero foi realizada antes dos ensaios virais. Para esse ensaio foi utilizado o método colorimétrico do MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio, conforme proposto por Mosman (1983), com algumas modificações.

Uma suspensão de células Vero, contendo aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída em uma placa de 96 poços (100 L/poço). Após 24 h de incubação, a 37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub>, o meio da monocamada celular confluyente foi aspirado e substituído por 200 L das diferentes concentrações dos extratos (0,1, 1, 10, 100, 500 e 1000 µg/mL), dissolvidos em meio L-15 com 2% de SFB. A placa foi incubada por 120h a 37° C, em estufa de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o meio de cada cavidade foi substituído por 50 L de uma solução de MTT 1mg/mL (preparada em meio L-15) e a placa foi incubada por 4 h. Após a incubação, o MTT foi retirado e foram adicionados 100 µL de DMSO, em todas as cavidades, para solubilizar os cristais de formazan. Em seguida, a placa foi agitada, por 10 min, para que todo o formazan fosse solubilizado e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores de absorbância das monocamadas tratadas com as diferentes concentrações dos extratos foram diretamente proporcionais à viabilidade celular, os quais foram

transformados em porcentagens (%) em relação aos controles celulares, que são considerados 100% viáveis, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Redução do MTT} = \frac{AEB}{ACC} \times 100\%$$

Onde: AEB e ACC correspondem às absorbâncias do extrato bruto e dos controles celulares, respectivamente.

### **3.14. Avaliação do efeito do tempo de adição do extrato no ciclo de replicação viral**

A potencial atividade antiviral dos extratos foi avaliada utilizando diferentes estratégias de tratamento, nas quais os extratos diluídos em diferentes concentrações em meio L-15 sem suplemento, foram adicionados em períodos de tempo distintos, de acordo com a metodologia descrita por Tong e colaboradores (2010), com algumas modificações. Esses experimentos foram realizados em monocamadas confluentes de células Vero, cultivadas em placas de 12 poços, contendo meio L-15, suplementado com 2% de SFB e 1% de PSA e incubadas por 120 h a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Em todos os experimentos foram realizados controles celulares (CC . células não infectadas) e virais (CV . células infectadas). A potencial atividade antiviral dos extratos brutos contra o DENV2 foi avaliada através do ensaio de redução do número de placas de lise e através da quantificação do número de cópias do RNA viral por PCR em tempo real. Cada experimento foi repetido duas vezes.

### **3.15. Quantificação do número de cópias de RNA viral do DENV-2 por PCR em tempo real**

O número de cópias do RNA viral correspondente às partículas virais adsorvidas à superfície das células e o RNA viral presente no sobrenadante da cultura, resultante da replicação viral em células Vero infectadas com o DENV-2 tratadas ou não com o extrato, foi determinada por PCR em Tempo Real. Inicialmente para essa quantificação, foi confeccionada uma curva padrão a

partir do RNA extraído do DENV-2, proveniente do sobrenadante de cultura das células C6/36 infectadas, diluídos em série e previamente quantificado através do ensaio de placa (PFU). A reação de PCR em Tempo real foi realizada no sistema de detecção de sequência 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem), utilizando o kit QuantiFast SYBR Green RT-PCR (QIAGEN, USA), conforme instruções do fabricante. Ao tubo da reação foi adicionado um volume de 5 µL do RNA, 12,5 µL do reagente 2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix, 0,25 µL QuantiFast RT Mix, 6,25 µL água livre de RNase, 0,5 µL dos oligonucleotídeos DV2U (5' AAGGTGAGATGAAGCTGTAGTCTC-3') e DVL1 (5' CATTCCATTTTCTGGCGTTCT-3') específicos para o vírus dengue-2, que amplifica um fragmento de DNA localizado na região não-codificadora (HOUNG *et al.*, 2001), totalizando um volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: 48 °C por 30 minutos para a transcrição reversa, seguido de 95 °C por 10 min, e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. As condições de amplificação, bem como os ciclos térmicos empregados seguiram o protocolo de Farias, Machado e Fonseca (2013).

### **3.16. Tratamento das células Vero com o extrato bruto após a infecção por DENV2 (Tratamento pós-infecção):**

O ensaio de tratamento pós-infecção foi realizado com o objetivo de avaliar se o extrato é capaz de inibir a replicação do DENV2 após a infecção das células Vero. A suspensão do DENV-2 (MOI = 0,1) foi adicionada às monocamadas de células Vero após confluência. Após 1 h e 30 min de incubação, a suspensão viral foi removida e as células foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7,4 e tratadas com 1 mL do extrato diluído em meio L-15 suplementado com 2% de SFB. As células tratadas foram incubadas por 120 h, à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o sobrenadante da cultura celular foi coletado para a quantificação do número de partículas virais pelo ensaio de unidade formadora de placa (PFU/mL) conforme descrito no item 3.11.

### **3.17. Tratamento das células Vero com o extrato bruto simultaneamente à infecção por DENV2 (Tratamento simultâneo):**

O ensaio de tratamento simultâneo foi realizado com o objetivo de avaliar a potencial capacidade do extrato bruto de inibir a infecção de células

Vero pelo DENV-2. O extrato diluído nas concentrações desejadas foi adicionado às monocamadas confluentes de células Vero simultaneamente com a suspensão do DENV2 (MOI = 0,1). A placa foi incubada por 1 h e 30min à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a suspensão contendo os vírus e os extratos foi removida, e a monocamada foi lavada 2X com PBS pH 7,4. Após as lavagens adicionou-se 1 mL de meio L-15 suplementado com 2% de SFB. A seguir, as células foram incubadas por 05 dias (120h) a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o sobrenadante da cultura celular foi coletado para a realização do ensaio de unidade formadora de placa (PFU/mL) e para a quantificação do número de cópias de RNA viral por PCR em tempo real (descritos nos itens 3.11 e 3.15).

### **3.18. Tratamento das células Vero com o extrato bruto e posterior infecção com DENV2 (Pré-tratamento da célula)**

O ensaio de tratamento prévio da célula e posterior infecção foi realizado com o objetivo de avaliar se o extrato é capaz de interagir com os receptores das células e inibir a infecção por DENV-2.

O extrato nas concentrações preestabelecidas foi incubado com as monocamadas confluentes de células Vero por 2 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, o extrato foi aspirado, a monocamada celular foi lavada com PBS e a suspensão do DENV-2 (MOI = 0,1) foi adicionada. Após 1 h e 30 min de incubação nas mesmas condições acima mencionadas, as células foram lavadas com PBS e o inóculo viral foi aspirado e substituído por 1 mL de meio L-15 suplementado com SFB a 2 %. A seguir, as placas foram incubadas por 120 h nas mesmas condições já citadas. Posteriormente, o sobrenadante da cultura celular foi coletado para a quantificação do número de cópias de RNA viral por PCR em tempo real (ver item 3.15 ).

### **3.19. Avaliação do efeito dos extratos sobre DENV-2 pré-tratado antes da infecção das células Vero (Pré-tratamento do vírus)**

O ensaio de bloqueio viral (virucida) foi realizado com objetivo de avaliar a ação direta do extrato sobre as partículas virais, e a consequente diminuição da capacidade infecciosa do DENV-2 em células Vero. Para tal fim, um volume de 100 µL de suspensão viral contendo 10<sup>6</sup> UFP de DENV2 foi adicionado em um

tubo de 1,5 mL, juntamente com um volume de 100 µL do extrato diluído nas diferentes concentrações. Como controle viral, o vírus foi tratado com meio L-15 sem SFB. Os tubos contendo a suspensão viral e o extrato ou meio foram incubados na estufa por 1 h a 37 °C. Após este período a placa de 12 poços, contendo as monocamadas de células Vero com 90% de confluência foi lavada com PBS e, em seguida, adicionou-se o volume de 200 µl contendo os fluidos virais tratados com o extrato e o controle viral. Em seguida, a placa foi incubada por 1 h e 30 min a 37 °C na estufa. Após incubação, os fluidos virais foram retirados e, as células lavadas com PBS. Posteriormente, as monocamadas de células foram recobertas com 1 mL de meio L-15 suplementado com SFB a 2% e incubadas por 120h à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 120 h, o sobrenadante celular foi removido e congelado no freezer a -70 °C, para posterior extração do RNA e realização da RT-qPCR para quantificação do número de cópias do RNA viral (ver item 3.15 ).

### **3.20. Tratamento durante a adsorção viral**

Esse ensaio foi realizado com objetivo de avaliar se o extrato é capaz de inibir a adsorção do DENV-2 em células Vero. Inicialmente, a placa contendo a monocamada celular foi resfriada a 4 °C por 30 min. Após esse período, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS. Em seguida, o extrato nas concentrações preestabelecidas, foi adicionado às células, ao mesmo tempo que uma suspensão viral (MOI = 0,1) foi acrescentada. Após 2 h de incubação a 4 °C, essa mistura foi retirada e as células foram lavadas com PBS, para retirar o restante do extrato e os vírus não adsorvidos. Para finalizar, foi adicionado à monocamada de células um volume de 1 mL de meio L-15 contendo SFB a 2% e a placa foi incubada por 5 dias à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 120 h, o sobrenadante celular foi removido e congelado no freezer a -70 °C, para posterior extração do RNA e realização da RT-qPCR para quantificação do número de cópias de RNA viral (ver item 3.15 ).

### **3.21. Tratamento pós-adsorção viral**

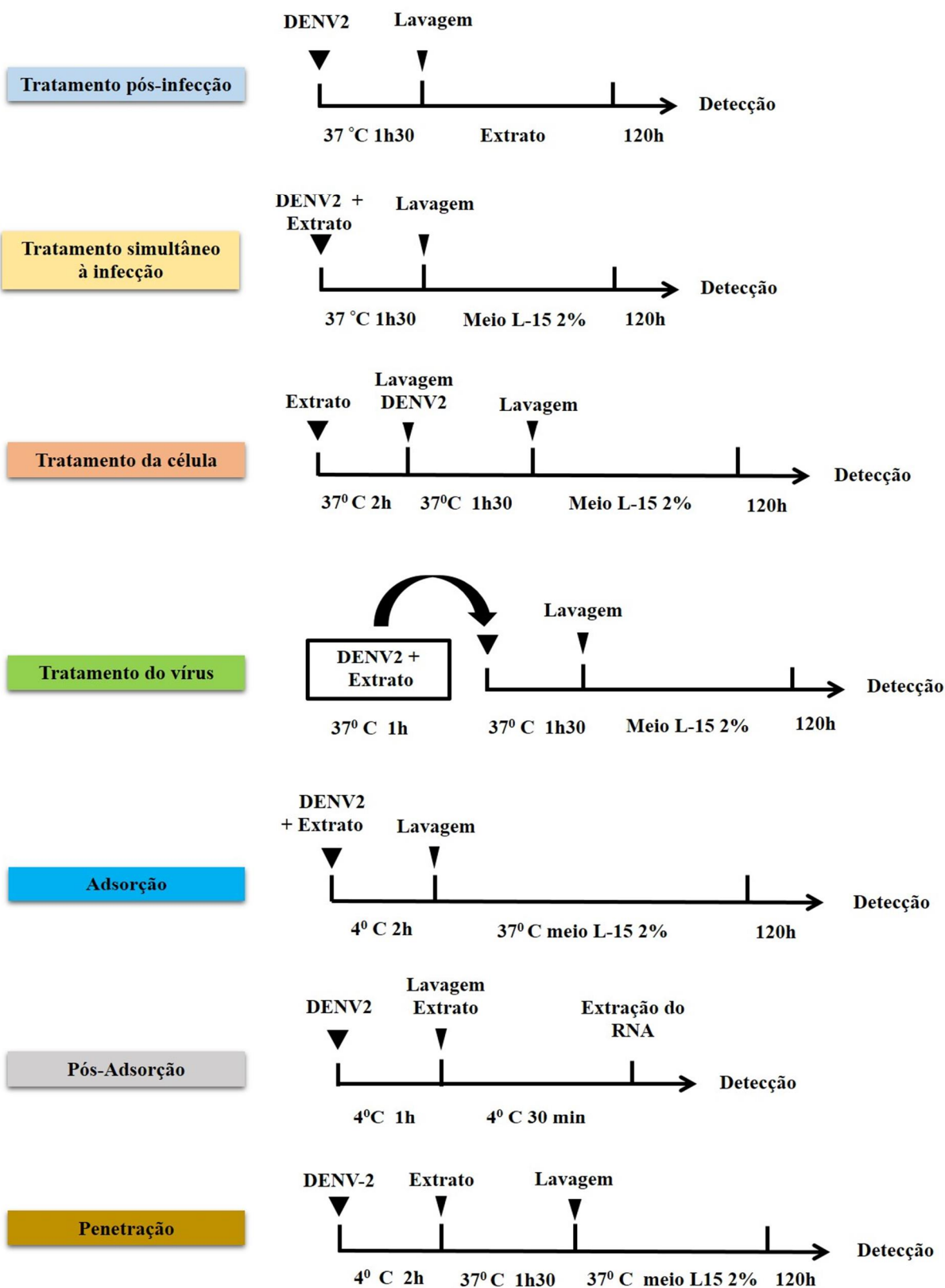
Esse ensaio foi realizado com objetivo de avaliar a possível interferência do extrato sobre as partículas do DENV-2 previamente adsorvidas em células Vero. Este ensaio seguiu os procedimentos descritos por Tong e col. (2010).

Inicialmente, a placa contendo a monocamada celular foi resfriada a 4 °C por 30 min. Após esse período, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS e incubadas com a suspensão viral (MOI = 0,1), por 1 h a 4 °C, para permitir a adsorção do DENV2. Posteriormente, a monocamada celular foi lavada com PBS gelado e adicionou-se o extrato nas concentrações pré-determinadas e as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas com PBS e tratadas com Trizol (Invitrogen), para proceder à extração do RNA do vírus adsorvidos na membrana das células Vero (ver procedimento descrito em). Após a extração, o RNA purificado foi submetido a RT-qPCR para quantificação do número de cópias de RNA das partículas virais adsorvidas na membrana das células (ver item 3.15).

### **3.22. Tratamento durante a penetração viral**

Esse experimento foi realizado com objetivo de avaliar se o extrato é capaz de inibir a penetração do DENV-2 em células Vero. A monocamada celular foi primeiramente resfriado a 4 °C por 30 min, em seguida, o meio L-15 foi removido, e as células foram lavadas com PBS e incubadas com a suspensão viral (MOI = 0,1), por 2 h a 4 °C. Decorrido esse período, a monocamada celular foi lavado 2x com PBS gelado para remover as partículas virais não adsorvidas e o volume da segunda lavagem foi mantido na monocamada celular. Imediatamente, a placa foi incubada a 37 °C por 5 min, para que a temperatura do ensaio fosse rapidamente elevada, com o propósito de maximizar a penetração viral. Logo em seguida, o PBS foi descartado e 200 µL do extrato nas concentrações preestabelecidas foram adicionados. A placa foi novamente incubada na estufa por 1 h e 30 min a 37 °C. Após incubação, o tapete celular foi lavado com tampão citrato (pH 3,0), a 37 °C por 1 min para inativar os vírions, que provavelmente não penetraram nas células. Em seguida, o pH foi neutralizado através da lavagem com PBS. Por fim, o PBS foi descartado e adicionou-se o meio L-15 contendo 2% de SFB, e as células foram incubadas por 120 h à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 120 h, o sobrenadante celular foi removido e congelado no freezer a -70 °C, para posterior extração do RNA e realização da RT-qPCR para quantificação do número de cópias de RNA viral (ver item 3.15).

Para ilustrar os diferentes ensaios antivirais realizados neste trabalho, a figura 16 mostra uma representação esquemática dos procedimentos metodológicos utilizados para investigar a potencial ação anti-DENV-2 dos extratos brutos, ricos em polissacarídeos sulfatados, obtidos das algas marinhas.



**Figura 16.** Representação esquemática dos procedimentos metodológicos utilizados para investigar a potencial ação anti-DENV-2 dos extratos brutos ricos em polissacarídeos sulfatados.

### **3.23. Análise estatística**

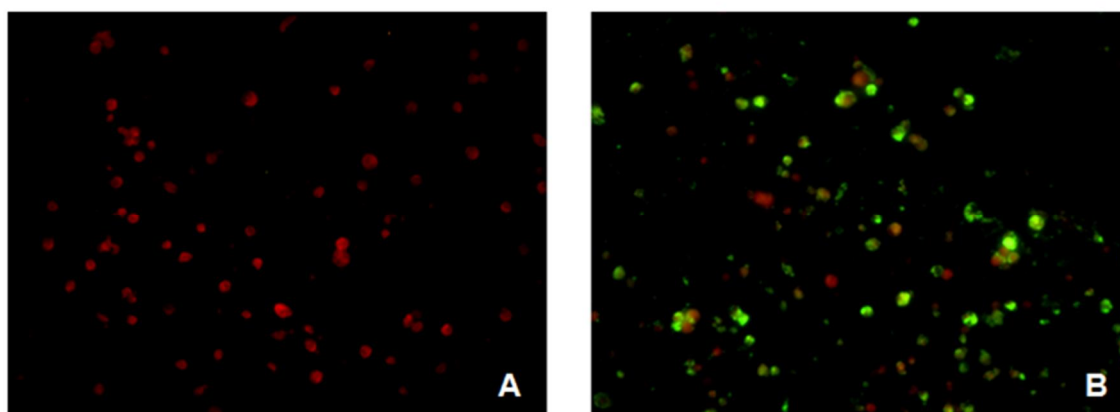
A análise estatística foi utilizada para avaliar a diferença na carga viral, produzida em células infectadas pelo DENV-2, que foram tratadas com o extrato em comparação com as células controle (sem extrato). Os dados foram inseridos no o programa de computador GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., EUA) versão 6.0. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste estatístico one-way ANOVA (não-paramétrico), seguido pelo teste de Tuckey. Para todas as análises, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

*Resultados*

## 4. RESULTADOS

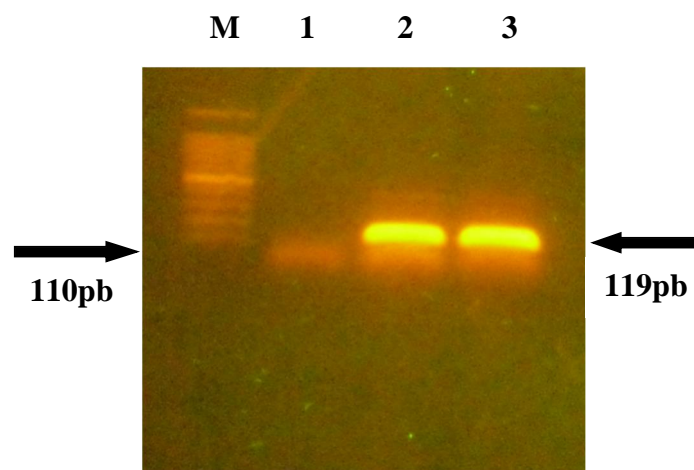
### 4.1. Isolamento e identificação do sorotipo do vírus dengue 2 (DENV-2)

A confirmação do sorotipo do vírus utilizado neste estudo foi realizada pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) e por RT-PCR. Na figura 17 são mostrados os resultados da imunofluorescência. Na figura 17A verificam-se células C6/36 que não foram incubadas com vírus (controle negativo). Estas células mostram marcação em vermelho, apenas pelo corante de fundo. Por outro lado, na figura 17 B verificam-se células cultivadas na presença do vírus, coradas em verde pela marcação com fluoresceína, revelando a presença do sorotipo DENV-2 no interior das células.



**Figura 17. Ensaio de imunofluorescência indireta para detecção do DENV-2 em células C6/36 infectadas.** (A) Imunofluorescência negativa para dengue (C6/36 não infectada corada com azul de Evans 0,01%); (B) Imunofluorescência positiva para dengue (C6/36 infectadas com o estoque viral de DENV2 e visualizadas após uso de anticorpo MIAF e anticorpo secundário marcado com fluoresceína (Aumento 400X).

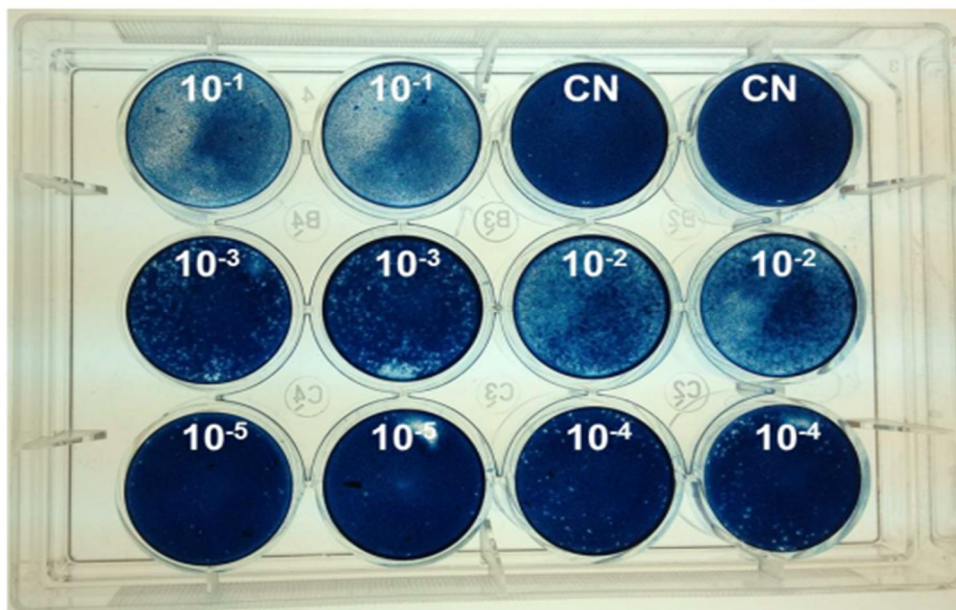
Para confirmar o resultado da IFI, o RNA viral extraído do sobrenadante obtido no sétimo dia após a inoculação viral em células C6/36 foi submetido a RT-PCR. Os amplicons resultantes desta reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose conforme mostrado na figura 18, onde se verifica um fragmento de 119 pares de bases que corresponde ao esperado para o DENV-2.



**Figura 18. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos amplificados por RT-PCR para identificação do DENV-2.** M: marcador de peso molecular de 100pb. Coluna 1: ausência de RNA do DENV2 em células C6/36 (controle negativo). Coluna 2: amplificação do RNA do DENV-2 (controle positivo - fragmento de 119pb). Coluna 3: amostra de RNA positiva para DENV-2 isolado do sobrenadante de células C6/36.

#### 4.2. Determinação dos títulos virais

Após a confirmação da presença do sorotipo DENV2 pelas técnicas de Imunofluorescência indireta e RT-PCR, a infectividade do estoque viral foi determinada pelo método de unidade formadora de placa (PFU). A figura 19 representa a placa de titulação viral, onde foram testadas diferentes diluições do DENV2 em duplicata. No controle de células (controle negativo), observa-se a monocamada de células C6/36 corada em azul de forma homogênea, não sendo possível observar a presença de espaços sem coloração, que indicariam replicação viral com lise das células. Nos poços da placa onde as células foram desafiadas com diluições do vírus  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , verifica-se uma baixa intensidade na coloração azul em todo o poço em comparação ao grupo controle, sendo possível observar algumas áreas descoradas. Quando as células foram desafiadas com uma diluição maior do vírus (diluições  $10^{-3}$ ) a coloração azul se apresentou mais intensa e os focos puderam ser vistos em várias regiões do poço da placa. Este padrão de aumento da intensidade da coloração azul e redução do número de focos visíveis foi se confirmando com uso de suspensões virais cada vez mais diluídas. Dessa forma, o título do estoque do DENV-2 em unidades formadoras placas/mL (PFU/mL) foi determinado com base na fórmula como sendo de  $2,5 \times 10^6$  PFU/mL, o qual foi utilizado em todos os ensaios deste estudo.

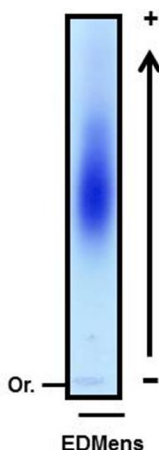


**Figura 19. Ensaio de placa para a titulação do vírus dengue-2 (DENV-2).** O ensaio foi realizado sob uma monocamada confluyente de células Vero. Estas foram desafiadas com isolado do sobrenadante de células C6/36. Os números de cor branca indicam a diluições em que o isolado viral foi adicionado a cada poço. O controle negativo (CN) são células Vero não desafiadas.

**Parte I:** Nesta primeira etapa do trabalho a caracterização química e os ensaios de citotoxicidade e de atividade antiviral descritos a seguir foram realizados com o extrato bruto obtido da alga *D. menstrualis* (EBDMens).

#### 4.3 Eletroforese em gel de agarose do EBDMens da alga *D. menstrualis*

Para confirmar a presença de polissacarídeos sulfatados no EBDMens, este foi submetido à eletroforese em gel de agarose com Tampão PDA. Conforme mostrado na figura 20, o perfil eletroforético dos PS apresentou uma coloração violácea, cuja cor está associada a interação entre o azul de toluidina e os compostos sulfatados presentes no extrato.



**Figura 20:** Comportamento eletroforético do EDMens da alga *D. menstrualis*. Alíquotas de 5  $\mu\text{L}$  (50  $\mu\text{g}$ ) dos extratos foram aplicados em lâminas de agarose em tampão PDA 0,05 M pH 9,0. Após precipitação com CETAVLON as lâminas foram coradas com azul de toluidina. Or - origem. - Polo negativo. + Polo positivo.

#### 4.4. Caracterização química da amostra

O extrato bruto rico em polissacarídeos sulfatados obtido da alga *D. menstrualis* (EDMens) foi submetido à caracterização química, a fim de se determinar as quantidades de açúcares totais, sulfato e de proteínas. Os dados são sumarizados na tabela 3.

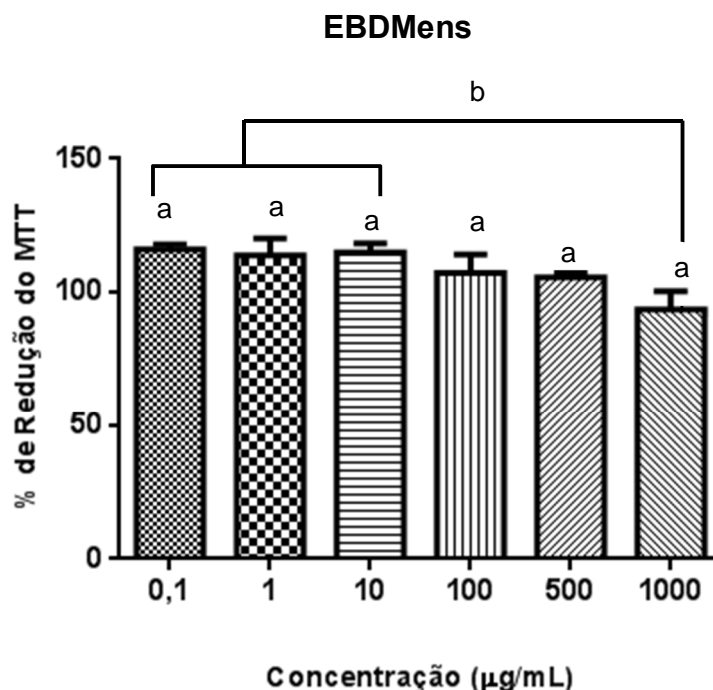
**Tabela 3.** Teor de açúcares totais, sulfato e proteína do EDMens

| Extrato | Açúcares totais (%) | Sulfato (%)    | Sulfato / Açúcar (%/%) | Proteína (%) |
|---------|---------------------|----------------|------------------------|--------------|
| EDMens  | 41,2 $\pm$ 2,5      | 10,2 $\pm$ 0,9 | 0,25                   | Traços       |

#### 4.5. Capacidade redutora do MTT por células Vero quando expostas a EDMens

O ensaio para avaliar a viabilidade das células Vero, tratadas com de EDMens mostraram que independentemente da concentração utilizada, o extrato não alterou significativamente a capacidade dessas células para promover a redução do MTT a cristais de formazan, conforme mostrado na figura 21. Os resultados obtidos indicam que todas as concentrações do extrato que foram testadas não causaram prejuízo às desidrogenases celulares

responsáveis pela redução do MTT, uma vez que a viabilidade celular foi mantida.



**Figura 21. Capacidade redutora do MTT em células Vero expostas por 120 h a EBDMens.** Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do extrato ( $p < 0.05$ ).

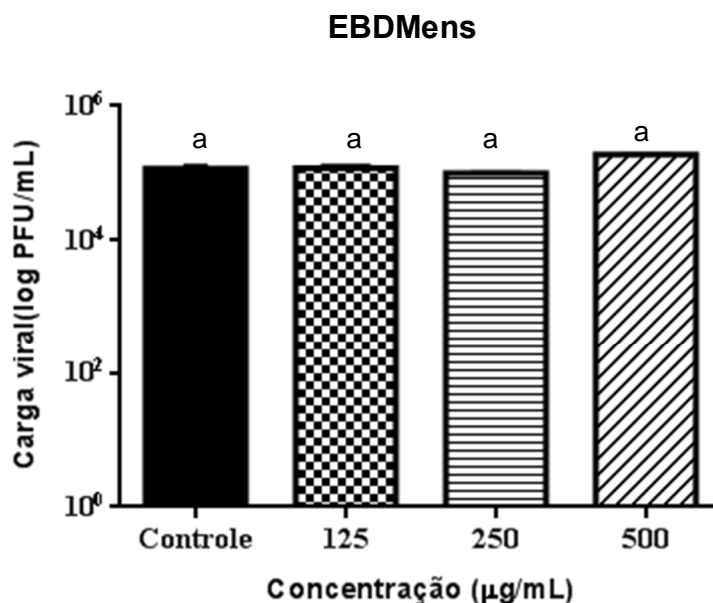
#### 4.6 Avaliação da potencial ação antiviral do EBDMens

Após o ensaio de viabilidade celular, foram escolhidas as concentrações de EBDMens para a realização dos ensaios antivirais. Para a avaliação da possível ação desse extrato frente à infecção de células Vero por DENV-2 foram realizados os seguintes ensaios: Tratamento pós-infecção, tratamento simultâneo à infecção, tratamento da célula antes da infecção, pré-tratamento do vírus, tratamento durante a adsorção, pós-adsorção e durante a penetração viral. Os resultados obtidos são apresentados abaixo.

##### 4.6.1. Efeito do EBDMens no tratamento pós-infecção

Os resultados obtidos no ensaio de redução unidade formadora de placa de lise (PFU/mL), para avaliar o efeito do EBDMens no tratamento das células Vero após a infecção por DENV-2 mostraram que o extrato não exerceu nenhuma proteção das células contra o vírus nesta condição. A figura 22 revela que independentemente da concentração utilizada do extrato observou-se

replicação viral em níveis muito semelhantes daquele apresentado pelas células não tratadas (controle). Isto indica que o EBDMens não foi capaz de inibir a replicação do DENV-2, após a infecção das células Vero.



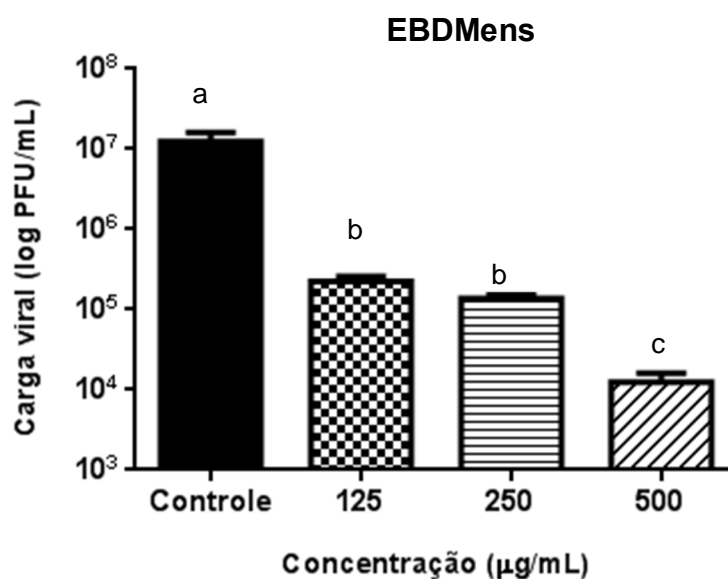
**Figura 22.** Efeito do EBDMens no tratamento das células Vero após a infecção pelo DENV-2. Os dados foram obtidos a partir do título viral pelo ensaio de redução de formação de placa 120h após a infecção. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a</sup>Letras iguais significam que não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações do extrato ( $p > 0.05$ ).

#### 4.6.2. Efeito do EBDMens no tratamento simultâneo à infecção.

O EBDMens foi avaliado quanto a sua capacidade de inibir a infecção das células Vero quando adicionado simultaneamente com o DENV-2 a monocamada celular. O possível efeito inibitório do extrato sobre a replicação do vírus foi determinado pela quantificação do número de cópias de RNA viral presente no sobrenadante da cultura celular, pelas técnicas de RT-qPCR e pela titulação do vírus através do ensaio de formação de placa de lise. Os resultados obtidos em PFU/mL e em cópias de RNA/mL estão representados, respectivamente nas figuras 23 e 24.

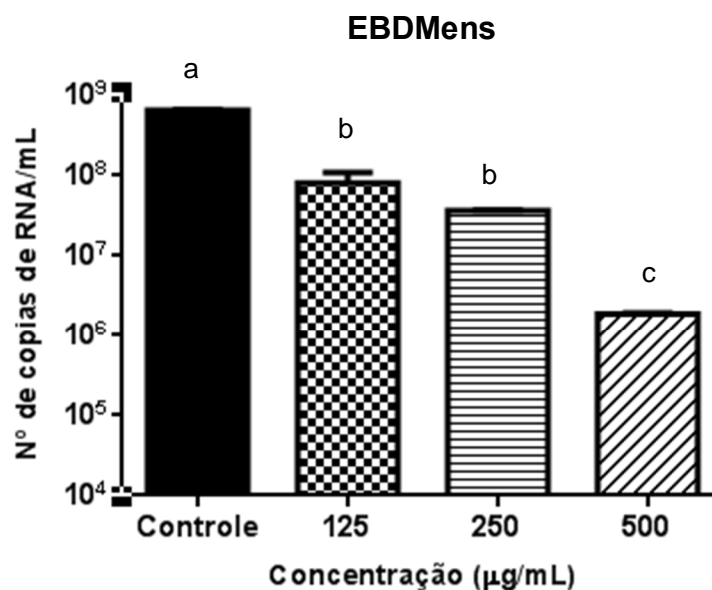
Na figura 23 pode se observar que a carga viral foi reduzida com o uso das concentrações do EBDMens em relação ao controle viral, contudo, esta redução não foi semelhante entre as concentrações utilizadas. Verifica-se que com as duas menores concentrações não há diferença no efeito observado.

Por outro lado, com o uso de 500  $\mu\text{g/mL}$ , há uma redução do título de vírus de  $\sim 10^7$  (controle) para  $\sim 10^4$ .



**Figura 23.** Efeito do tratamento simultâneo com EBDMens sobre a replicação do DENV-2 em células Vero. Os dados foram obtidos através da técnica de inibição da formação de placa de lise e expressos em PFU/ml. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do extrato ( $p < 0.005$ ).

Na figura 24 são apresentados os resultados obtidos a partir da quantificação do número de cópias do genoma do vírus pelo método de RT-qPCR. Pode-se verificar neste ensaio que os resultados foram muito semelhantes a aqueles observados com ensaio de redução de placa. Nota-se que com o uso das menores concentrações do EBDMens houve uma redução muito semelhante do número de cópias de RNA viral. Porém, como uso de EBDMens na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ , esta redução foi bem mais pronunciada.



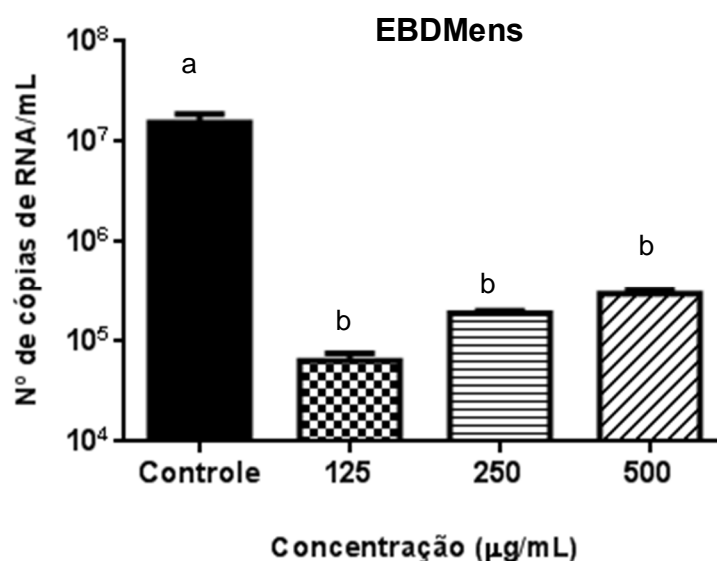
**Figura 24.** Efeito do tratamento simultâneo com EBDMens sobre a replicação do DENV-2 em células Vero. Os dados foram obtidos a partir da quantificação do RNA viral do sobrenadante por RT-qPCR, 120h após a infecção. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do extrato ( $p < 0,0001$ ).

Ao se observar as figuras 23 e 24, pode-se notar que os resultados de quantificação de RNA viral corroboram com os resultados de determinação do número de partículas infecciosas (PFU/mL). Nesse sentido, optou-se pelo método de RT-qPCR para as demais análises dos ensaios antivirais, em virtude de sua maior praticidade e rapidez na obtenção dos resultados reprodutíveis.

#### 4.6.3. Efeito do pré-tratamento da célula Vero com EBDMens antes da infecção pelo DENV2.

Para verificar se a ação inibitória apresentada pelo EBDMens no momento da infecção das células Vero (Figuras 23 e 24), era devido a capacidade do extrato conferir resistência às células contra a infecção viral, as células foram previamente tratadas com o extrato e depois desafiadas com DENV-2. Os resultados apresentados na figura 25 revelam que houve uma redução significativa do número de cópias do genoma viral nos sobrenadantes das culturas de células que foram pré-tratadas com todas concentrações do

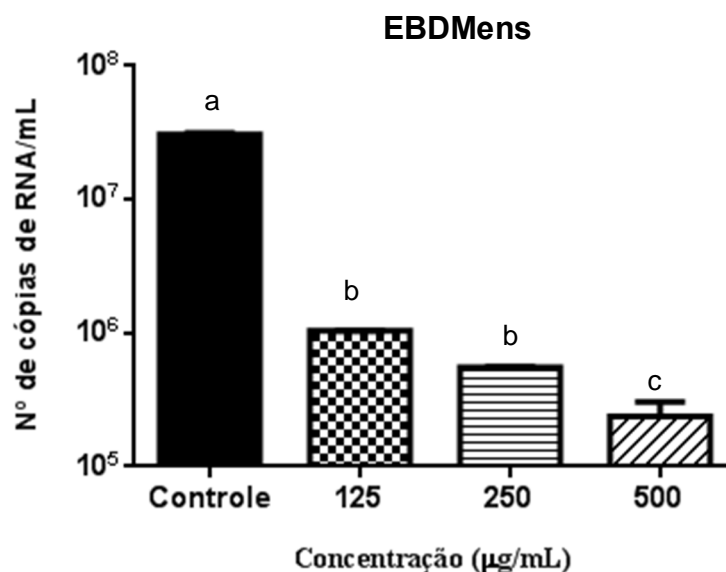
extrato testadas. Além disso, foi observado também que não houve diferença significativa entre o efeito das diferentes concentrações testadas.



**Figura 25.** Quantificação do número de cópias de RNA viral por RT-qPCR do sobrenadante das células Vero pré-tratadas com o EBDMens. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do extrato ( $p < 0,005$ ).

#### 4.6.4. Efeito do pré-tratamento do DENV-2 com EBDMens antes da infecção das células

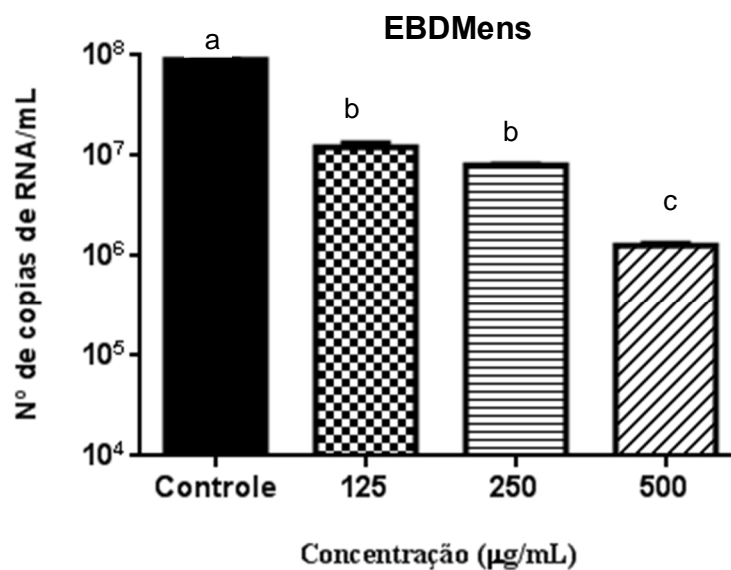
No ensaio de pré-tratamento do DENV-2 os vírus foram previamente tratados com diferentes concentrações de EBDMens, em um sistema isento de células e, em seguida esta preparação foi utilizada para infectar células Vero. Os resultados apresentados na figura 26 mostram que diferentes concentrações de EBDMens promoveram redução significativa do número de cópias do genoma viral nos sobrenadantes das culturas de células, indicando que nesta condição, o extrato inibiu de maneira significativa a infectividade viral. Observa-se ainda, que a ação inibitória do extrato sobre o DENV-2 se mostrou dependente da concentração utilizada.



**Figura 26.** Efeito pré-tratamento do DENV-2 com o EBDMens antes da infecção das células Vero. Os dados foram obtidos a partir da quantificação do RNA viral do sobrenadante por RT-qPCR 120 h após a infecção. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do extrato ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.6.5. Efeito do EBDMens na adsorção do DENV2 nas células Vero

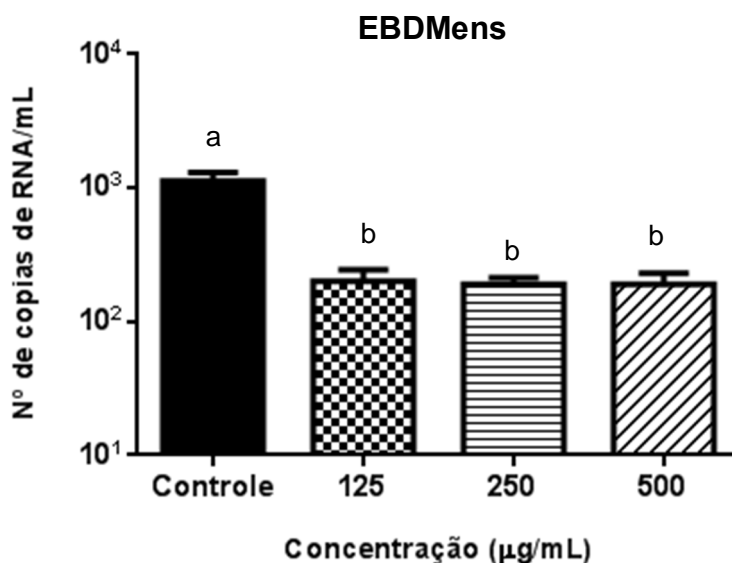
Os dados obtidos com os ensaios de pré-tratamento da célula e do vírus levou a hipótese de que o EBDMens poderia ter um efeito inibitório na adsorção das partículas virais aos receptores de superfície das células Vero. Nesse sentido, o efeito do EBDMens foi avaliado nesta etapa inicial do ciclo de replicação do vírus. Na figura 27, demonstra-se que as três concentrações testadas foram eficientes em reduzir significativamente o número de cópias do genoma viral no sobrenadante da cultura de células em relação ao controle e que este efeito foi mais acentuado quando utilizou-se a maior concentração do extrato. Estes dados indicam que o EBDMens interfere na adsorção do DENV-2 às células Vero.



**Figura 27.** Efeito do EBDMens na adsorção do DENV-2 em células Vero. Dados obtidos a partir da quantificação do RNA viral do sobrenadante por RT-qPCR 120h após a infecção. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do extrato ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.6.6. Efeito do EBDMens na após-adsorção do DENV2 nas células Vero.

Um novo ensaio foi realizado para avaliar se o extrato era capaz de deslocar as partículas virais previamente adsorvidas aos receptores das células. Após a adsorção do DENV-2 às células Vero, estas foram tratadas com as diferentes concentrações do EBDMens. Em seguida, o RNA viral foi extraído a partir do sobrenadante e quantificado pelo método de RT-qPCR. Os resultados estão representados na figura 28, onde se observa que a quantidade de cópias do RNA foi significativamente menor nas células tratadas do que no controle. Além disso, verifica-se que não houve diferença na quantidade de RNA quando se usou diferentes concentrações de EBDMens.



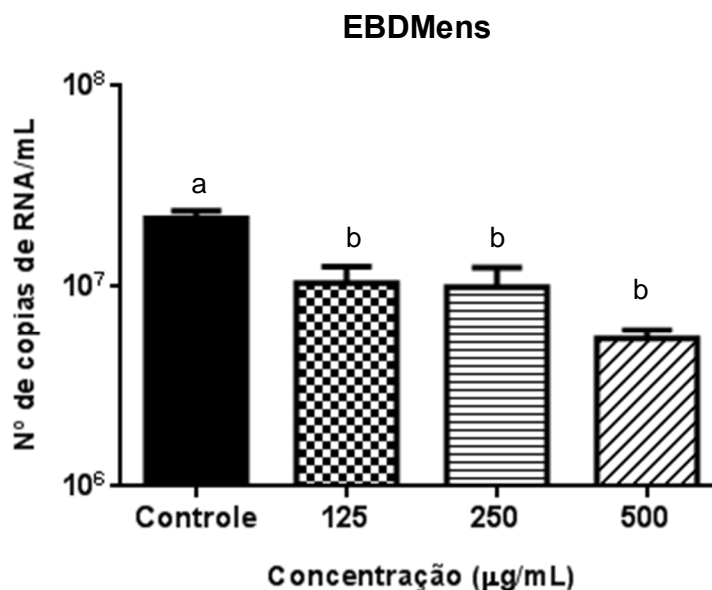
**Figura 28** Efeito do EBDMens no período pós-adsorção sobre o DENV-2 adsorvidos na membrana de células Vero. Os dados foram obtidos a partir da quantificação do RNA viral da superfície celular por RT-qPCR após 30 minutos de tratamento. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do extrato ( $p < 0,005$ ).

Esse resultado demonstra que a incubação com o extrato após a adsorção do vírus à célula, reduziu o número de cópias do RNA viral, que pode ser um reflexo de um decréscimo no número de partículas virais adsorvida à membrana das células Vero em virtude da dissociação dessas partículas pelo EBDMens.

#### 4.6.7. Efeito do EBDMens na penetração do DENV2 nas células Vero.

O processo de infecção inicial é dividido em duas etapas: adsorção e penetração. Portanto, avaliou-se também a ação do EBDMens no processo de internalização do DENV-2 pelas células Vero. Para esse fim, os vírus foram previamente adsorvidos as células, em seguida, elas foram tratadas com o extrato e incubadas 37 °C, temperatura que permite a entrada do vírus nas células. No final deste ensaio, a replicação viral foi determinada pela quantificação no número de cópias do genoma viral, presentes nos sobrenadantes das culturas. Os resultados apresentados na figura 29 mostram que houve uma redução do número de cópias de RNA viral nas células tratadas com as três concentrações do extrato utilizadas, quando comparadas

ao controle não tratado. Estes resultados sugerem que o extrato exerceu efeito inibitório sob o processo de penetração do DENV-2 em células Vero.



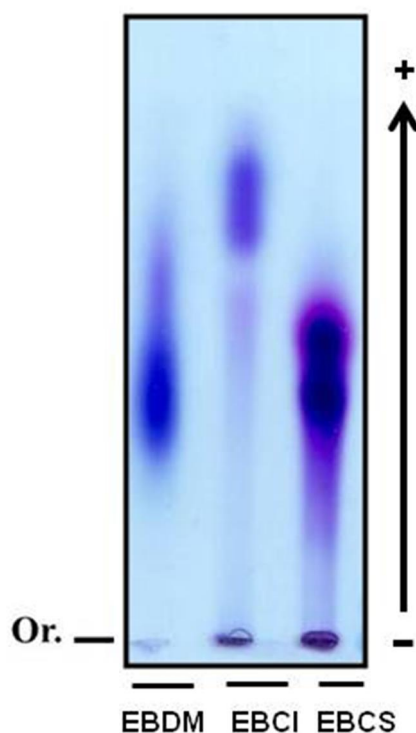
**Figura 29.** Efeito do EBDMens na penetração do DENV-2 em células Vero. Os dados foram obtidos a partir da quantificação do RNA viral do sobrenadante por RT-qPCR por 120h após a infecção. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do extrato ( $p < 0,005$ ).

## Parte II: Caracterização química, capacidade redutora do MTT e atividade antiviral de extratos obtidos de outras algas.

Como o extrato da alga *D. menstrualis* (EBDMens) exerceu boa atividade antiviral nas etapas iniciais do ciclo de replicação do DENV-2, decidiu-se investigar o potencial efeito inibitório do extrato de outras algas sobre o ciclo de replicação do vírus. Portanto, nesta segunda etapa do trabalho utilizou-se os extratos da alga marrom *Dictyota mertensii* (EBDM) e de duas Clorophytas *Codium isthmocladium* (EBCI) e *Caulerpa sertularioides* (EBCS), os quais foram submetidas à caracterização química, foram avaliadas quanto a interferência na capacidade redutora do MTT por células Vero e avaliadas quanto ao potencial antiviral através das seguintes estratégias metodológicas: Tratamento simultâneo à infecção, tratamento da célula antes da infecção, pré-tratamento do vírus, tratamento durante a adsorção e a penetração viral. Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

#### 4.7.1. Eletroforese em gel de agarose dos extratos EBDM, EBCI e EBCS

Na Figura 30 está representada a mobilidade eletroforética dos PS presentes nos extratos da alga marrom *Dictyota mertensii* (EBDM) e das Clorophytas *Codium isthmocladum* (EBCI) e *Caulerpa sertularioides* (EBCS). Como pode-se verificar na figura, estes extratos apresentam padrões de mobilidade eletroforética desiguais, cujas bandas coradas em diferentes tonalidades de roxo apresentam composições distintas de polissacarídeos sulfatados. Pode-se observar ainda que na banda do EBCS há uma maior intensidade de cor e uma maior polidispersão dos PSs.



**Figura 30:** Comportamento eletroforético dos extratos brutos das algas *D. mertensii*, *C. isthmocladum* e *C. sertularioides*. Alíquotas de 5  $\mu$ L (50  $\mu$ g) dos extratos foram aplicados em lâminas de agarose em tampão PDA 0,05 M pH 9,0. Após precipitação com CETAVLON as lâminas foram coradas com azul de toluidina. Or - origem. . Polo negativo. + Polo positivo.

#### 4.7.2. Caracterização química das amostras

Os dados resultantes das dosagens de açúcares totais, sulfato e de proteínas dos extratos EBDM, EBCI e EBCS estão sumarizados na tabela 4.

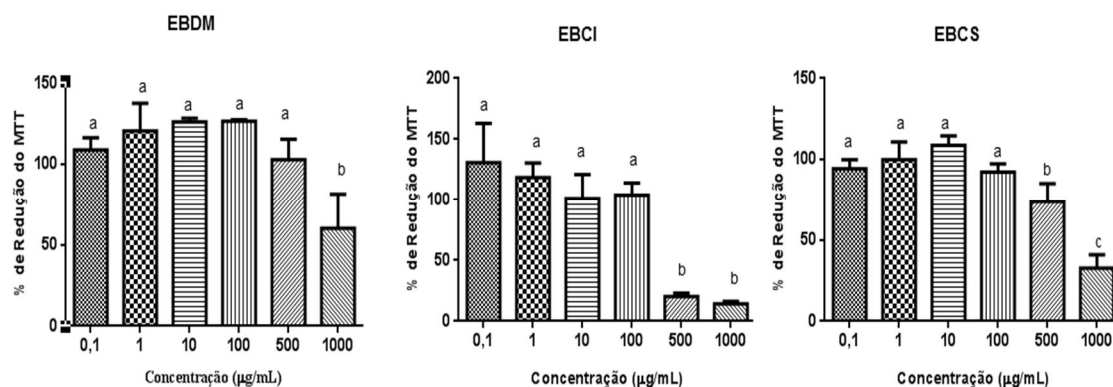
**Tabela 4.** Resultados das dosagens de açúcares totais, sulfato e proteína do EBDM, EBCI e EBCS.

| <b>Algas</b> | <b>Açúcares totais</b><br>% | <b>Sulfato</b><br>% | <b>Sulfato / Açúcar</b><br>%/% | <b>Proteína</b><br>% |
|--------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------------|----------------------|
| EBDM         | 39,0 ± 1,5                  | 10,4 ± 0,9          | 0,26                           | 0,1                  |
| EBCI         | 35,8 ± 1,7                  | 8,4 ± 0,4           | 0,23                           | Traços               |
| EBCS         | 55,6 ± 2,5                  | 29,6 ± 1,5          | 0,53                           | Traços               |

Quando se observa a tabela 2, verifica-se que a razão sulfato/açúcar dos extratos das algas marrom *D. mertensis* (EBDM) e verde *C. isthmocladium* (EBCI) são semelhantes, cujo valor determinado foi aproximadamente de 0,2, exceto para o extrato de *C. sertularioides* (EBCS), cuja razão sulfato/açúcar foi o dobro. Porém, deve-se se levar em conta, que no caso deste extrato, o teor de sulfato foi superior aos anteriormente citados.

#### 4.7.3. Capacidade redutora do MTT por células Vero quando expostas a EBDM, EBCI e EBCS.

Os resultados apresentados na figura 31 mostram que houve um decréscimo significativo da capacidade redutora do MTT das células Vero após 120 h de tratamento com todos os extratos (EBDM, EBCI e EBCS) quando se utilizou a concentração de 1000 µg/mL. Contudo, essa redução foi mais intensa quando as células foram tratadas com os extratos EBCI e EBCS, cuja capacidade redutora das células foi respectivamente, em torno de 80% e 60% menor em comparação com aquela observada com o controle.



**Figura 31.** Atividade redutora de MTT da linhagem de célula Vero exposta aos extratos EBDM, EBCI e EBCS por 120h. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do mesmo extrato ( $p < 0.005$ ).

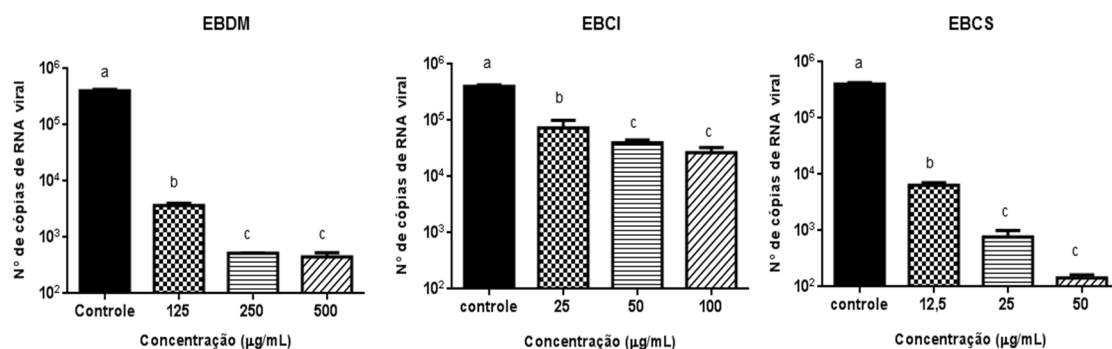
#### 4.7.4. Avaliação da potencial ação antiviral do EBDM, EBCI e EBCS

Após o ensaio de viabilidade celular as concentrações dos extratos foram definidas para a realização dos ensaios antivirais. Com o EBDM foram utilizadas as seguintes concentrações: 125, 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ . Já para EBCI e EBCS utilizou-se, respectivamente, as concentrações: (25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) e (12,5, 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ). Para a avaliação da potencial ação dos extratos contra o DENV2 foram realizados os seguintes ensaios: Tratamento simultâneo à infecção, tratamento da célula antes da infecção, pré-tratamento do vírus, tratamento durante a adsorção e a penetração viral. Como os procedimentos dos ensaios antivirais já foram previamente descritos e estão representados nos esquemas descritos em métodos, os resultados destes ensaios serão relatados de forma mais direta.

#### 4.7.5. Efeito do EBDM, EBCI e EBCS no tratamento simultâneo à infecção.

Quando os extratos foram adicionados às culturas de células Vero simultaneamente com o DENV-2, observou-se uma inibição significativa da replicação do vírus, especialmente para os extratos EBDM e EBCS. Os resultados apresentados na figura 32 mostram que os três extratos reduziram significativamente o número de cópias do genoma viral no sobrenadante das culturas, em relação ao controle não tratado. Além disso, a redução da replicação viral foi dependente da concentração até certo ponto, a partir do qual não houve mais redução. Os extratos EBDM e EBCS foram os que apresentaram melhores potenciais de ação contra o DENV-2 nas condições

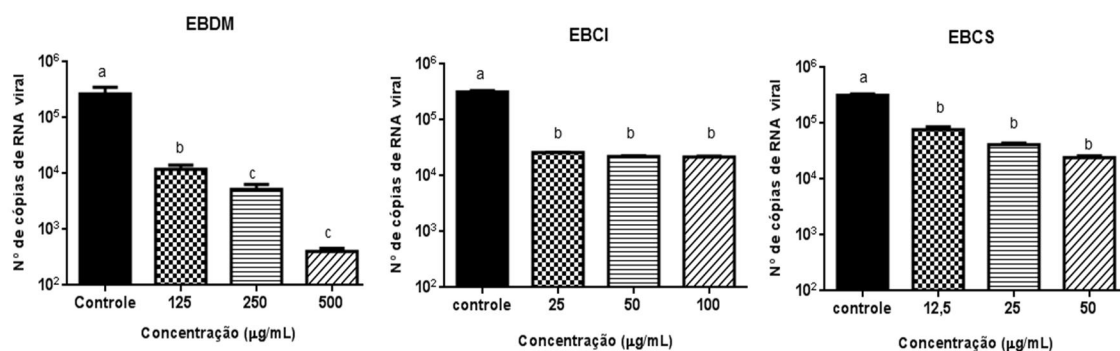
testadas. Porém, vale ressaltar que as concentrações do extrato de *D. mertensis* foi 10 vezes maior do que as utilizadas com *C. sertularioides*.



**Figura 32.** Efeito do tratamento simultâneo da célula com DENV-2 e com os extratos EBDM, EBCI e EBCS. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do mesmo extrato ( $p < 0.001$ ).

#### 4.7.6. Efeito do pré-tratamento da célula Vero com EBDM, EBCI e EBCS antes da infecção pelo DENV2

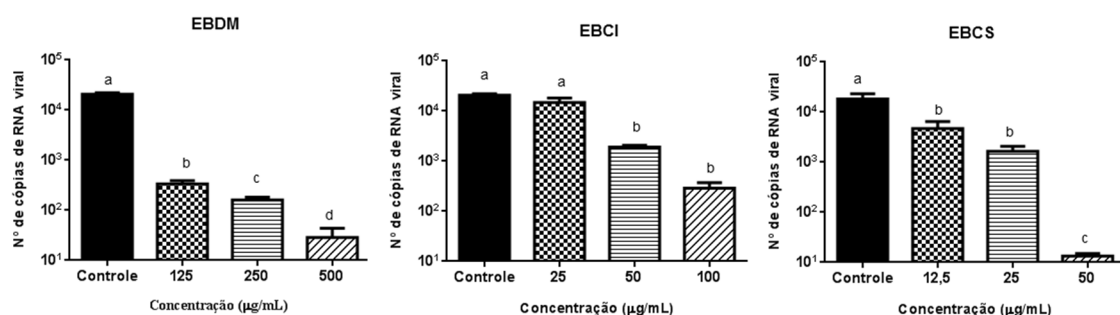
Como os extratos EBDM, EBCI e EBCS exerceram efeito inibitório sobre o DENV-2 no momento da infecção das células Vero, avaliou-se se a redução da infectividade viral era devido aos extratos conferirem resistência às células. Nesse sentido, a redução da infecção celular pelas diferentes concentrações dos extratos foi determinada por comparação entre o número de cópias de RNA viral presentes no sobrenadante das células Vero tratadas e o controle (não tratadas). Na figura 33 os resultados demonstram que houve uma redução significativa da replicação do DENV-2 em células Vero, previamente expostas às diferentes concentrações dos extratos testados, quando comparado ao controle não tratado. Observa-se também que o extrato EBDM apresentou atividade antiviral, cujo efeito aumentou proporcionalmente até a concentração de 250 µg/mL, enquanto que para os extratos EBCI e EBCS a ação inibitória da replicação do DENV-2 não respondeu com o aumento das concentrações testadas nos respectivos extratos.



**Figura 33.** Quantificação do RNA viral por RT-qPCR do sobrenadante das células Vero pré-tratadas com EBDM, EBCI e EBCS. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do mesmo extrato ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7.7. Efeito do pré-tratamento do DENV-2 com EBDM, EBCI e EBCS antes da infecção das células Vero

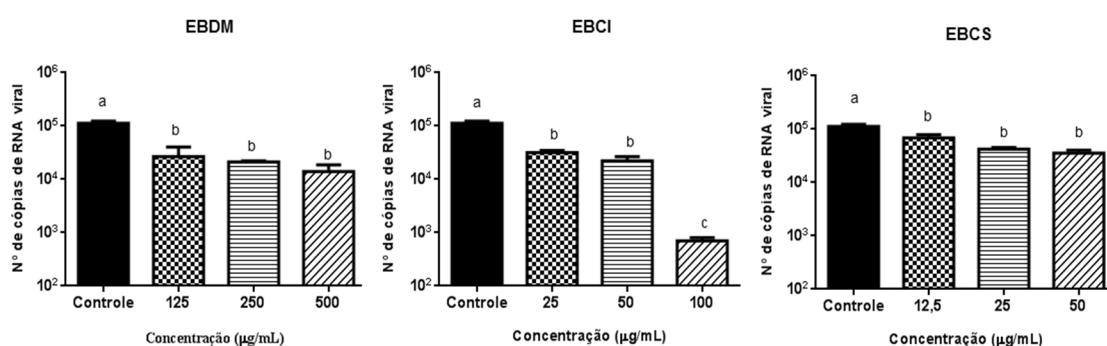
Os resultados da quantificação do RNA viral por RT-qPCR do sobrenadante das células Vero obtidos no ensaio de pré-tratamento do vírus com os extratos EBDM, EBCI e EBCS estão representados na figura 34. Esses resultados mostraram que os três extratos apresentaram efeito inibitório sobre o DENV-2. Porém, a intensidade do efeito não foi semelhante entre eles. O EBCI só apresentou atividade antiviral a partir da concentração de 50 µg/mL, não havendo alteração desse efeito com o aumento da concentração do extrato para 100 µg/mL. Por outro lado, os extratos EBDM e o EBCS apresentaram ação inibitória da replicação do DENV-2 a qual se mostrou proporcional ao aumento da concentração. Porém, vale destacar que esse efeito inibitório foi mais intenso quando foi utilizada a maior concentração de EBCS.



**Figura 34.** Efeito do pré-tratamento do DENV-2 com EBDM, EBCI e EBCS, antes da infecção das células Vero. Os dados foram obtidos a partir da quantificação do RNA viral do sobrenadante por RT-qPCR 120h após a infecção. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do mesmo extrato ( $p < 0.05$ ).

#### 4.7.8. Efeito dos extratos EBDM, EBCI e EBCS na adsorção do DENV2 nas células Vero

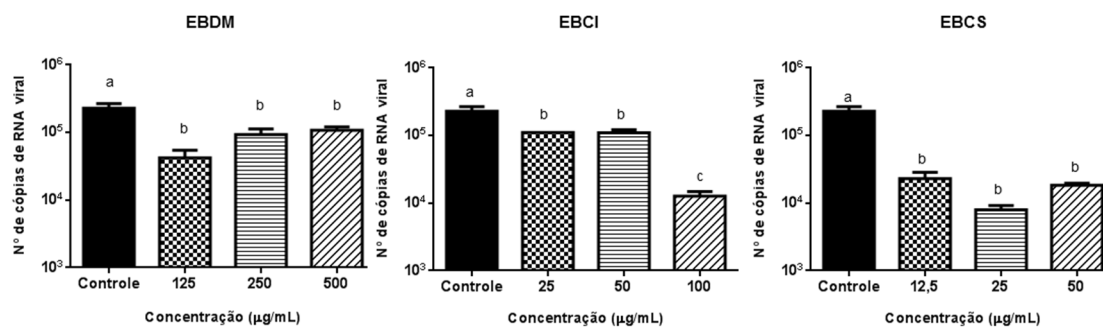
Avaliando-se os resultados referentes ao efeito dos extratos na adsorção do DENV-2 às células Vero, representados na figura 35, verifica-se que EBCS reduziu o número de cópias de RNA viral no sobrenadante. Porém, quando se analisa os resultados obtidos com todos os extratos, foi com esse que se obteve o menor índice de redução do número de cópias. Por outro lado, a maior redução do número de cópias de RNA viral foi verificada com o uso da maior concentração do EBCI.



**Figura 35.** Efeito do EBDM, EBCI e EBCS na adsorção do DENV-2 em células Vero. Os dados foram obtidos a partir da quantificação do RNA viral do sobrenadante por RT-qPCR 120h após a infecção. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do mesmo extrato ( $p < 0.005$ ).

#### 4.7.9. Efeito dos extratos EBDM, EBCI e EBCS na penetração do DENV2 nas células Vero

Avaliando-se o efeito dos extratos na etapa de penetração do DENV-2 nas células Vero, verifica-se na figura 36 que o EBDM reduziu o número de cópias do RNA viral no sobrenadante das culturas celulares. Contudo, esse efeito foi brando quando se compara ao observado com outros extratos, além disso, não houve diferença do efeito deste extrato mesmo nas concentrações mais elevadas. Com o EBCI e EBCS a redução do número de cópias de RNA viral foi 18 e 12,5 vezes, respectivamente, quando se utilizou as maiores concentrações.



**Figura 36.** Efeito do extrato do EBDM, EBCI e EBCS na penetração do DENV-2 em células Vero. Os dados foram obtidos a partir da quantificação do RNA viral do sobrenadante por RT-qPCR 120 h após a infecção. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações do mesmo extrato ( $p < 0.05$ ).

*Discussão*

## 5. DISCUSSÃO

A dengue é hoje a mais importante arbovirose emergente que afeta o homem e constitui-se em um grave problema de saúde pública. Portanto, não é estranho perceber que na literatura mundial exista um grande número de publicações que mostram a busca incessante por novas moléculas bioativas que possam ser utilizadas contra os vírus causadores da dengue. Dentro deste contexto, pode-se citar os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas (NEYTS *et al.*, 1992; WITVROUW; DE CLERCQ, 1997; DUARTE *et al.*, 2001; DAMONTE *et al.*, 2004).

Apesar desse quadro, nem todas as algas tiveram seus polissacarídeos avaliados. Por exemplo, no estado do Rio Grande do Norte tem-se o registro de mais de cem espécies de algas marinhas e nenhuma delas teve seus PS avaliados como agentes antivirais. Com intuito de começar a preencher este hiato no conhecimento dos PSs antivirais potiguares selecionou-se nesse trabalho 04 diferentes espécies de macroalgas marinhas encontradas no litoral do Rio Grande do Norte. Dentre elas duas são algas marrons da ordem Dictyotales (*Dictyota menstrualis* e *Dictyota mertensis*) e duas algas verdes da ordem Bryopsidales (*Codium isthmocladium* e *Caulerpa sertularioides*), obtendo-se extratos ricos em polissacarídeos sulfatados que foram avaliadas quanto ao seu potencial antiviral contra o vírus dengue 2 (DENV-2).

Estudos revelam que os extratos aquosos apresentam maior atividade antiviral quando comparado a outros solventes. Extratos aquosos, etanólicos, ácidos e alcalinos obtidos da alga marrom *Hydroclathrus clathrus* apresentaram atividade antiviral contra o HSV-1 e HSV-2, contudo o extrato aquoso foi o que revelou o maior potencial para o desenvolvimento de um agente antiviral (WANG; OOI; ANG, 2008). Rhimou e colaboradores (2010) revelaram que os extratos aquosos foram mais eficazes contra o HSV-1 em comparação aos extratos que utilizaram outros solventes orgânicos como o metanol-clorofórmio, diclorometano e o metanol. Por isso, neste estudo optou-se por trabalhar com os extratos aquosos das duas algas marrons e verdes supracitadas.

Inicialmente os trabalhos se concentraram com o extrato obtido de *D. menstrualis*, que aqui foi denominado de EBDMens, já que segundo dados não

publicados pelo grupo em que se insere esta tese, esta ocorre em abundância durante todo o ano no local de coleta escolhido. Os dados referentes a contaminação proteica existente em EBDMens foram bastante animadores, uma vez que foram menores que aqueles publicados por Costa e colaboradores (2010), que também obtiveram um extrato rico em polissacarídeos dessa mesma alga, utilizando o mesmo método de extração que foi utilizado nesta tese. Além disso, outros extratos ricos em polissacarídeos encontrados na literatura apresentam teores de proteínas bem mais elevados; por exemplo, Hussein e colaboradores (1980) encontraram em extratos de *Padina pavonia* um elevado teor de proteínas (67%), ou seja, havia mais proteínas do que polissacarídeos. Porém, vale salientar que no trabalho dos autores supracitados a proteólise não foi utilizada. Quando ela é utilizada os teores de contaminação proteica tendem a cair, por exemplo, Costa e colaboradores (2010) obtiveram extratos ricos em PSs de 11 diferentes espécies de algas e o teor de contaminação proteica foi sempre menor que 5%.

Há alguns métodos propostos na literatura para a obtenção de extratos ricos em PS, em suma, recomenda-se o uso de extrações a quente ou a frio, na presença de ácidos ou bases diluídos (WITVROUW; DE CLERCQ, 1997). Recentemente, Fidelis e colaboradores (2014) compararam estes métodos com o método utilizado nesta tese. Estes autores submeteram a mesma espécie de alga (*Gracilaria birdiae*) a diferentes condições de extração e mostraram que as condições de extrações em que havia a proteólise o teor de proteína era mais baixo em comparação aos demais. Portanto, o baixo teor de contaminação proteica encontrado em EBDMens pode ser atribuído ao uso da proteólise durante o processo de sua obtenção.

Outro fator que também pode ter influenciado o baixo teor de proteínas foi o solvente que foi utilizado para precipitar os PSs. Vidal e colaboradores (2010) compararam acetona, metanol e etanol como agentes precipitantes de PS da alga *Spatoglossum schröderi*, e verificaram que o metanol, dentre todos, era aquele que menos precipitava proteínas.

Estudos revelam que o emprego de diferentes métodos na extração de polissacarídeos sulfatados pode ocasionar variação nas suas características físico-químicas, uma vez que altas temperaturas (acima de 70 °C), ácidos, bases, ondas de ultrassom e micro-ondas podem causar quebras nas

estruturas dos PSs (CAMPO *et al.*, 2009), o que, por conseguinte, interfere nas propriedades farmacológicas dos PSs. Como essas quebras são aleatórias, as atividades identificadas podem nunca mais serem detectadas em estudos posteriores. O método utilizado no presente estudo para a obtenção do extrato bruto tem etapas brandas (temperatura baixa e extração aquosa), além disso, promove uma baixa contaminação por proteínas. Portanto, acredita-se que os resultados aqui obtidos possam ser confirmados por outros grupos de pesquisa.

Com relação ao teor de carboidratos, verifica-se que ele foi semelhante a aquele publicado por Costa e colaboradores (2010), ou seja, em torno de 42%. O teor de carboidratos em extratos ricos em polissacarídeos varia muito de alga para alga e em muitos casos esse teor não chega a mais de 50%. Estes valores são aceitáveis, pois deve-se ter em conta que extratos ricos em polissacarídeos sulfatados apresentam também em sua constituição o grupo sulfato, que no caso de EBDMens, corresponde a 10% do material. Além disso, deve-se ter em mente, que na solução para se realizar as dosagens de açúcares os PSs assumem forma salina e não a ácida, ou seja, para cada íon de sulfato é provável que tenhamos dois íons de sódio estabilizando a molécula, íons que no final levam a uma diminuição do teor de açúcares em EBDMens. Este fato ocorre mesmo com PSs purificados, como por exemplo a fucana, denominada de Fucana C, extraída da alga *D. menstrualis* apresentou o teor de açúcar de aproximadamente 57% (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013)

Depois da caracterização química do extrato EBDMens, este foi avaliado quanto ao seu potencial de citotoxicidade frente às células Vero, que são permissivas ao DENV-2. O ensaio de citotoxicidade deve ser realizado antes de se investigar a potencial atividade antiviral do extrato a ser testado. Pois, o candidato a antiviral deve inibir o ciclo de replicação do vírus, interferindo minimamente no metabolismo e na estrutura da célula hospedeira. É importante ressaltar que os testes de citotoxicidade *in vitro* são necessários nas pesquisas para descoberta de fármacos, pois além de definir a toxicidade celular basal do composto, eles também são importantes para determinar *a priori*, o tempo de exposição e a concentração do composto que deve ser utilizada (NILES; MORAVEC; RISS, 2008)

Neste trabalho, a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do MTT, um método sensível e quantitativo, simples, rápido e de baixo custo, bem caracterizado na literatura, e utilizado em larga escala para esse fim (NILES, MORAVEC; RISS, 2008). Nesse método se investiga a atividade metabólica das células viáveis, pela ação da desidrogenase mitocondrial, enzima que reduz os sais de tetrazólio o que leva a sua precipitação na forma de cristais de formazana (MOSSMAN, 1983).

Os dados dos ensaios de MTT levam a observação de que a presença do EBDMens não promove citotoxicidade as células Vero, pelo menos nas condições avaliadas. Portanto, não foi possível calcular a concentração citotóxica 50 (CC50), uma vez que a maior concentração testada (1 mg/mL) não apresentou citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada de células Vero. Dessa forma, a CC<sub>50</sub> foi considerada maior do que 1 mg/mL.

Citotoxicidade de PS de algas marrons frente a diferentes tipos celulares são descritas na literatura, principalmente contra diferentes linhagens celulares de origem tumoral (ALMEIDA-LIMA *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011). Mas especificamente, com relação às células Vero vários estudos têm demonstrado que os PSs isolados a partir de diferentes algas apresentam baixa citotoxicidade *in vitro* o que é consistente com os resultados obtidos neste estudo. Por exemplo, o extrato aquoso e a fucana CiF3 da alga marrom *Cystoseira indica*, também não apresentaram citotoxicidade contra células Vero, nas concentrações acima de 1 mg/mL (MANDAL *et al.*, 2007). Como também o fucoidan (heterofucana) isolado da alga *Cladosiphon okamuranus* não demonstrou citotoxicidade *in vitro* sobre as células Vero e o seu CC50 foi maior que 1,5 mg/mL (ELIZONDO-GONZALEZ *et al.*, 2012). Nesse mesmo ano, Pujol e colaboradores (2012) relataram que fucanas isoladas de duas algas marrons não afetaram a viabilidade das células Vero nas concentrações acima de 1 mg/mL. Especificamente com relação a *D. menstrualis*, foi encontrado um trabalho que avaliou a toxicidade de seus PSs, no caso, foi demonstrado que eles não apresentam toxicidade contra macrófagos murinos (cultivo primário) e células endoteliais de aorta de coelho (linhagem estabelecida) (Albuquerque *et al.*, 2013). Estes resultados corroboram com os encontrados nesta tese e indicam que os PS desta alga apresentam baixa citotoxicidade para diferentes linhagens celulares.

Uma vez que o EBDMens não apresentou citotoxicidade contra células Vero iniciou-se os ensaios antivirais. Uma forma de se investigar a potencial atividade antiviral de um composto é através do ensaio de unidade formadora de placa, um ensaio biológico amplamente utilizado para quantificação das partículas virais infecciosas, geradas a partir de um inoculo contendo um número previamente determinado de partículas virais infectantes. Ele baseia-se na capacidade de uma única partícula viral ao infectar uma célula gerar partículas que são transmitidas às células vizinhas, provocando a morte delas, originando uma zona de lise, que se traduz numa área clara denominada de placa. Dessa maneira, assume-se que cada placa formada se origina a partir da replicação de uma única partícula viral. Portanto, para se determinar o título viral, diluições decimais da amostra são adicionadas a monocamadas de células, que imediatamente são cobertas com um meio semissólido, que limita a dispersão das partículas virais, oriundas da célula inicialmente infectada. Dessa forma, após um período de incubação, as partículas virais se propagam apenas às células vizinhas e assim passam a formar focos de infecção ou placas que podem ser visualizadas e quantificadas macroscopicamente como áreas claras numa monocamada de células (FIELDS, 2013; BAER; KEHN-HALL, 2014).

Sendo assim, preliminarmente, realizou-se o ensaio pós-tratamento, a fim de detectar se o EBDMens apresenta ação antiviral após a infecção das células Vero pelo DENV-2. Os resultados mostraram que as diferentes concentrações do EBDMens testadas não exerceram efeito inibitório na replicação do DENV-2 quando foram adicionados uma hora e trinta minutos após a infecção da célula. Esta ausência de atividade antiviral do extrato pode ser verificada após 120 h de tratamento das células Vero. Este achado revela que o EBDMens não exerce efeito inibitório no ciclo de replicação do vírus após sua entrada na célula. Esse resultado leva a questionar se o extrato realmente não apresenta ação, ou se esta ausência de resposta poderia estar associada às concentrações do extrato utilizadas, as quais não foram capazes de conter a replicação viral, provavelmente, devido a quantidade de partículas virais geradas ao longo do experimento. Uma possibilidade para testar essa hipótese seria aumentar a concentração do extrato, porém deve-se ter em mente o problema da citototoxicidade e da solubilidade dos extratos em água, uma vez

que ela deve ficar em torno de 1 a 2 mg/mL (dados não mostrados). Esta ausência de ação antiviral também foi observada por Talarico e colaboradores (2007), quando eles incorporaram carragenanas às células Vero 2 h após a infecção das células por DENV-2. Porém, estes autores verificaram elevado efeito inibitório quando a carragenana foi adicionada às células juntamente com o vírus, corroborando com os resultados obtidos neste estudo, e que serão discutidos a seguir.

Estes resultados nos levam a acreditar que independente dos tipos de polissacarídeos sulfatados utilizados, eles não exercem efeito sobre o DENV-2 após a entrada do vírus na célula. Além disso, esses achados sugerem que o alvo da ação antiviral destes polissacarídeos sulfatados sejam os estágios iniciais do ciclo de replicação do vírus, o que sugere que eles atuam inibindo alguma etapa da infecção pelo DENV-2 que antecede a sua replicação, a qual se processa antes da segunda hora pós-infecção.

Visto que o EBDMens não apresentou atividade contra o DENV2, quando adicionado após a infecção das células Vero, procurou-se verificar então a sua ação durante as etapas iniciais da infecção.

Como se pode verificar na figura 23, o resultado do ensaio de unidade formadora de placa revelou efeito inibitório do EBDMens nas três concentrações testadas, resultando na redução da infectividade do DENV2. Não se identificou trabalhos que avaliaram outros extratos ricos em polissacarídeos obtidos de outras algas marrons. Contudo, verifica-se que fucanas, que foram purificadas de extratos, apresentam atividade antiviral. Por exemplo, uma fucana da alga *Cladosiphon okamuranus* composta por ácido glucurônico e fucose sulfatadas inibiu a infecção de células BHK-21 pelo vírus dengue tipo 2 (DENV-2), mas mostrou pouco efeito sobre os outros três sorotipos do vírus (DENV-1, DENV-3 e DENV-4) (HIDARI *et al.*, 2008). Ação mais específica contra DENV-2 também foi observada com uma galactana e uma carragenana extraídas de duas algas vermelhas, *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata*, respectivamente. Estes polissacarídeos reduziram a infectividade de DENV-2 em células Vero de forma mais efetiva do que contra DENV-3 e DENV-4 e foram completamente inativos contra a infecção pelo DENV-1 (TALARICO; DAMONTE, 2007; TALARICO *et al.*, 2011). Resultado semelhante foi observado por Pujol e colaboradores (2012), ou seja,

o DENV-2 foi o sorotipo mais susceptível aos PSs das algas do que os outros sorotipos. Em resumo, resultados obtidos no presente estudo em conjunto com os dados da literatura indicam que os PSs de algas são mais ativos contra DENV-2.

A fim de confirmar os resultados obtidos no ensaio de redução de placas, em células tratadas simultaneamente com o DENV-2 e o extrato da alga marrom *Dictyota menstrualis*, realizou-se uma RT-qPCR com base na quantificação do RNA viral do sobrenadante de células Vero infectadas pelo vírus. Os resultados obtidos mostraram que houve também redução do número de cópias de RNA viral. Contudo, comparando a análise quantitativa entre a RT-qPCR e os ensaios de redução de placa de lise observamos que houve uma diferença de 1 a 2 logs entre o número de cópias de RNA e de partículas infectantes. Essa diferença está de acordo ao observado na literatura em experimentos, no qual o número de cópias de RNA varia de 1 a 5 logs maiores do que os títulos de vírus infecciosos obtidos pelo ensaio de redução de placa (ROSE *et al.*, 1997; BAE *et al.*, 2003; RICHARDSON *et al.*, 2006; DASH *et al.*, 2012; CHOY *et al.*, 2013).

O número consistentemente mais elevado de cópias de RNA em relação ao título de vírus infecciosos é provavelmente causado pela presença de vírus não-infecciosos imaturos ou decorrente de partículas virais defeituosas (BAE *et al.*, 2003; RICHARDSON *et al.*, 2006; CHOY *et al.*, 2013). A clivagem de proteína prM do DENV não é completa em todos os vírions, o que gera uma proporção de vírus dengue totalmente imaturos, os quais não são infectantes (SCREATON *et al.*, 2015).

O ensaio de formação de placas de lise em monocamadas de células continua sendo um dos métodos mais precisos utilizados para a quantificação direta de vírions e na investigação de potenciais substâncias antivirais, uma vez que quantifica somente partículas viáveis, ou seja, que possuem capacidade de infectar células em cultivo (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013). Contudo, é importante ressaltar que a infectividade não corresponde necessariamente ao exato número de partículas virais numa preparação, visto que alguns vírus requerem que as células estejam em um estado metabólico específico ou em uma determinada fase do ciclo celular, assim se nem todas as células em uma cultura são idênticas nesse aspecto, apenas uma fração de

víriões infecciosos são capazes de infectar com sucesso uma célula e formar placas (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2013). Além disso, uma desvantagem desse método é que ele é complexo, laborioso e muito demorado, pois leva alguns dias para ser concluído.

Dada à dificuldade que se teve na padronização do ensaio de redução de placa, optou-se por quantificar a carga viral pelo método de PCR em tempo real (RT-qPCR), técnica que foi descrita por Higuchi e colaboradores, em 1993. Dentre as vantagens desse sistema é que ele não requer a manipulação após a amplificação, a redução do tempo necessário para a realização do teste e o baixo risco de contaminação do produto amplificado (NIESTERS, 2001).

Nos últimos 20 anos, a PCR em tempo real tem se tornado o método de escolha, para a detecção e quantificação do RNA viral no diagnóstico da infecção por DENV (LANCIOTTI *et al.*, 1992; JOHNSON; RUSSELL; LANCIOTTI, 2005), cuja carga de vírus dengue é determinada tanto *in vitro* como *in vivo* (CHOY *et al.*, 2013). As vantagens da PCR em tempo real em relação ao ensaio de formação de placa de lise são a rapidez, reprodutibilidade e a sensibilidade.

Dito isso, e como os resultados da quantificação de RNA viral determinados por RT-qPCR foram semelhantes aos obtidos com o ensaio de redução de placa, optou-se por trabalhar com a primeira técnica.

Como o EBDMens apresentou atividade antiviral no ensaio de tratamento simultâneo surgiram questionamentos referentes aos seus alvos moleculares. Dessa forma, decidiu-se por avaliar também o efeito dele no bloqueio de receptores da célula, neutralização do vírus, isto é, e nas etapas iniciais da infecção pelo do DENV-2 (adsorção e penetração), usando a RT-qPCR.

O ensaio de pré-tratamento das células Vero foi realizado a fim de verificar se a pré-incubação dessas células com EBDMens conferiria proteção às células contra a infecção pelo DENV-2. Como visto na figura 25 a presença do extrato reduziu o número de cópias do RNA viral em relação ao controle. Uma possível interpretação desses resultados é que embora exista heparan sulfato expresso na superfície das células Vero, os polissacarídeos sulfatados do extrato poderiam estar interagindo com a superfície das células, e de algum modo causando um impedimento estérico, que bloquearia a ligação do DENV-2

aos receptores de heparam. Outra hipótese seria que o polissacarídeo ligado a superfície da célula estaria competindo com o heparam sulfato pela interação com o vírus e, assim impedindo a penetração viral. Este mesmo efeito inibitório contra o DENV-2 também foi observado, quando células de mosquito C636 foram pré-tratadas com uma iota-carragenana (Talarico *et al.*, 2007). Harden e colaboradores (2009) da mesma forma mostraram que extratos obtidos a partir de diferentes algas quando foram pré-incubadas com células HFF, inibiram de forma eficiente a ligação do vírus herpes simples às células, mesmo quando foram removidos antes da infecção viral. Estes autores afirmaram que os PS presentes nos extratos foram responsáveis por este efeito.

Uma vez que o EBMens reduziu a infectividade do vírus no ensaio de pré-tratamento da célula por se associar a ela, questionou-se se este efeito de bloqueio também poderia estar ocorrendo na partícula viral. Dessa forma, o DENV-2 foi pré-tratado com EBMens, e esta suspensão foi posteriormente utilizada para infectar as células Vero. Os resultados deste experimento mostraram que o extrato exerceu um efeito de neutralização da atividade infectante do vírus. Uma possível explicação para esse resultado é que o extrato inibe competitivamente a adsorção do DENV-2 ao heparam sulfato celular, pois se liga provavelmente a proteína E do vírus. Alguns estudos mostraram que carragenana possui uma ação de bloqueio contra alguns vírus envelopados, o que faz com que eles percam a capacidade para infectar as células, reduzindo a carga viral. Carlucci e colaboradores (2004) revelaram que a -carragenana pode ligar-se firmemente ao vírus herpes simples (HSV), inativando-o e conseqüentemente inibindo a sua internalização. Além disso, Harden e colaboradores (2009) relataram que fucanas e carragenanas derivadas de alga marrom e vermelha, respectivamente, foram capazes de inativar diretamente o HSV-2 em baixas concentrações. Pujol e colaboradores (2002) demonstraram que a DL-galactana extraída da alga vermelha *Gymnogongrus torulosus*, também exerceu efeito inibidor direto contra o vírus DENV2.

Corroborando com esta hipótese a afirmação de Damonte e colaboradores (2004), ou seja, atividade de bloqueio dos vírus mediada pelos polissacarídeos sulfatados é causada pela formação de um complexo estável entre o polissacarídeo sulfatado e a glicoproteína externa do envelope viral, cuja

ligação é irreversível e, por conseguinte ocorre a perda da capacidade deles infectarem as células, de um modo semelhante ao processo de neutralização mediada por anticorpos específicos.

Estudos revelam que alguns polissacarídeos de algas podem interferir com o processo de interação do vírus com a célula, quer através da interação com vírus ou por interação com receptores para o vírus expressos na superfície da célula hospedeira (TALARICO; DAMONTE, 2007; HARDEN *et al.*, 2009; PUJOL *et al.*, 2012). Até o momento demonstrou-se que o EBDMens apresenta esses mesmos mecanismos de ação. Então, o próximo questionamento foi se o extrato estaria impedindo a adsorção viral, a penetração ou essas duas etapas iniciais do ciclo de replicação viral.

O resultado do ensaio de adsorção mostra que o EBDMens reduz a interação do DENV2 com as células Vero. Para poder entender o que estaria acontecendo deve-se ter em mente que o vírus para se ligar à célula depende da integridade da proteína E. Portanto, o PS ao interagir com esta molécula, poderia provocar alguma alteração em sua estrutura, e conseqüentemente diminuir a eficiência da adsorção viral conforme observado neste estudo. Vale salientar, que este impedimento não é de cem por cento, porque dentre outros motivos o vírus pode penetrar na célula por outros mecanismos como muito bem descrito pelo grupo de Damonte e colaboradores (2008; 2015).

Este tipo de mecanismo de ação não é exclusividade do PS do extrato aqui estudado, pois outros pesquisadores também mostraram este efeito. Como por exemplo, Pujol e colaboradores (2012), relataram que de diversas classes de polissacarídeos sulfatados obtidos de algas vermelhas, marrons e verdes apresentaram atividade antiviral contra o DENV-2 durante o ensaio de adsorção.

Talarico e Damonte (2007) também relataram que as carragenanas e podem interferir com os processos de adsorção do DENV-2 nas células hospedeiras e, elas são apenas eficazes quando adicionadas simultaneamente com o vírus ou pouco tempo após a inoculação do vírus. Eles sugerem que apesar do DENV poder entrar nas células hospedeiras, na presença das carragenanas, o mecanismo de inibição desses polissacarídeos pode ser devido a interferência no processo de fusão subsequente à formação do endossomo, o que impede a liberação do nucleocapsídeo viral para o

citoplasma da célula. Esta ação inibitória da  $\iota$ -carragenana no processo de fusão do vírus dengue poderia ser atribuída à interação direta das carragenanas com a glicoproteína E do envelope viral (TALARICO *et al.*, 2005; TALARICO; DAMONTE, 2007; TALARICO *et al.*, 2007).

Realizou-se o ensaio de pós-adsorção viral, a fim de se investigar se o EBDMens era capaz de dissociar o DENV-2 já adsorvido aos receptores da célula Vero. Na figura 28, verifica-se que independente da concentração o extrato foi capaz de reduzir o número de cópias do RNA viral, porém este efeito não aumentou com o aumento da concentração. Uma possível explicação para este evento é que existiria mais de um receptor para o vírus na superfície da célula, um de maior afinidade, que seria o receptor de heparan sulfato, bem descrito na literatura (CHEN *et al.*, 1997; HUNG *et al.*, 1999; HILGARD; STOCKERT, 2000; GERMI *et al.*, 2002), e pelo menos mais um receptor que teria menor afinidade pelo vírus (MARTÍNEZ-BARRAGÁN; DEL ANGEL, 2001). Desse modo, hipotiza-se que o extrato seria capaz de dissociar o vírus que estava adsorvido ao receptor de menor afinidade e não atuaria, pelo menos nas condições avaliadas sobre a interação do vírus com o receptor de heparan sulfato. Um possível candidato como alvo para ação do EBDMens neste experimento seria uma proteína de 74 kDa presente em células Vero, descrita por Martínez-Barragán e del Angel em 2001. Além disso, diversos outros receptores de origem proteica foram descritas em outras linhagens celulares de mamíferos (CASTILLA; PICCINI; DAMONTE, 2015).

Avaliando-se os resultados (figura 29) referentes ao efeito de EBDMens, na internalização do DENV-2 em células Vero pode-se verificar que ele também reduziu a penetração do vírus na célula. Tomando como base o que foi proposto por Talarico e colaboradores (2007) uma explicação para a inibição do processo de fusão do DENV mediada por PS, poderia ser devido ao fato de o EBDMens se ligar à glicoproteína E em diferentes sítios, podendo bloquear ou não a adsorção das partículas virais aos receptores das células. Assim, o PS atuaria impedindo apenas parcialmente a adsorção das partículas virais aos receptores de superfície das células. Dessa forma, uma parte dos vírus não se liga aos receptores das células ao serem tratados com os PS. Porém, em uma outra parte deles, o PS não estaria impedindo a adsorção das partículas à superfície das células, as quais seriam internalizadas por meio de endocitose

com a formação da vesícula endocítica, mas seriam impedidas de fazer a fusão com a membrana do endossoma. Assim, os PS poderiam estar se ligando à superfície viral, em diferentes sítios da glicoproteína E, de forma que não promove um bloqueio alostérico de todos os sítios das partículas virais, permitindo que sítios livres da glicoproteína E possam interagir com os receptores celulares, levando a adsorção e penetração na célula. No entanto, mesmo sendo internalizados os vírus uma vez no interior do endossoma da célula, seriam impedidos de fazer a fusão entre o envelope viral e a membrana do endossoma pela ação do EBDMens, havendo assim o bloqueio da liberação dos nucleocapsídeos virais para o citoplasma da célula, conforme proposto por Talarico e colaboradores (2007). Tomando como base essa hipótese, acredita-se que as interações eletrostáticas entre o EBDMens e os aminoácidos carregados positivamente na proteína E, podem estar bloqueando a mudança conformacional desta proteína, em pH baixo, de modo a impedir a exposição do peptídeo de fusão. Outra possível explicação para esse fenômeno é que a interação EBDMens-E pode de alguma forma estar inibindo a interação hidrofóbica entre o peptídeo de fusão e a membrana do endossoma em pH baixo e, dessa forma, impedindo a liberação do nucleocapsídeo viral para o citoplasma.

Após verificar que o extrato da alga *D. menstrualis* (EBDMens) exerceu boa atividade antiviral nas etapas iniciais do ciclo de replicação do DENV-2, investigou-se também o potencial efeito inibitório dos extratos de outras algas. Nesta etapa do trabalho utilizou-se os extratos EBDM obtido da alga marrom *Dictyota mertensii* e EBCI e EBCS, extraídos, respectivamente, das Clorophytas *Codium isthmocladium* e *Caulerpa sertularioides*.

Na tabela 04 apresentou-se os dados das análises químicas aqui realizadas. O outro único grupo que também trabalhou com esses extratos foi Costa (2012). Quando se comparou os resultados deste estudo referentes à composição química dos extratos observou-se que estes são diferentes dos encontrados por aquele grupo. Situações semelhantes já foram abordadas por outro autores, que mostram que essas variações são comuns e ocorrem devido a variação sazonal (COSTA *et al.*, 2012).

Depois da caracterização química dos extratos das algas, estes foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico frente às células Vero. Em relação

aos extratos das algas verdes, pode-se observar um comprometimento da viabilidade celular nas duas maiores concentrações (500 e 1000 µg/mL) testadas, contudo ele foi mais acentuado, quando a célula foi exposta ao extrato da alga *C. isthmocladium* (EBCI). Lee e colaboradores (2004) avaliaram a citotoxicidade de polissacarídeos sulfatados purificados de 10 algas verdes, dentre elas Clorophytas do gênero *Caulerpa* e *Codium*, as quais apresentaram baixa citotoxicidade para células Vero, cujo IC50 foi maior do que 2.900 µg/mL. Pujol e colaboradores (2012) também confirmaram a baixa citotoxicidade de polissacarídeos sulfatados obtidos da alga verde *Caulerpa racemosa* com IC maior que 1.000 µg/mL. Essa diferença de toxicidade observada por outros autores em relação a aquela verificada neste trabalho, pode ser explicada pelas pequenas diferenças estruturais dos polissacarídeos sulfatados avaliados. Corroborando com essa hipótese, o fato de que vários autores mostraram que o mesmo polissacarídeo sulfatado obtido da mesma espécie, mas que cresceu em local diferente ou em época diferente, pode ter pequenas variações estruturais, e estas por sua vez, aumentam ou diminuem a atividade/toxicidade do polissacarídeo em questão (HONYA *et al.*, 1999)

Com relação ao ensaio de tratamento simultâneo, pode-se afirmar que todos os extratos foram eficientes em reduzir a infectividade do DENV-2 e verifica-se também que este decréscimo foi gradativo em resposta ao aumento da concentração dos diferentes extratos. Porém, salienta-se que a ação antiviral foi mais acentuada quando o DENV-2 foi tratado com EBCS e EBDM. Cabe destacar que as concentrações do EBCS são 10 x menores do que o EBDM, evidenciando-se um maior efeito do primeiro extrato. Inclusive, ele foi mais potente do que EBDMens.

Verificou-se ainda que EBDM, EBCI e EBCS apresentaram atividade contra DENV-2, quando este vírus foi pré-tratado com todos os extratos. Estes resultados se assemelham aqueles encontrados com os ensaios de tratamento simultâneo, evidenciando-se que os extratos exercem um efeito de inativação direta do vírus. Novamente, o efeito antiviral foi mais acentuado quando os vírus foram pré-tratados com EBDM e EBCS, sendo mais intenso com o último extrato.

Quando se observa a composição química dos extratos verifica-se que EBCS apresentou o maior teor de sulfato dentre todos eles, ainda, a razão

sulfato/açúcar desse extrato, também foi a maior observada, sendo cerca de duas vezes daquela determinada com os outros extratos. É relatado por muitos autores que a presença de moléculas altamente carregadas em extratos os tornariam mais eficientes em interferir com as interações eletrostáticas entre as cargas positivas da região de uma glicoproteína viral e as cadeias carregadas negativamente do heparam sulfato (GHOSH *et al.*, 2009a). Portanto, crê-se que a maior atividade antiviral observada com EBCS se dá devido a sua maior quantidade de sulfato.

No ensaio de pré-tratamento das células foi com o uso de EBDM que se obteve os melhores resultados, inclusive os resultados foram melhores do que os obtidos com o extrato da outra alga marrom utilizada neste estudo: EBDMens. A razão sulfato/açúcar desses dois extratos é muito semelhante, o que, portanto, não explicaria esta diferença de atividade. Contudo deve-se ter em mente que muitas vezes não só o teor de sulfato é fundamental para que se tenha uma atividade. Por exemplo, é mostrado que a distribuição dos grupos sulfato ao longo da cadeia é outro fator importante para que um polissacarídeo sulfatado venha apresentar maior ou menor atividade antiviral, uma vez que um baixo grau de sulfatação não necessariamente elimina a possibilidade de haver zonas altamente carregadas no esqueleto do polissacarídeo (GHOSH *et al.*, 2009a). Essa afirmação leva a proposição de que o EBDM apresente polímeros de sulfatos que tenham em sua estrutura microrregiões que sejam mais sulfatados, e que, portanto, dariam a esse extrato maior atividade em comparação ao EBDMens, que provavelmente, não teria essas regiões ou as teria em menor quantidade.

Os extratos EBDM, EBCI e EBCS foram avaliados quanto a sua capacidade de exercer efeito antiviral nas duas etapas da fase inicial do ciclo de replicação (adsorção e penetração) do DENV2. Os resultados demonstraram que todos os extratos foram capazes de reduzir tanto adsorção quanto a penetração do vírus em células Vero (figuras 35 e 36). Contudo, verifica-se que a interferência na penetração do vírus foi mais intensa quando se utilizou o EBCS. Este resultado corrobora com os achados nos ensaios de tratamento simultâneo e no bloqueio do vírus. Demonstrando que o EBCS deve atuar nas etapas iniciais do ciclo de replicação viral.

*Conclusão*

## 6. CONCLUSÕES

1. Obteve-se quatro extratos brutos, ricos em polissacarídeos sulfatados e com baixa contaminação proteica, das macroalgas marrons *D. menstrualis* (EBDMens) e *D. mertensii* (EBDM) e das macroalgas verdes *C. isthmocladium* (EBCI) e *C. sertularioides* (EBCS). O EBCS foi o extrato que apresentou maior teor de sulfato.
2. Os extratos brutos EBDMens, EBDM, EBCI e EBCS não afetaram a viabilidade das células Vero na concentração de até 100 µg/mL.
3. O EBDMens não exerceu efeito inibitório na replicação do DENV-2, quando adicionado após a infecção de células Vero.
4. Todos os extratos inibiram a infecção viral nos ensaios de tratamento simultâneo, reduzindo de forma significativa o número de cópias de RNA viral quando comparado ao controle. Estes resultados indicam que eles atuam nas fases iniciais da infecção por DENV-2.
5. Os extratos EBDMens e EBDM foram mais eficientes nos ensaios de pré-tratamento da célula e do vírus, e o primeiro exerceu atividade antiviral superior ao EBDM durante a adsorção viral.
6. Os extratos EBCI e EBCS apresentaram atividade antiviral semelhante no ensaio de pré-tratamento da célula. O EBCI foi mais eficaz na redução da adsorção do DENV-2 em células Vero, porém o EBCS se mostrou mais eficiente nos ensaios de pré-tratamento do vírus e penetração.
7. Os resultados obtidos neste estudo preliminar sugerem que o EBCS é o extrato mais promissor no combate ao DENV-2.

8. Os dados sugerem que os extratos brutos ricos em polissacarídeos sulfatados devem atuar de forma profilática contra o DENV-2.

*Referências  
Bibliográficas*

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, M.; PADMANABHAN, R. De Novo Synthesis of RNA by the Dengue Virus RNA-dependent RNA Polymerase Exhibits Temperature Dependence at the Initiation but Not Elongation Phase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39926. 39937, 2001.
- ACOSTA, E. G.; TALARICO, L. B.; DAMONTE, E. B. Cell entry of dengue virus. **Future Virology**, v. 3, n. 5, p. 471. 479, 2008.
- ADHIKARI, U. et al. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 22, p. 2474. 2482, 2006.
- ALBUQUERQUE, I. R. L. et al. Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 2, p. 167. 171, 2004.
- ALBUQUERQUE, I. R. L. et al. Evaluation of Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Activities of a Heterofucan from *Dictyota menstrualis*. **marine drugs**, v. 11, p. 2722. 2740, 2013.
- ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376. 381, 2002.
- ALEN, M. M. F.; SCHOLS, D. **Dengue virus entry as target for antiviral therapy** *Journal of Tropical Medicine*, 2012.
- ALMEIDA-LIMA, J. et al. Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 7, p. 708. 715, 2010.
- ALVES, L. G. **Polissacarídeos ácidos presentes no folíolo, talo e flutuador da alga marinha *Sargassum vulgare***. [s.l.] - Universidade Federal do Rio Grande do Norte-UFRN, 2000.
- ARUNACHALAM, N. et al. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 127, n. 4, p. 395. 397, 2008.
- AVIRUTNAN, P. et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 8, p. 1078. 1088, 2006.
- BABA, M. et al. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus,

vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 11, p. 1742. 1745, 1988.

BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, A. Dengue viruses - an overview. **Infection ecology & epidemiology**, v. 3, p. 1. 21, 2013.

BAE, H. G. et al. Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. **J Virol Methods**, v. 110, n. 2, p. 185. 191, 2003.

BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 93, p. e52065, 2014.

BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 53. 72, 2008.

BELTRAMELLO, M. et al. The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. **Cell Host and Microbe**, v. 8, n. 3, p. 271. 283, 2010.

BENARROCH, D. et al. **The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue ...Virology**, 2004.

Disponível em:

<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list\\_uids=9459595523407701043related:M2SXawl8R4MJ\http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682204004635](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=9459595523407701043related:M2SXawl8R4MJ\http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682204004635)>

BERTEAU, O.; MULLOY, B. **Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide***Glycobiology*, 2003.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504. 507, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248. 254, 1976.

BRADY, O. J. et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.

BRANCO, M. S. D. et al. Dengue in the State of Rio Grande do Norte, Brazil, 2010. 2012. **Tropical Medicine & International Health**, v. 20, n. 12, p. 1707. 1710, 2015.

CAMARA, R. B. G. et al. Heterofucans from the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* with anticoagulant and antioxidant activities. **Marine Drugs**, v. 9, n. 1, p. 124. 138, 2011.

CARLUCCI, M. J. et al. Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 137. 141, 2004.

CAROLINA DE LA GUARDIA RICARDO LLEONART. Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors. **BioMed Research International**, p. 1. 13, 2014.

CASTILLA, V.; PICCINI, L. E.; DAMONTE, E. B. Dengue virus entry and trafficking: perspectives as antiviral target for prevention and therapy. **Future Virol**, v. 10, n. 5, p. 625. 645, 2015.

CHAMBERS, T. J. et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual review of microbiology**, v. 44, p. 649. 688, 1990.

CHEN, Y. et al. **Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate** *Nature medicine*, 1997.

CHOY, M. M. et al. Short report: Comparison of the mosquito inoculation technique and quantitative real time polymerase chain reaction to measure dengue virus concentration. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 5, p. 1001. 1005, 2013.

CLUM, S.; EBNER, K. E.; PADMANABHAN, R. Membrane Insertion of the Serine Proteinase Precursor NS2B-NS3(Pro) of Dengue Virus Type 2 Is Required for Efficient in Vitro Processing and Is Mediated through the Hydrophobic Regions of NS2B. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 272, n. 49, p. 30715. 30723, 1997.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of virology**, v. 80, n. 23, p. 11418. 11431, 2006.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369. 374, 1985.

COSTA, L. S. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 64, n. 1, p. 21. 28, 2010.

COSTA, L. S. et al. Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa cells. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 603. 614, 2011.

COSTA, M. S. S. P. et al. Evaluating the possible anticoagulant and antioxidant effects of sulfated polysaccharides from the tropical green alga *Caulerpa cupressoides* var. *flabellata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 1159. 1167, 2012.

CRILL, W. D.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **Journal of virology**, v. 75, n. 16, p. 7769. 73, 2001.

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. **Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells** **FEMS microbiology reviews**, 2015.

DA CUNHA, R. V. et al. Secondary dengue infection in schoolchildren in a dengue endemic area in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 6, p. 517. 521, 1995.

DALRYMPLE, N.; MACKOW, E. R. Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. **Journal of virology**, v. 85, n. 18, p. 9478. 9485, 2011.

DAMONTE, E. B. et al. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 18, p. 2399. 2419, 2004.

DASH, P. et al. Development of a SYBR green I based RT-PCR assay for yellow fever virus: application in assessment of YFV infection in *Aedes aegypti*. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 27, 2012.

DE ALWIS, R. et al. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, 2011.

DE LA GUARDIA, C.; LLEONART, R. **Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors** **BioMed Research International**, 2014.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 745. 748, 2010.

DIETRICH C P; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem., United States**, v. 70, n. 2, p. 645. 647, 1976., 1976.

DIETRICH, C. P. et al. A new approach for the characterization of polysaccharides from algae: presence of four main acidic polysaccharides in three species of the class Phaeophyceae. **Plant Science**, v. 108, n. 2, p. 143. 153, 1995.

DIETZ, V. J. et al. Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: evaluation of a clinically based dengue surveillance system. **American journal of epidemiology**, v. 131, n. 4, p. 693. 701, 1990.

DODGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochem. J**, v. 84, p. 106. 110, 1962.

DREYFUSS, J. L. et al. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein

interactions and cell signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 409. 429, 2009.

DUANGCHINDA, T. et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 39, p. 16922. 7, 2010.

DUARTE, M. E. R. et al. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. **Carbohydrate Research**, v. 333, n. 4, p. 281. 293, 2001.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350. 356, 1956.

ELIZONDO-GONZALEZ, R. et al. In vitro characterization of the antiviral activity of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* against Newcastle Disease Virus. **Virology journal**, v. 9, p. 307, 2012.

FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of virology**, v. 65, n. 5, p. 2467. 2475, 1991.

FARIAS, E. H. C. et al. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. **Glycobiology**, v. 18, n. 3, p. 250. 259, 2008.

FARIAS, G. G. M. **Uma nova abordagem para o estudo comparativo dos polissacarídeos ácidos de algas: classe phaeophyceae**. [s.l.] Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina., 1992.

FARIAS, K. J. S.; MACHADO, P. R. L.; DA FONSECA, B. A. L. Chloroquine inhibits dengue virus type 2 replication in vero cells but not in C6/36 cells. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

FIDELIS, G. P. et al. Proteolysis, NaOH and ultrasound-enhanced extraction of anticoagulant and antioxidant sulfated polysaccharides from the edible seaweed, *Gracilaria birdiae*. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 18511. 18526, 2014.

FIELDS, B. N.; KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 6 ed ed. Philadelphia: [s.n.].

GERBER, P. et al. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B or mumps virus. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 99, p. 590. 593., 1958.

GERMI, R. et al. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology**, v. 292, n. 1, p. 162. 168, 2002.

GHOSH, T. et al. **Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation** **Glycobiology**, 2009a.

- GHOSH, T. et al. Sulfated xylomannans from the red seaweed *Sebdenia polydactyla*: Structural features, chemical modification and antiviral activity. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 19, n. 6, p. 235. 242, 2009b.
- GONCALVEZ, A. P. et al. Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 22, p. 9422. 9427, 2007.
- GROVE, J.; MARSH, M. **The cell biology of receptor-mediated virus entry***Journal of Cell Biology*, 2011.
- GRUN, J. B.; BRINTON, M. A. Characterization of West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase and cellular terminal adenylyl and uridylyl transferases in cell-free extracts. **Journal of virology**, v. 60, n. 3, p. 1113. 24, 1986.
- GUBLER, D. J. **Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century***Trends in Microbiology*, 2002.
- GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 55. 57, 1995.
- GUY, B. et al. **Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses***Vaccine*, 2010.
- GUY, B.; JACKSON, N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. **Nature reviews. Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 45. 54, 2016.
- GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. **Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection***Archives of Virology*, 2013.
- GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. **Dengue***The Lancet. Anais...*2015
- HALSTEAD, S. B.; DEEN, J. The future of dengue vaccines. **THE LANCET**, v. 360, n. 12, p. 1243. 1245, 2002.
- HARDEN, E. A. et al. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 83, n. 3, p. 282. 289, 2009.
- HAYAKAWA, Y. et al. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 1, p. 86. 94, 2000.

- HEINZ, F. X.; STIASNY, K. **Flaviviruses and flavivirus vaccines** Vaccine, 2012.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 4, p. 376. 396, 1990.
- HERMANN, L. L. et al. Advances in the understanding, management, and prevention of dengue. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 153. 159, 2015.
- HEROLD, B. C. et al. Differences in the susceptibility of herpes simplex virus types 1 and 2 to modified heparin compounds suggest serotype differences in viral entry. **Journal of virology**, v. 70, n. 6, p. 3461. 9, 1996.
- HIDARI, K. I. P. J. et al. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 376, n. 1, p. 91. 95, 2008.
- HIDARI, K. I. P. J.; ABE, T.; SUZUKI, T. **Crabohydrate-related inhibitors of dengue virus entry** Viruses, 2013.
- HIGUCHI, R. et al. **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions**. Bio/technology (Nature Publishing Company), 1993.
- HILGARD, P.; STOCKERT, R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 32, n. 5, p. 1069. 1077, 2000.
- HONYA, M. et al. Monthly changes in the content of fucans, their constituent sugars and sulphate in cultured Laminaria japonica. In: MARTENS, K. (Ed.). . **Hydrobiology**. 398.. 399. ed. Netherlands: [s.n.]. p. 411. 416.
- HORSTICK, O.; TOZAN, Y.; WILDER-SMITH, A. Reviewing Dengue: Still a Neglected Tropical Disease? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, 2015.
- HUANG, K. J. et al. Flow cytometric determination for dengue virus-infected cells: Its application for antibody-dependent enhancement study. **Dengue Bulletin**, v. 29, p. 142. 150, 2005.
- HUANG, K. J. et al. The dual-specific binding of dengue virus and target cells for the antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **J Immunol**, v. 176, n. 5, p. 2825. 2832, 2006.
- HUNG, J.-J. et al. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. **Journal of virology**, v. 78, n. 1, p. 378. 88, 2004.
- HUNG, S. L. et al. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. **Virology**, v. 257, n. 1, p. 156. 167, 1999.

JIAO, G. et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196. 233, 2011.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; LANCIOTTI, R. S. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 4977. 4983, 2005.

JULANDER, J. G.; PERRY, S. T.; SHRESTA, S. **Important advances in the field of anti-dengue virus research** *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 2011.

KALAYANAROOJ, S. et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. **The Journal of infectious diseases**, v. 176, n. 2, p. 313. 321, 1997.

KATO, D. et al. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. **Antiviral Research**, v. 88, n. 2, p. 236. 243, 2010.

KAUFMANN, B.; ROSSMANN, M. G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 13, n. 1, p. 1. 9, 2011.

KHARYA, G. et al. Management of severe refractory thrombocytopenia in dengue hemorrhagic fever with intravenous anti-D immune globulin. **Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 28, n. 8, p. 727. 732, 2011.

KNUTSEN, S. H. et al. A Modified System of Nomenclature for Red Algal Galactans. **Botanica Marina**, v. 37, n. 2, p. 163. 170, 1994.

KREUGER, J. et al. **Interactions between heparan sulfate and proteins: The concept of specificity** *Journal of Cell Biology*, 2006.

KYLE, J. L.; HARRIS, E. Global spread and persistence of dengue. **Annual review of microbiology**, v. 62, p. 71. 92, 2008.

LAI, C.-Y. et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 82, n. 13, p. 6631. 6643, 2008.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 3, p. 545. 551, 1992.

LEANDRO SILVA COSTA. **Bioprospecção de polissacarídeos sulfatados de macroalgas marinhas do litoral do Rio Grande do Norte: Caracterização de uma heterofucana extraída da alga marrom Sargassum filipendula que induz apoptose.** [s.l.] Universidade federal do Rio Grande do Norte, 2012.

LEE, J. B. et al. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green

algae. **Planta Medica**, v. 70, n. 9, p. 813. 817, 2004.

LEITE, E. L. et al. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schroederi*. **Plant Science**, v. 132, n. 2, p. 215. 228, 1998.

LEVER, R.; PAGE, C. P. Novel drug development opportunities for heparin. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n. 2, p. 140. 8, 2002.

LI, H. et al. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. **Journal of virology**, v. 73, n. 4, p. 3108. 3116, 1999.

LI, L. et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 2008, p. 1830. 1834, 2008.

LIM, S. P. et al. **Ten years of dengue drug discovery: Progress and prospects** *Antiviral Research*, 2013.

LIMON-FLORES, A. Y. et al. Dengue virus inoculation to human skin explants: An effective approach to assess in situ the early infection and the effects on cutaneous dendritic cells. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 86, n. 5, p. 323. 334, 2005.

LIN, Y.-L. et al. Heparin inhibits dengue-2 virus infection of five human liver cell lines. **Antiviral research**, v. 56, p. 93. 96, 2002.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23. 61, 2003.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**, p. 1101. 1151, 2007.

LIU, J.; THORP, S. C. Cell surface heparan sulfate and its roles in assisting viral infections. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, n. 1, p. 1. 25, 2002.

LUO, Y. Y. et al. Identification of a novel infection-enhancing epitope on dengue prM using a dengue cross-reacting monoclonal antibody. **BMC Microbiol**, v. 13, p. 194, 2013.

LÜSCHER-MATTLI, M. **Polyanions - A lost chance in the fight against HIV and other virus diseases?** *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 2000.

MACKENZIE, J.; JONES, M.; YOUNG, P. Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication. **Virology**, v. 220, n. 1, p. 232. 240, 1996.

MAGDEL-DIN HUSSEIN, M.; ABDEL-AZIZ, A.; MOHAMED SALEM, H. Some

- structural features of a new sulphated heteropolysaccharide from *Padina pavonia*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 10, p. 2133. 2135, 1980.
- MANDAL, P. et al. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 18, n. 3, p. 153. 162, 2007.
- MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. **Dengue virus pathogenesis: An integrated view** **Clinical Microbiology Reviews**, 2009.
- MARTINEZ, J. P. et al. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. **Nat. Prod. Rep.**, v. 32, n. 1, p. 29. 48, 2015.
- MARTÍNEZ-BARRAGÁN, J. J.; DEL ANGEL, R. M. Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. **Journal of virology**, v. 75, n. 17, p. 7818. 27, 2001.
- MARTINS, V. E. P. et al. Occurrence of natural vertical transmission of dengue-2 and dengue-3 viruses in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Fortaleza, Ceará, Brazil. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.
- MATHEW, A.; ROTHMAN, A. L. **Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis** **Immunological Reviews**, 2008.
- MEERTENS, L. et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 4, p. 544. 557, 2012.
- MILLER, S. et al. The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 282, n. 12, p. 8873. 8882, 2007.
- MILLER, S.; SPARACIO, S.; BARTENSCHLAGER, R. Subcellular Localization and Membrane Topology of the Dengue Virus Type 2 Non-structural Protein 4B. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 281, n. 13, p. 8854 . 8863, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos de Dengue: Brasil, grandes regiões e unidades federadas, 1990 a 2013, 2014a**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/31/Incidencia-dengue-at-2014.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde –Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 5, 2016**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/29/2016-006---Dengue-SE5-publica---o.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2016a.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue : diagnóstico e manejo clínico : adulto e criança**. 5 ed ed. Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor : manual de normas técnicas. - 3. ed., rev. - Brasília : Ministério da Saúde : Fundação Nacional de Saúde.** Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man\\_dengue.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf)>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Brasil Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. NOTA TÉCNICA CGPNCD/DEVEP/SVS/MS . Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil.** Disponível em: <notatecnica\_sorotipo\_denv4\_roraima (3).pdf>.

MODIS, Y. et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 12, p. 6986. 6991, 2003.

MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 313. 319, 2004.

MODIS, Y. et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of virology**, v. 79, n. 2, p. 1223. 31, 2005.

MOHSEN et al. Chemical structure and antiviral activity of water-soluble sulfated polysaccharides from *Sargassum latifolium*. **J. Appl. Sci. Res.**, v. 3, n. Copyright (C) 2012 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved., p. 1178. 1185, 2007.

MONDOTTE, J. A et al. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. **Journal of virology**, v. 81, n. 13, p. 7136. 48, 2007.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature medicine**, v. 9, n. 7, p. 921. 927, 2003.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13. 22, 2005.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192. 208, 2013.

MUÑOZ-JORDAN, J. L. et al. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14333. 14338, 2003.

MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 587. 619, 2011.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. **Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects***Clinical Epidemiology*, 2013.

NADER, H. B. et al. Heparan sulfates and heparins: Similar compounds performing the same functions in vertebrates and invertebrates? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 5, p. 529. 538, 1999.

NAHMIAS, A. J.; KIBRICK, S. Inhibitory effect of heparin on herpes simplex virus. **Journal of Bacteriology**, v. 87, n. 5, p. 1060. 1066, 1964.

NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 205. 207, 2002.

NGO, D. H.; KIM, S. K. **Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae***International Journal of Biological Macromolecules*, 2013.

NIESTERS, H. G. M. Quantitation of Viral Load Using Real-Time Amplification Techniques. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 419. 429, 2001.

NILES, A. L.; MORAVEC, R. A; RISS, T. L. Cytotoxicity Assays for Drug Development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 655. 669, 2008.

NOBLE, C. G. et al. **Strategies for development of dengue virus inhibitors***Antiviral Research*, 2010.

NOGUEIRA, R. M. R. et al. Isolation of Dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 85(2), p. 253, 1990.

OPAS. **Dengue**. Disponível em:

<[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=1&Itemid=40734](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=40734)>. Acesso em: 20 jun. 2001.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **DENGUE Guías de atención para enfermos en la región de las Américas**. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=11239&Itemid](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=11239&Itemid)>. Acesso em: 1 jan. 2016.

PASTORINO, B. et al. Role of host cell factors in flavivirus infection: Implications for pathogenesis and development of antiviral drugs. **Antiviral Research**, v. 87, p. 281. 294, 2010.

PERERA, R.; KUHN, R. J. **Structural proteomics of dengue virus***Current Opinion in Microbiology*, 2008.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Vaccine Development as a Means to Control Dengue Virus Pathogenesis: Do We Know Enough? **Annual Review of Virology**, v. 1, n. 1, p. 375. 398, 2014.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. **Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans***Glycobiology*, 2008.

- PONCE, N. M. A. et al. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: Extraction methods, antiviral activity and structural studies. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 2, p. 153. 165, 2003.
- PONLAWAT, A.; HARRINGTON, L. C. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 5, p. 844. 849, 2005.
- PONTES, R. J.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue in a urban locality of southeastern Brazil: epidemiological aspects. **Revista de saude publica**, v. 28, p. 218. 227, 1994a.
- PONTES, R. J.; RUFFINO-NETTO, A. Dengue in a urban locality of southeastern Brazil: epidemiological aspects. **Revista de saude publica**, v. 28, p. 218. 227, 1994b.
- PUJOL, C. A. et al. Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 13, n. 2, p. 83. 89, 2002.
- PUJOL, C. A. et al. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 412. 416, 2012.
- RHIMOU, B.; HASSANE, R.; NATHALIE, B. Antiviral activity of the extracts of Rhodophyceae from Morocco. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 46, p. 7968. 7975, 2010.
- RICHARDSON, J. et al. Quantitative analysis of dengue-2 virus RNA during the extrinsic incubation period in individual *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 1, p. 132. 141, 2006.
- RICO-HESSE, R. et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 244. 51, 1997.
- ROCHA, H. A. et al. **Natural sulfated polysaccharides as antithrombotic compounds. Structural characteristics and effects on the coagulation cascade. In Carbohydrate Structure and Biological Function.** Kerala India: Transworld Research Network, 2006.
- ROCHA, H. A. O. et al. A fucan from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi* inhibits Chinese hamster ovary cell adhesion to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 5, p. 621. 626, 2001.
- ROCHA, H. A. O. et al. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*: An ideal antithrombotic agent? **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p.

41278. 41288, 2005.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A. et al. Immature dengue virus: A veiled pathogen? **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 1, 2010.

RODERIQUEZ, G. et al. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. **Journal of virology**, v. 69, n. 4, p. 2233. 2239, 1995.

ROSE, J. B. et al. Comparison of PCR and plaque assay for detection and enumeration of coliphage in polluted marine waters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4564. 4566, 1997.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 8, p. 532. 543, 2011.

SCHAEFFER, D. J.; KRYLOV, V. S. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 45, n. 3, p. 208. 227, 2000.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. P. A. T. DA. **An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1986.

SCHMITZ, J. et al. Next generation dengue vaccines: A review of candidates in preclinical development. **Vaccine**, v. 29, p. 7276. 7284, 2011.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 12, p. 745. 759, 2015.

SIMMONS, C. P. et al. Dengue. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423. 1432, 2012.

SIQUEIRA JR., J. B. et al. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 1, p. 48. 53, 2005.

ST JOHN, A. L.; ABRAHAM, S. N.; GUBLER, D. J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 420. 426, 2013.

TALARICO, L. B. et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Research**, v. 66, n. 2, p. 103. 110, jun. 2005.

TALARICO, L. B. et al. An algal-derived DL-galactan hybrid is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection. **Planta Medica**, v. 73, n. 14, p. 1464. 1468, 2007.

- TALARICO, L. B. et al. Differential inhibition of dengue virus infection in mammalian and mosquito cells by iota-carrageenan. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 6, p. 1332. 1342, 2011.
- TALARICO, L. B.; DAMONTE, E. B. Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. **Virology**, v. 363, n. 2, p. 473. 485, 2007.
- TAN, B. H. et al. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in Escherichia coli exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. **Virology**, v. 216, n. 2, p. 317. 325, 1996.
- THOMAS, S. J. Developing a dengue vaccine: Progress and future challenges. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1323, n. 1, p. 140. 159, 2014.
- THOMAS, S. J.; STRICKMAN, D.; VAUGHN, D. W. Dengue Epidemiology: Virus Epidemiology, Ecology, And Emergence. **Advances in Virus Research**, v. 61, p. 235. 289, 2003.
- TONG, X. K. et al. WSS45, a sulfated  $\beta$ -D-glucan, strongly interferes with Dengue 2 virus infection in vitro. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 5, p. 585. 592, 2010.
- VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; DA CUNHA, R. V. **Dengue teorias e práticas**. 1<sup>a</sup> edição ed. Rio de Janeiro: editora Fiocruz, 2015.
- VAN DER SCHAAR, H. M. et al. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. **Journal of virology**, v. 81, n. 21, p. 12019. 12028, 2007.
- VIDAL, A. A. J. et al. Comparação do efeito de diferentes solventes no fracionamento de polissacarídeos sulfatados da alga parda *Spatoglossum schroederi*. **Publica VI**, p. 46. 54, 2010.
- WANG, H.; OOI, E. V.; ANG, P. O. Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 9, n. 12, p. 969. 76, 2008.
- WATTERSON, D.; KOBE, B.; YOUNG, P. R. Residues in domain III of the dengue virus envelope glycoprotein involved in cell-surface glycosaminoglycan binding. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 1, p. 72. 82, 2012.
- WHITEHEAD, S. S. et al. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 518. 528, 2007.
- WHO. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed.** Geneva, World Health Organization. [s.l: s.n.]. v. 6
- WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. **Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**, p.

147, 2009.

WHO. Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012. 2020. **World Health Organization, Geneva, Switzerland**, p. 35, 2012.

WILDER-SMITH, A. Dengue vaccines: dawning at last? **The Lancet**, v. 384, p. 1327. 1329, 2004.

WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E. **Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs****General Pharmacology**, 1997.

WUDUNN, D.; SPEAR, P. G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. **Journal of virology**, v. 63, n. 1, p. 52. 58, 1989.

YU, I.-M. et al. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. **Journal of virology**, v. 83, n. 23, p. 12101. 7, 2009.

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

ZHANG, W. et al. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 11, p. 907. 912, 2003.

ZHANG, Y. et al. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, v. 12, n. 9, p. 1607. 1618, 2004.

ZHENG, A.; UMASHANKAR, M.; KIELIAN, M. In Vitro and In vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, 2010.

ZHU, W.; LI, J.; LIANG, G. How does cellular heparan sulfate function in viral pathogenicity? **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 24, n. 1, p. 81. 7, 2011.

ZYBERT, I. A. et al. Functional importance of dengue virus maturation: Infectious properties of immature virions. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 12, p. 3047. 3051, 2008.