



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA GLANDICOLINA B EM
HEPATÓCITOS HUMANOS (Huh-7) INFECTADOS *IN VITRO* PELO VÍRUS
DENGUE**

BIANCA NADINI TEIXEIRA FERNANDES

Manaus/AM

2025

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

BIANCA NADINI TEIXEIRA FERNANDES

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DA GLANDICOLINA B EM
HEPATÓCITOS HUMANOS (Huh-7) INFECTADOS *IN VITRO* PELO VÍRUS
DENGUE**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Escola Normal Superior - ENS, da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, como requisito final para obtenção do título de graduado em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Raimundo de Sousa Lima Júnior

Coorientadora: Dra. Gladys Corrêa da Silva

Manaus/AM

2025

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

F363a Fernandes, Bianca Nadini Teixeira
Análise da atividade antiviral da Glandicolina B em hepatócitos humanos (Huh-7) infectados in vitro pelo vírus Dengue / Bianca Nadini Teixeira Fernandes . Manaus : [s.n], 2025.
47 f.: color.; 21,0 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas- Licenciatura- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2025.
Orientador: Lima Júnior, Raimundo de Sousa.
Coorientador: da Silva, Gladys Corrêa.

1. Antígeno NS1. 2. Citotoxicidade. 3. Molécula antiviral. 4. Penicillium. I. Lima Júnior, Raimundo de Sousa (Orient.) II . da Silva, Gladys Corrêa (Coorient.) III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título

CDU(1997)57

BIANCA NADINI TEIXEIRA FERNANDES

**ANÁLISE DA ATIVIDADES ANTIVIRAL DA GLANDICOLINA B EM
HEPATÓCITOS HUMANOS (Huh-7) INFECTADOS *IN VITRO* PELO VÍRUS
DENGUE**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, da Escola Normal Superior - ENS, da Universidade do Estado do Amazonas - UEA, como requisito final para obtenção do título de graduado em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 27/05/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raimundo de Sousa Lima Júnior
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Profª. Dra. Rosilene Gomes da Silva Ferreira
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Profª. Me. Cristiane Nazaré Fidelis Aparício
Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/ FIOCRUZ AMAZÔNIA

Dedico este trabalho ao Homem que me deu a capacidade de escrever e sonhar, sofrendo por uma dívida que não era sua para limpar o meu nome. Sem Ele, não haveria eu. E aos meus pais que sob muito sol, fizeram-me chegar aqui pela sombra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter iluminado não apenas minha trajetória acadêmica, mas também cada passo que dei até aqui. Sou grata por todas as vezes em que minhas orações foram atendidas, quando roguei por sabedoria e discernimento. Foi Ele quem carregou os meus fardos pesados e me concedeu o Seu, leve e suave.

À minha família, que acreditou em mim mesmo quando eu ainda não acreditava, expressei minha profunda gratidão. Em especial, agradeço aos meus pais, que me ensinaram a sonhar e a acreditar na minha capacidade de alcançar tudo o que eu almejasse, por meio da oração, do esforço e da dedicação. Obrigada por abrirem todas as portas necessárias para que eu chegasse até aqui, e por todo suporte espiritual, emocional, psicológico e financeiro. Às minhas irmãs, Dayse Gabriele e Karen Letícia, sou grata pelos sorrisos e pelos momentos compartilhados que tornaram essa jornada mais leve e significativa.

Ao meu noivo, que esteve ao meu lado durante todo o percurso, agradeço profundamente pelo carinho, compreensão e companheirismo nos momentos de dúvida e incerteza. E aos meus avós, que junto aos meus pais foram alicerces constantes em oração, minha eterna gratidão.

Aos meus queridos orientadores, Raimundo Júnior e Gladys Corrêa, agradeço a dedicação, competência, paciência e orientação ao longo desta pesquisa. Seus ensinamentos e apoio foram fundamentais para o desenvolvimento e sucesso deste trabalho.

Agradeço, ainda, à minha amiga Laila Castro, por acreditar no meu potencial desde o início e por ter me incentivado a dar os primeiros passos na vida acadêmica. Aos amigos Gabrielle Stoco, Juliana Rodrigues e Eduardo Serudo, deixo meu sincero agradecimento pelo apoio aos meus estudos e pela presença constante ao longo dessa caminhada.

Aos meus colegas de graduação, agradeço a parceria e pelos momentos de alegria compartilhados em sala de aula. Aos professores, que com dedicação iluminaram meu percurso acadêmico, minha sincera gratidão.

Por fim, muito obrigada a todos que, de alguma forma, fizeram parte desta trajetória e contribuíram para que eu alcançasse este objetivo tão significativo em minha vida.

RESUMO

A dengue é uma arbovirose de grande impacto na saúde pública global, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, como o Brasil. A elevada incidência da doença, aliada à ausência de tratamentos antivirais específicos e à limitada eficácia vacinal, reforça a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antiviral do peptídeo Glandicolina B, isolado do fungo *Penicillium rubens*, em hepatócitos humanos (Huh-7) infectados *in vitro* pelo sorotipo 2 do vírus da dengue (DENV-2). O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia Celular (LIFCEL) da Universidade do Estado do Amazonas. Primeiramente, a citotoxicidade da Glandicolina B foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico de MTT, em diferentes concentrações (0,1 a 100 µg/mL) e tempos de exposição (24h, 48h e 72h). Os resultados indicaram que a substância não apresentou toxicidade significativa, mantendo a viabilidade celular acima de 90% em todas as concentrações testadas. Em seguida, a linhagem Huh-7 foi infectada com o DENV-2 e tratada com a Glandicolina B. A atividade antiviral foi avaliada por meio da dosagem da proteína viral NS1 nos sobrenadantes, utilizando o teste de ELISA. A análise demonstrou uma discreta redução nos níveis de NS1 nas células tratadas, especialmente na concentração de 100 µg/mL, em comparação ao grupo infectado sem tratamento, mas os dados não apresentaram significância estatística. Assim, embora a Glandicolina B tenha se mostrado segura para uso em células Huh-7, não demonstrou inibição significativa da replicação viral sob as condições testadas. Este resultado não invalida o potencial da substância, mas sugere a necessidade de novos ensaios, com ajustes no tempo de incubação, concentrações mais elevadas, coadministração com outras substâncias ou análises complementares de outros marcadores virais.

Palavras-chave: Antígeno NS1; Citotoxicidade; Molécula antiviral; *Penicillium*.

ABSTRACT

Dengue is an arboviral disease with a significant impact on global public health, particularly in tropical and subtropical regions such as Brazil. The high incidence of the disease, combined with the lack of specific antiviral treatments and the limited efficacy of available vaccines, underscores the need for new therapeutic strategies. In this context, the present study aimed to evaluate the antiviral activity of the peptide Glandicolin B, isolated from the fungus *Penicillium rubens*, in human hepatocytes (Huh-7) infected in vitro with dengue virus serotype 2 (DENV-2). The research was conducted at the Cellular Immunopharmacology Laboratory (LIFCEL) of the State University of Amazonas. Initially, the cytotoxicity of Glandicolin B was assessed using the MTT colorimetric assay at various concentrations (0.1 to 100 µg/mL) and exposure times (24h, 48h, and 72h). The results indicated that the substance did not exhibit significant toxicity, maintaining cell viability above 90% at all tested concentrations. Subsequently, the Huh-7 cell line was infected with DENV-2 and treated with Glandicolin B. Antiviral activity was evaluated by quantifying the viral NS1 protein in the supernatants using the ELISA assay. The analysis showed a slight reduction in NS1 levels in treated cells, particularly at the concentration of 100 µg/mL, compared to the untreated infected group; however, the data did not reach statistical significance. Therefore, although Glandicolin B proved to be safe for use in Huh-7 cells, it did not significantly inhibit viral replication under the tested conditions. This result does not invalidate the potential of the compound but suggests the need for further experiments, including adjustments to incubation time, higher concentrations, co-administration with other compounds, or additional analyses involving other viral markers.

Keyword: Antiviral Molecule; Cytotoxicity; NS1 Antigen; *Penicillium*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADE – Antibody-Dependent Enhancement (Aprimoramento Dependente de Anticorpos)
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DENV – Dengue Virus (Vírus da Dengue)
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – Dimetilsulfóxido
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
Huh-7 – Linhagem de hepatócitos humanos
ILMD – Instituto Leônidas e Maria Deane
LIFCEL – Laboratório de Imunofarmacologia Celular
MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NS1 – Non-Structural protein 1
OMS – Organização Mundial da Saúde
ORF – Open Reading Frame
RdRp – RNA-dependent RNA polymerase
RE – Retículo Endoplasmático
RER – Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA – Ácido Ribonucleico
RT-PCR – Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (caso mencionado em outras partes do texto)
SFB – Soro Fetal Bovino
UEA – Universidade do Estado do Amazonas
UFAM – Universidade Federal do Amazonas
WHO – World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Citotoxicidade celular da Glandicolina B em células Huh-7 durante 24h, 48h e 72h.....	38
Tabela 2. Avaliação da atividade antiviral de Glandicolina B em células Huh-7 infectadas pelo DENV-2 realizada por dosagem do antígeno NS1.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Casos prováveis de Dengue por ano e semana epidemiológica, 2023, 2024 e 2025.....	16
Figura 2. Representação da estrutura do DENV vírus.....	17
Figura 3. Funções das proteínas não estruturais do DENV.....	19
Figura 4. Replicação do DENV.....	20
Figura 5. <i>Aedes aegypti</i>	22
Figura 6. Transmissão do vírus da dengue.	23
Figura 7. Fases da dengue.....	25
Figura 8. Quadro clínico da dengue.	26
Figura 9. Esquema ilustrativo do procedimento de avaliação da viabilidade celular.	33
Figura 10. Esquema ilustrativo do procedimento de infecção e tratamento.....	34
Figura 11. Avaliação da citotoxicidade da Glandicolina B em células Huh-7 após 24h, 48h e 72h de tratamento.	38
Figura 12. Avaliação da atividade antiviral de Glandicolina B em células Huh-7 infectadas pelo DENV-2 realizada por dosagem do antígeno NS1.	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. EPIDEMIOLOGIA.....	14
2.1.1. DENGUE NAS AMÉRICAS.....	15
2.1.2. DENGUE NO BRASIL	15
2.2. VIROLOGIA.....	17
2.2.1. ESTRUTURA VIRAL.....	17
2.2.2. CICLO DE REPLICAÇÃO	19
2.2.3. SOROTIPOS	21
2.3. VETORES	21
2.4. TRANSMISSÃO.....	22
2.5. FISIOPATOLOGIA	23
2.5.1. CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA E EVOLUÇÃO DA DOENÇA.....	25
2.5.2. MECANISMOS IMUNOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO DENV ..	27
2.6. CONTROLE E VACINA.....	28
2.7. MOLÉCULAS ANTIVIRAIS.....	28
2.7.1. ATIVIDADE ANTIVIRAL EM FUNGOS	29
2.7.2. GLANDICOLINA B	29
3. JUSTIFICATIVA.....	30
4. OBJETIVOS.....	30
4.1. GERAL.....	30
4.2. ESPECÍFICOS	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1. GLANDICOLINA B	31
5.2. LINHAGEM CELULAR E DENV-2.....	31
5.3. AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR.....	31
5.4. INFECÇÃO E TRATAMENTO DA LINHAGEM DE HEPATÓCITOS (HUH-7)	
33	
5.5. ATIVIDADE ANTIVIRAL	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
7. CONCLUSÃO	41
8. REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

As doenças virais constituem um dos maiores desafios para a saúde pública global, sendo responsáveis por surtos, epidemias e impactos significativos sobre os sistemas de saúde em diversas regiões do mundo (WHO, 2023). Entre essas enfermidades, destacam-se as arboviroses, um grupo de doenças causadas por vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, como mosquitos e carrapatos (OMS, 2023). O termo arbovirose deriva da expressão em inglês *arthropod-borne virus* e refere-se não apenas à capacidade desses vírus de serem veiculados por artrópodes, mas também ao fato de parte de seu ciclo replicativo ocorrer dentro desses vetores, o que é essencial para sua manutenção e transmissão na natureza (Lopes *et al.*, 2014).

Os arbovírus de importância para a saúde pública pertencem a cinco famílias virais: Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae. Dentre essas famílias, destaca-se a família Flaviviridae, por englobar vírus de grande impacto epidemiológico, como o vírus da dengue (DENV), o vírus Zika (ZIKV), o vírus da febre amarela (YFV) e o vírus do Nilo Ocidental (WNV) (Lopes *et al.*, 2014).

Os flavivírus compartilham características estruturais e genômicas, como o fato de possuírem RNA de fita simples de sentido positivo, envolto por um capsídeo icosaédrico e uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira (Heinz; Stiasny, 2012). Além disso, muitos desses vírus são responsáveis por infecções febris agudas que, em determinados casos, podem evoluir para formas graves, com manifestações neurológicas, hemorrágicas ou hepáticas, representando um sério desafio para os sistemas de vigilância e controle de doenças em regiões tropicais e subtropicais (Heinz; Stiasny, 2012).

O ciclo de replicação desses vírus tem início com a ligação entre a partícula viral e receptores específicos presentes na membrana da célula hospedeira (Lopes *et al.*, 2014). Em seguida, o vírus é internalizado por endocitose, sendo envolvido por vesículas predominantemente cobertas por clatrina. No interior do endossomo, o ambiente ácido desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, promovendo alterações estruturais na proteína E. Essa mudança permite a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Após a remoção do capsídeo (decapsidação), o genoma de RNA é liberado e imediatamente utilizado como RNA mensageiro (mRNA) para a síntese de proteínas virais (Sinha *et al.*, 2024).

Entre os flavivírus, o de maior relevância é o vírus da dengue (DENV), que ocupa posição de destaque devido à sua alta taxa de infecções e ao expressivo impacto nos sistemas de saúde. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a dengue representa a arbovirose de maior incidência nas Américas, com epidemias recorrentes a cada três a cinco anos. Estima-se

que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas estejam sob risco de infecção, sobretudo em países tropicais, onde as condições climáticas favorecem a proliferação do mosquito vetor (Tauil, 2022).

A dengue é uma doença febril aguda, sistêmica, dinâmica, debilitante e autolimitada (Brasil, 2023). Seu espectro clínico é amplo, podendo variar de formas oligossintomáticas até quadros graves, com hemorragia e choque, podendo evoluir para óbito (Pompeo, 2016). As manifestações são influenciadas pela cepa do vírus, pelo estado imunológico e genético do paciente, pela concomitância com outras doenças e por infecção prévia por outro sorotipo viral da doença (Pinheiro; Travassos-da-Rosa, 1996).

O vírus da dengue (DENV) está classificado cientificamente na família Flaviviridae e no gênero *Orthoflavivirus* (Postler *et al.*, 2023). Pode ser transmitido ao homem principalmente pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes* infectadas, especialmente pelo *Aedes aegypti*, seu principal vetor. Transmissões verticais (de mãe para filho durante a gestação) e por transfusão de sangue são raras. Atualmente, são conhecidos oficialmente quatro sorotipos do vírus da dengue: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, os quais possuem material genético distinto e se dividem em diferentes genótipos e linhagens (Korsman *et al.*, 2014).

A resposta imune desencadeada pela infecção por um dos quatro sorotipos confere proteção duradoura apenas contra o sorotipo específico responsável pela infecção inicial. No entanto, essa imunidade não se estende de forma eficaz aos demais sorotipos do DENV (Tauil, 2022). Em alguns casos, pode ocorrer uma imunidade cruzada temporária entre sorotipos distintos, mas essa proteção é geralmente de curta duração e insuficiente para impedir uma nova infecção. Pelo contrário, exposições subsequentes a diferentes sorotipos podem aumentar o risco de formas mais graves da doença, devido a mecanismos imunopatológicos como a Intensificação Dependente de Anticorpos (ADE, do inglês *antibody-dependent enhancement*) (Sinha *et al.*, 2024).

A primeira vacina autorizada no Brasil contra a dengue foi a Dengvaxia® (CYD-TDV), cujo registro foi concedido pela Anvisa em dezembro de 2015 (Godói, 2018). A segunda, aprovada pela Anvisa, é a Qdenga®, uma vacina de vírus atenuado e tetravalente contra a dengue, apresentando eficácia de 80,2% na avaliação clínica. Diferentemente da vacina anterior, pode ser utilizada por pessoas que nunca tiveram contato com a doença (Brasil, 2024b).

A dengue traz grandes prejuízos para a sociedade, como perda de salários, diminuição da produtividade, custos relacionados aos cuidados de saúde, além das despesas médicas diretas (Pereira *et al.*, 2014). A utilização de moléculas com atividade antiviral é uma estratégia

importante para reduzir os gastos e tornar o tratamento mais efetivo. Sendo assim, é crucial realizar pesquisas e descobrir medicamentos que não apenas combatam o vírus, mas também modulem a resposta inflamatória e aliviem os sintomas da doença. Essa abordagem é essencial para ajudar a diminuir o número de casos fatais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. EPIDEMIOLOGIA

Tem-se registrado a ocorrência da dengue em várias partes do mundo nos últimos anos, atingindo as Américas, a África, a Ásia, a Europa e a Austrália, com pandemias e epidemias (Howe, 1977). As primeiras evidências de epidemias de dengue foram registradas em 1779 e 1780, na Ásia, África e América do Norte. Essas ocorrências simultâneas e próximas de surtos nos três continentes sugerem que o vírus e o mosquito vetor estão presentes nos trópicos há mais de 200 anos (Mahmood, 2006).

No entanto, foi somente no século XX que a dengue se tornou um problema global significativo de saúde pública. Essa transformação ocorreu especialmente após a Segunda Guerra Mundial, no Sudeste Asiático, marcando o início das epidemias, quando a rápida urbanização e o aumento do tráfego internacional facilitaram a disseminação do vetor da doença, o mosquito *Aedes aegypti*, e, conseqüentemente, do vírus (Teixeira *et al.*, 1999).

O padrão sazonal da dengue é amplamente afetado por condições climáticas, como o aquecimento global e os fenômenos *El Niño* e *La Niña*, com uma incidência mais elevada durante os períodos de chuva, que favorecem a reprodução dos mosquitos (Maciel *et al.*, 2008). Além das mudanças climáticas, a disseminação da dengue é intensificada por diversos fatores, incluindo o crescimento urbano desordenado, a mobilidade humana e a resistência dos vetores aos inseticidas (WHO, 2009).

A infraestrutura urbana inadequada, como habitações precárias, reservatórios de água impróprios e coleta de lixo insuficiente, resultado, principalmente, da migração do campo para a cidade nas últimas décadas e da falta de políticas públicas, torna mais difícil o controle dos vetores (Tauil, 2002). Além disso, fatores relacionados ao mercado, que levam à produção excessiva de objetos e recipientes descartáveis, contribuem significativamente para a dispersão do mosquito (Farrar *et al.*, 2007), devido ao descarte impróprio, conseqüentemente, aumento nos criadouros artificiais dos mosquitos.

Atualmente, a dengue é considerada endêmica em mais de 100 países, predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, América Latina e Pacífico Ocidental.

Segundo a OMS, aproximadamente 3,9 bilhões de pessoas residem em áreas de risco para infecção pelo vírus da dengue (WHO, 2024). Estima-se que entre 100 e 400 milhões de infecções ocorram anualmente (WHO, 2024). Embora a Organização Mundial da Saúde (OMS) não tenha oficialmente declarado a dengue como uma pandemia, ela é frequentemente referida como uma "pandemia silenciosa", devido à sua alta transmissibilidade em múltiplos continentes simultaneamente, resultando em surtos recorrentes e na expansão constante das áreas afetadas (Bhatt *et al.*, 2013; WHO, 2024).

2.1.1. DENGUE NAS AMÉRICAS

Nas Américas, a dengue havia sido praticamente erradicada na década de 1960 devido a campanhas de controle do *Aedes aegypti* pelo programa de erradicação da Febre Amarela urbana no continente (PAHO, 2023). No entanto, apenas 21 países conseguiram exterminar o vetor, o que possibilitou a reinfestação em países que anteriormente já o haviam erradicado (Pinheiro, 1977). A reintrodução da dengue nas Américas teve início na década de 1960, com surtos registrados na Venezuela e em diversas ilhas do Caribe (Teixeira *et al.*, 1999). A interrupção do programa no começo da década de 1970 nos países que já haviam erradicado o mosquito resultou numa reinfestação gradual, e até 1987, quase todos os países já apresentavam *A. aegypti* em seu território, facilitando assim a volta da dengue (Vasconcelos *et al.*, 2001).

Em 1981, Cuba enfrentou a primeira epidemia de dengue caracterizada pela circulação simultânea de múltiplos sorotipos, resultando em milhares de casos e centenas de mortes (Teixeira *et al.*, 1999). A segunda epidemia aconteceu entre 1989 e 1990, na Venezuela. Em 1994, houve a reintrodução do DENV-3, que deu origem a uma nova onda de epidemias nas Américas (Guzmán *et al.*, 1984).

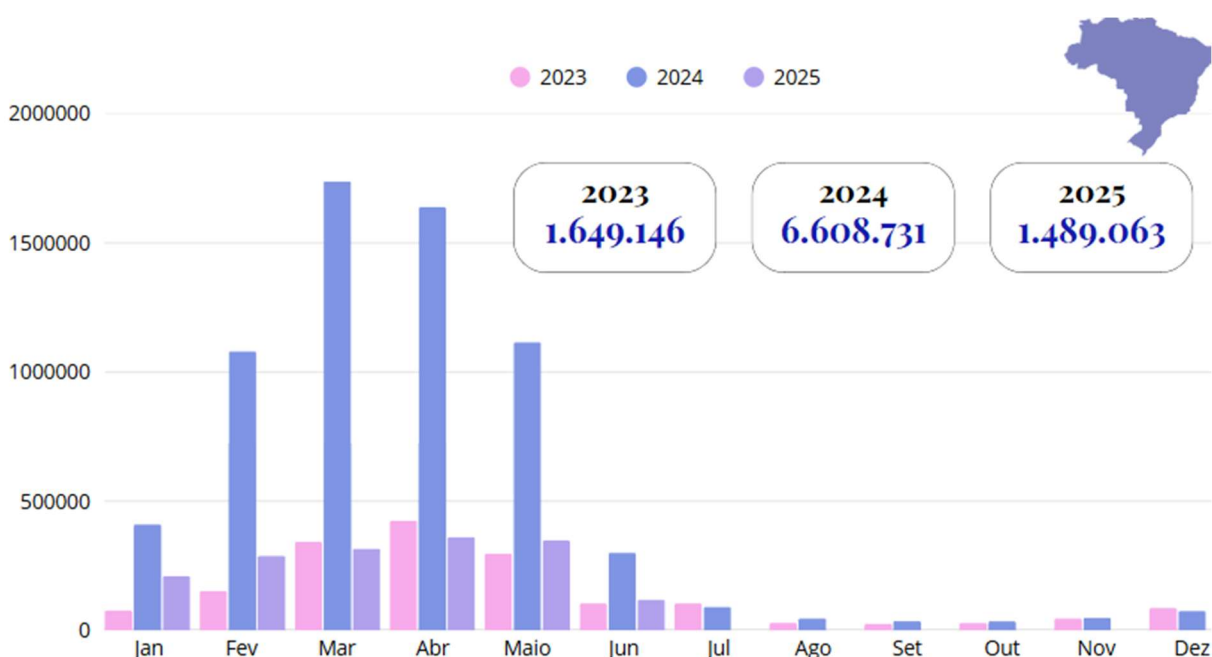
A trajetória da dengue nas Américas ilustra a complexidade do controle de doenças transmitidas por vetores e os desafios impostos por fatores sociais, econômicos e ambientais (Maciel *et al.*, 2008). A erradicação temporária do *Aedes aegypti* na década de 1960 foi um marco importante, mas a falta de continuidade nas ações de controle e a reintrodução do vírus resultaram em surtos devastadores nas décadas seguintes. O ressurgimento da dengue, acentuado pela circulação de múltiplos sorotipos e pelas condições climáticas favoráveis à proliferação do mosquito, destaca a necessidade urgente de estratégias integradas e sustentáveis de vigilância e controle (Maciel *et al.*, 2008).

2.1.2. DENGUE NO BRASIL

O Brasil se destaca como o país com o maior número absoluto de casos nas Américas (WHO, 2024). A reintrodução do *Aedes aegypti* ocorreu na década de 1970, com surtos iniciais localizados. O primeiro registro laboratorial confirmado foi em Roraima, entre 1981 e 1982, envolvendo os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (Teixeira *et al.*, 1999). Em 1986, com a reintrodução do DENV-1 no Rio de Janeiro, os surtos se intensificaram e passaram a se tornar epidemias nacionais recorrentes. Em 1990, o DENV-2 foi identificado no mesmo estado, gerando o primeiro grande surto urbano no Brasil, com aumento da gravidade clínica. A introdução do DENV-3 em 2000 e do DENV-4, novamente em 2010, completou o cenário de circulação simultânea dos quatro sorotipos do vírus, favorecendo infecções secundárias e formas graves da doença (Teixeira *et al.*, 1999).

Nas últimas décadas, o Brasil tem enfrentado epidemias cada vez mais significativas. Em 2002, foram notificados mais de 684 mil casos. Em 2008, o Rio de Janeiro registrou uma das epidemias mais letais até então, com um alto número de casos graves entre crianças (Maciel *et al.*, 2008). Entre os anos de 2013 e 2015, a expansão da dengue coincidiu com a introdução dos vírus Chikungunya e Zika no país, complicando o diagnóstico diferencial. Em 2019, foram contabilizados mais de 1,5 milhão de casos registrados, entretanto, esse número foi superado em 2024, com um recorde histórico: mais de 4 milhões de casos notificados nos primeiros meses do ano. Essa situação representa uma crise epidemiológica sem precedentes no Brasil (Brasil, 2024a). Já em 2025, foram registrados 1.301.109 casos prováveis nos primeiros cinco meses do ano (Brasil, 2025), conforme demonstrado na figura 1.

Figura 1. Casos prováveis de Dengue por ano e semana epidemiológica, 2023, 2024 e 2025.

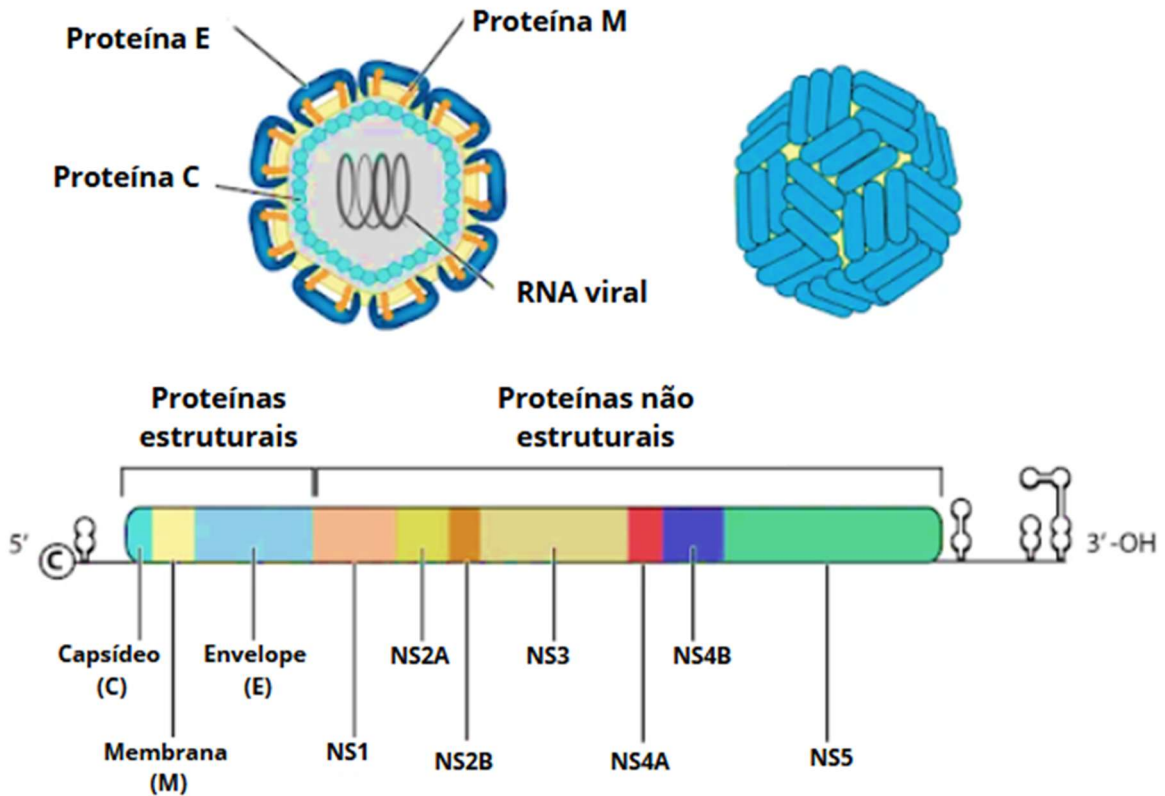


Fonte: Elaboração própria com elementos do Canva, baseado em Brasil, 2025.

2.2. VIROLOGIA

O vírus da dengue (DENV) (Figura 2) é um vírus de RNA de fita simples e polaridade positiva (+ssRNA) (Figura 2), envelopado, pertencente ao gênero *Orthoflavivirus* e à família Flaviviridae (Postler *et al.*, 2023). Essa família abriga outras espécies de interesse médico, como os causadores da Febre Amarela, Zika e Encefalite Japonesa (Johnson, 2016). Seu genoma possui aproximadamente 11 kb de comprimento e contém uma única longa região codificadora aberta (ORF), que é traduzida diretamente ao entrar nas células hospedeiras pela maquinaria de síntese proteica. Essa ORF é processada em uma poliproteína que, posteriormente, é clivada para gerar três proteínas virais estruturais e sete não estruturais (Sinha *et al.*, 2024).

Figura 2. Representação da estrutura do DENV vírus.



Fonte: Adaptado de BMC, 2022.

2.2.1. ESTRUTURA VIRAL

O entendimento da estrutura do DENV tem sido fundamental para o progresso nas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença (Byk; Gamarnik, 2016). A elucidação detalhada da morfologia viral foi possível graças à utilização combinada de técnicas de alta resolução, como a criomicroscopia eletrônica (crio-EM), a reconstrução computacional

de imagens e a cristalografia de raios X (Kuhn *et al.*, 2002). Esses métodos permitiram desvendar a organização tridimensional do DENV, fornecendo informações críticas sobre sua composição e funcionamento (Kuhn *et al.*, 2002).

O material genético do DENV é envolto por um capsídeo proteico icosaédrico, e seu genoma contém o código para três proteínas estruturais: capsídeo (C), proteína da membrana (M) e glicoproteína do envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Singhi *et al.*, 2007).

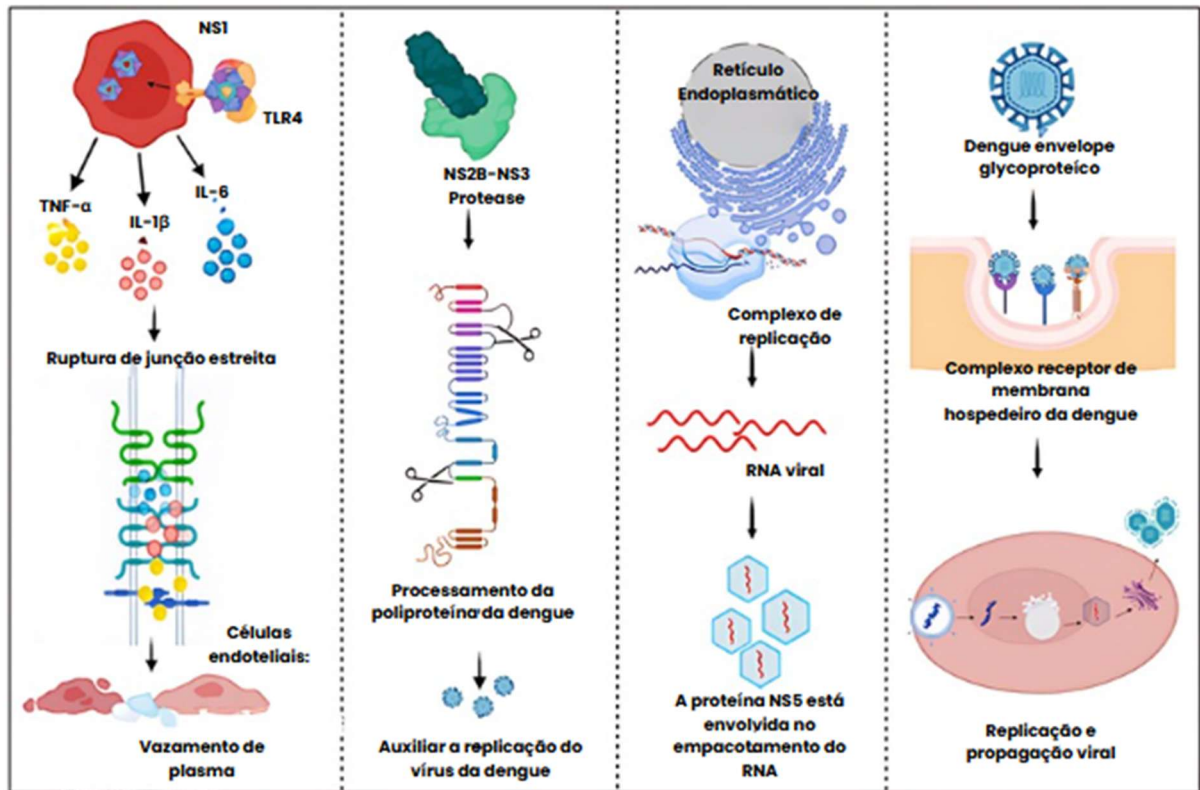
As proteínas estruturais desempenham funções cruciais na montagem do vírion e na infecção da célula hospedeira (Figura 3). A proteína C (capsídeo) envolve o genoma viral; a prM/M atua na maturação da partícula viral; e a proteína E (envelope) está diretamente envolvida no reconhecimento e na fusão com a célula-alvo, sendo também o principal alvo da resposta imune neutralizante (Modis *et al.*, 2004).

A proteína NS1 desempenha diversas funções tanto dentro quanto fora das células hospedeiras, sendo um importante marcador para o diagnóstico precoce e a avaliação do nível de infecção pelo DENV (Libraty *et al.*, 2002). Ela é secretada na forma de hexâmeros na circulação sanguínea dos pacientes, formando uma estrutura em formato de barril aberto com moléculas lipídicas centralizadas (Bhatt *et al.*, 2021). Também desempenha papel importante na fisiopatologia da dengue, especialmente no que diz respeito ao extravasamento plasmático. Um estudo recente indicou que a NS1 ativa macrófagos por meio do receptor Toll-like 4 (TLR4) e interfere nas células endoteliais, resultando em vazamento vascular (Libraty *et al.*, 2002).

Por sua vez, a proteína NS3 atua como uma protease, utilizando a NS2B como cofator para clivar a poliproteína em locais específicos, além de degradar proteínas do hospedeiro que poderiam inibir a infecção por dengue (Lee *et al.*, 2021). A relevância da proteína NS3 para a sobrevivência do vírus torna-a um alvo promissor para o desenvolvimento de medicamentos antivirais. A NS4B interage com a NS3 para modular a infecção viral, enquanto a NS4A contribui indiretamente para a replicação viral ao induzir autofagia e prevenir a morte celular, favorecendo, assim, o ciclo replicativo do vírus (Mclean *et al.*, 2011).

A proteína NS5 é a mais conservada entre as não estruturais, possuindo um domínio de RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Henderson *et al.*, 2011). Além disso, a NS5 desempenha um papel fundamental no encapsulamento do mRNA devido às suas atividades de metiltransferase e guanililtransferase. Essa proteína é predominantemente encontrada no núcleo das células infectadas, e acredita-se que atue na supressão da resposta antiviral do hospedeiro (Tay *et al.*, 2013).

Figura 3. Funções das proteínas não estruturais do DENV.



Fonte: Adaptado de Sinha *et al.*, 2024.

2.2.2. CICLO DE REPLICAÇÃO

O DENV penetra nas células hospedeiras por meio de um processo de endocitose mediada por receptor, que se inicia com a ligação da proteína E viral ao receptor correspondente (Sinha *et al.*, 2024) (Figura 4). Diversas proteínas presentes em mamíferos e mosquitos demonstraram interagir com a proteína E na superfície das células (Germi *et al.*, 2002).

A entrada do vírus ocorre predominantemente por meio da endocitose mediada por clatrina (Sinha *et al.*, 2024). Após a internalização e a acidificação do endossomo, uma mudança conformacional na proteína E, provocada pela fusão das membranas viral e vesicular, possibilita a liberação do núcleo capsular (NC) no citoplasma (Acosta *et al.*, 2008). A dissociação do capsídeo do genoma resulta na liberação do RNA viral, que é prontamente utilizado para a tradução das proteínas virais (Fishburn *et al.*, 2022). Isso se deve ao fato de que o RNA é uma fita simples de polaridade positiva, funcionando como RNA mensageiro (RNAm). Assim, após o desnudamento, ele está pronto para ser traduzido (Fishburn *et al.*, 2022).

A síntese das proteínas virais ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RER), resultando em uma poliproteína de estrutura complexa, que se associa às membranas do retículo endoplasmático (RE). As proteínas recém-sintetizadas são direcionadas para a membrana do RE, onde se fixam e onde a nova partícula viral é montada (Neufeldt *et al.*, 2019).

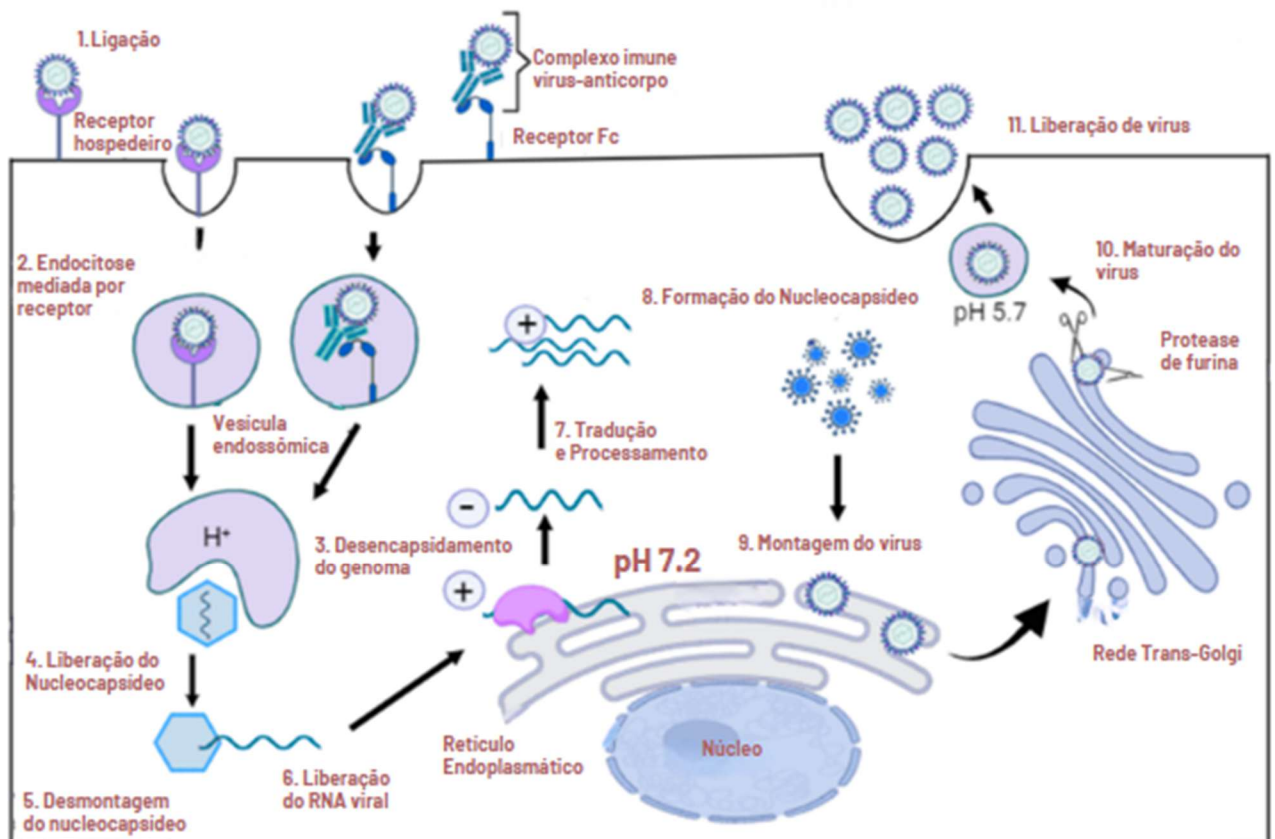
Durante e após a tradução, a poliproteína viral é clivada, originando as três proteínas estruturais (capsídeo, prM e E) e as sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Sinha *et al.*, 2024).

Em seguida, inicia-se a síntese de uma fita de RNA de polaridade negativa, complementar à fita original. Essa nova fita serve como molde para a produção das fitas de polaridade positiva que permitirão a montagem de novas partículas virais (Fishburn *et al.*, 2022). O local onde ocorre essa replicação é denominado complexo de replicação, uma estrutura membranosa formada por invaginações do retículo endoplasmático, que facilita a replicação do genoma viral (Byk; Gamarnik, 2016).

A proteína C recém-sintetizada apresenta afinidade pelas fitas de RNA recém-formadas, resultando na formação de novos nucleocapsídeos virais por meio da associação entre ambas. Por fim, após a maturação dessas partículas, o vírus maduro é liberado na superfície celular e entra na corrente sanguínea (Santos, 2023).

Conforme ilustrado na Figura 3, todo esse processo, desde a entrada viral até a liberação das partículas maduras, é coordenado e dependente das proteínas estruturais e não estruturais sintetizadas a partir do genoma viral.

Figura 4. Replicação do DENV.



Fonte: Adaptado de Sinha *et al.*, 2024.

2.2.3. SOROTIPOS

O DENV possui quatro sorotipos oficialmente conhecidos e antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Mustafa *et al.*, 2015). Embora o quinto sorotipo (DENV-5), anunciado em outubro de 2013, tenha gerado interesse na comunidade científica, ele ainda não é oficialmente reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Vasilakis *et al.*, 2011). A descoberta ocorreu em Sarawak, na Malásia, em um paciente infectado por um vírus com características genéticas distintas das dos quatro sorotipos já conhecidos. No entanto, como não foram identificados novos casos em humanos desde então, sua inclusão como um novo sorotipo oficial não é considerada até o momento (Normile, 2013).

Os quatro sorotipos do vírus da dengue compartilham aproximadamente 65% de homologia em seu material genético. No entanto, cada sorotipo provoca respostas imunes distintas, de modo que a infecção por um deles proporciona imunidade duradoura apenas contra o sorotipo específico (Halstead, 2006).

Essa característica é de extrema relevância do ponto de vista clínico, pois indivíduos previamente infectados por um sorotipo que são posteriormente reinfectados por outro apresentam risco elevado de desenvolver a forma grave da doença. Isso se deve ao fenômeno conhecido como amplificação dependente de anticorpos (ADE) (Guzman; Harris, 2015).

A variabilidade genética entre os sorotipos também desempenha um papel importante na sua distribuição geográfica, virulência e potencial epidêmico. É comum a cocirculação de múltiplos sorotipos em regiões endêmicas, como o Brasil (Martina *et al.*, 2009). Essa diversidade representa um desafio significativo para o controle da doença e o desenvolvimento de vacinas, exigindo esforços contínuos da saúde pública global.

2.3. VETORES

A transmissão do vírus da dengue ocorre por meio da picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, especialmente em áreas urbanas e semiurbanas (Tauil, 2002). O principal vetor é o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Figura 5), mas a doença também pode ser transmitida por outras espécies, como o *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Korsman *et al.*, 2014). O *Aedes aegypti* é um mosquito de hábitos domésticos, que realiza o repasto sanguíneo durante o dia e apresenta forte preferência por sangue humano (Figura 5). Já o *Aedes albopictus* apresenta uma valência ecológica maior, raramente entra em domicílios, sendo também encontrado em áreas rurais e de vegetação secundária (capoeiras), e não apresenta uma antropofilia tão acentuada quanto o *Aedes aegypti* (Tauil, 2002).

Figura 5. *Aedes aegypti*.



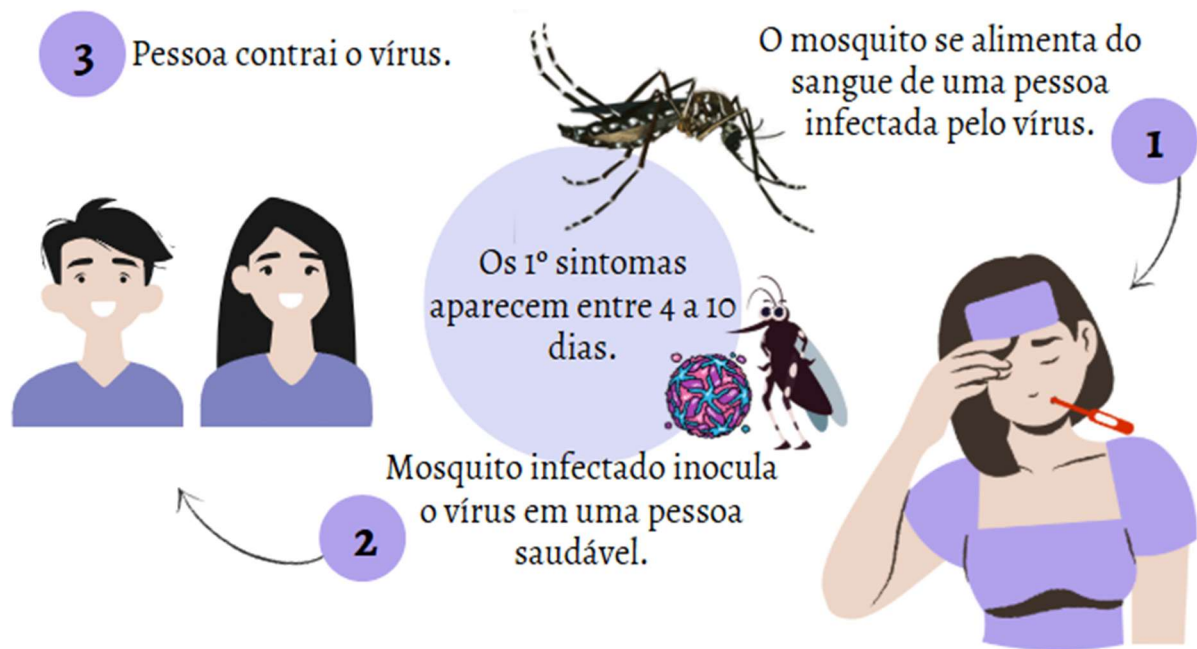
Fonte: agencia.ufc.br.

2.4. TRANSMISSÃO

As fêmeas de *Aedes aegypti* contraem o vírus ao se alimentarem do sangue de indivíduos contaminados, passando, portanto, a disseminar a doença ao realizarem um novo repasto, conforme demonstrado na figura 6. Além disso, casos de transmissão vertical (gestante-bebê) e por transfusão sanguínea também podem ocorrer (Brasil, 2023). Após o repasto sanguíneo, o vírus infecta o intestino médio do mosquito. Após um período de incubação de 8 a 12 dias, o vírus se dissemina para as glândulas salivares, tornando o mosquito capaz de transmiti-lo a outros seres humanos ao realizar o repasto sanguíneo (OMS, 2023). Uma vez infectado, o artrópode permanece infectante por toda a sua vida, podendo espalhar o vírus a cada nova picada. (Brasil, 2023).

Uma vez infectados, os humanos tornam-se a principal fonte de multiplicação do vírus da dengue (OMS, 2023). A infecção pode ser transmitida para o mosquito vetor a partir do momento em que o paciente desenvolve febre, que geralmente ocorre de 2 a 7 dias após a infecção (OMS, 2023).

Figura 6. Transmissão do vírus da dengue.



Fonte: Elaboração própria com elementos do Canva, 2025.

2.5. FISIOPATOLOGIA

O espectro clínico da infecção pelo vírus da dengue é amplo, variando desde formas oligossintomáticas até manifestações graves, caracterizadas por extravasamento plasmático, disfunções orgânicas, hemorragias significativas e, em casos mais severos, choque e óbito (Marques *et al.*, 2024).

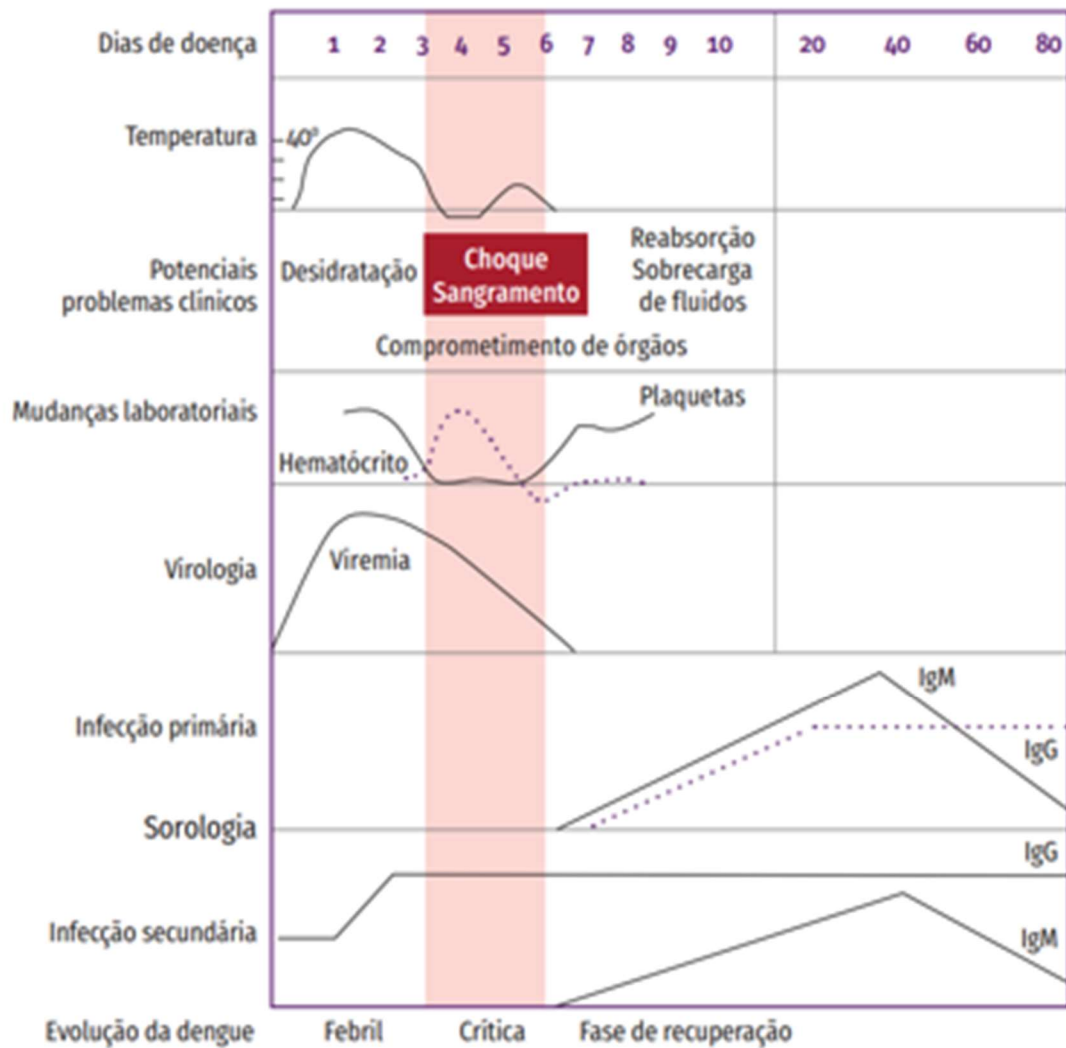
Nos pacientes que apresentam sintomas, a infecção manifesta-se em três etapas clínicas distintas: fase febril, fase crítica e fase de recuperação (Figura 7). A fase febril começa de maneira abrupta, com duração média de 2 a 7 dias, e é caracterizada por febre alta (entre 39 °C e 40 °C), dores de cabeça intensas, dor atrás dos olhos, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos e erupções cutâneas. Manifestações hemorrágicas leves, como sangramentos nasais e gengivais, também podem ocorrer, assim como linfadenopatia, leucopenia e trombocitopenia. Devido às suas características pouco específicas, essa fase pode ser confundida com outras viroses que causam febre aguda (Bhatt *et al.*, 2021; Kok *et al.*, 2023).

A fase crítica (ou fase de defervescência) ocorre quando a febre começa a diminuir, geralmente entre o 3º e o 7º dia dos sintomas. Essa é a etapa de maior risco para o desenvolvimento de formas graves da doença, destacando-se o aumento da permeabilidade vascular que resulta em extravasamento de plasma, derrames serosos (como ascite e derrame

pleural), hipotensão e sinais de choque hipovolêmico. A queda acentuada nas plaquetas, a leucopenia progressiva e o aumento do hematócrito são sinais laboratoriais significativos nessa fase. As formas graves da doença, como a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e a Síndrome do Choque da Dengue (SCD), manifestam-se com fenômenos hemorrágicos, disfunções cardiovasculares, coagulopatia, acidose metabólica, miocardite, encefalite e, em casos mais severos, falência múltipla de órgãos (Marques *et al.*, 2024; Verdeal *et al.*, 2011).

A fase de recuperação é marcada pela reabsorção gradual dos líquidos que foram extravasados, estabilização hemodinâmica, normalização do hematócrito e recuperação da contagem de plaquetas. Durante essa fase, o estado geral do paciente costuma melhorar; no entanto, sintomas persistentes como dor de cabeça, dor retroocular, fadiga, mialgia, artralgia, náuseas, insônia, queda de cabelo e prurido são frequentes. Um exantema característico pode aparecer, descrito como “ilhas brancas em um mar vermelho”, acompanhado de bradicardia transitória no eletrocardiograma. A administração de fluidos deve ser monitorada com atenção para evitar sobrecarga hídrica, que pode levar à insuficiência cardíaca congestiva ou a problemas respiratórios. Essa fase geralmente dura entre 1 e 3 dias (Lee *et al.*, 2022; Roy; Bhattacharjee, 2021; Verdeal *et al.*, 2011).

Figura 7. Fases da dengue.



Fonte: World Health Organization – WHO, 2009.

2.5.1. CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA E EVOLUÇÃO DA DOENÇA

Além dessas fases, a Organização Mundial da Saúde (OMS), com base nos achados do estudo multicêntrico DENCO (Dengue Control), propôs uma classificação clínica com o intuito de ampliar sua aplicabilidade prática e facilitar o manejo clínico da doença em diferentes níveis de atenção à saúde. Essa nova abordagem estabelece duas categorias principais para a doença: dengue (com ou sem sinais de alarme) e dengue grave (Figura 8).

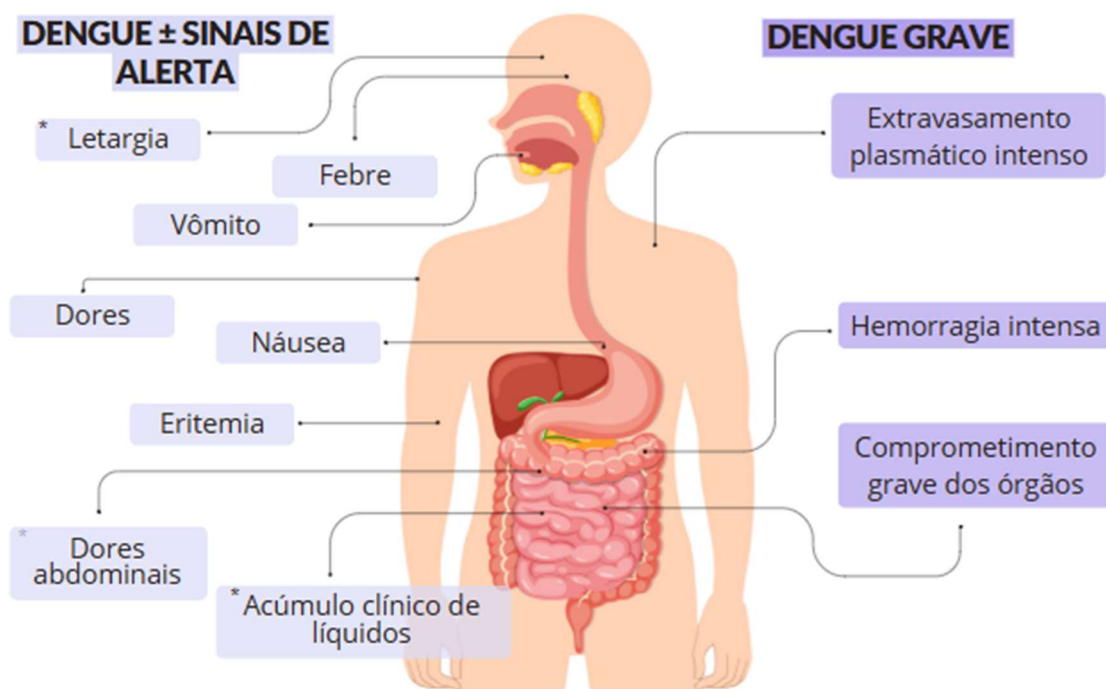
A dengue sem sinais de alarme corresponde à fase febril aguda da doença, cujos sintomas são geralmente inespecíficos e podem incluir febre alta, mialgia, cefaleia, artralgia, exantema e mal-estar generalizado. Nessa fase, a infecção pode se apresentar como uma síndrome febril comum, dificultando o diagnóstico diferencial com outras doenças febris agudas. A confirmação clínica torna-se mais provável quando há relatos de casos confirmados no mesmo

ambiente do paciente. No entanto, é importante destacar que esses achados não permitem prever, com precisão, a evolução benigna ou grave do quadro (Brasil, 2024b; WHO, 2009).

Já a dengue com sinais de alarme caracteriza-se pelo surgimento de manifestações clínicas que indicam risco de agravamento. Entre esses sinais destacam-se: dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, hepatomegalia, letargia ou irritabilidade, sangramento de mucosas, acúmulo de líquidos (derrame pleural, ascite, derrame pericárdico), além da elevação do hematócrito associada à queda acentuada na contagem de plaquetas. Esses sintomas refletem um aumento da permeabilidade capilar com extravasamento de plasma, que marca o início da fase crítica da doença. A identificação precoce desses sinais é essencial para o manejo clínico adequado e a prevenção de complicações (Brasil, 2024; WHO, 2009).

Por fim, a dengue grave representa a forma mais severa da infecção, sendo definida pela presença de um ou mais dos seguintes critérios: choque hipovolêmico causado por extravasamento significativo de plasma; sangramento profuso clinicamente relevante; e/ou comprometimento grave de órgãos, como disfunção hepática (ALT ou $AST \geq 1000$), alterações neurológicas (como rebaixamento do nível de consciência) e envolvimento cardíaco ou de outros sistemas vitais. A progressão para esta forma demanda cuidados intensivos imediatos, visto o alto risco de óbito se não for tratada de forma adequada e tempestiva (Brasil, 2024b; WHO, 2009).

Figura 8. Quadro clínico da dengue.



Fonte: Elaboração própria com elementos do Canva, baseado em OMS, 2023.

2.5.2. MECANISMOS IMUNOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO DENV

A fisiopatologia da dengue é fortemente influenciada pela resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção pelo vírus da dengue (DENV) (Sinha *et al.*, 2024). Após a inoculação viral pelo *Aedes aegypti*, o vírus infecta principalmente células do sistema mononuclear fagocitário, como monócitos, macrófagos e células dendríticas. Essas células atuam como os principais sítios de replicação viral, promovendo a ativação do sistema imune inato e adaptativo (Martina *et al.*, 2009; Rothman, 2011).

Na fase inicial da infecção, a ativação de receptores do tipo Toll (TLRs) e de outros sensores citoplasmáticos leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como os interferons tipo I (IFN- α e IFN- β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), TNF- α e quimiocinas, que desempenham papel fundamental no controle da replicação viral (Modhiran *et al.*, 2015). Contudo, essa resposta inflamatória exacerbada também está diretamente envolvida no dano tecidual e nas alterações vasculares características das formas graves da doença (Sinha *et al.*, 2024).

A proteína não estrutural NS1, secretada pelas células infectadas, interage com células endoteliais e com o sistema complemento, contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular, formação de poros na membrana celular e ativação inflamatória sistêmica (Modhiran *et al.*, 2015; Martina *et al.*, 2009). Esses processos levam ao extravasamento plasmático, fenômeno central nas formas graves da dengue, como a Síndrome do Choque da Dengue (DSS).

Outro aspecto crítico da imunopatologia da dengue é a amplificação dependente de anticorpos (*antibody-dependent enhancement* – ADE) (Sinha *et al.*, 2024). Esse mecanismo ocorre quando anticorpos gerados em uma infecção prévia por um sorotipo não neutralizam eficientemente um novo sorotipo, facilitando a entrada do vírus nas células fagocitárias via receptores Fc γ (Sinha *et al.*, 2024). Como resultado, há aumento da carga viral e exacerbção da resposta inflamatória, elevando o risco de manifestações clínicas severas (Halstead, 2003; Rothman, 2011).

Além disso, há supressão da hematopoese e comprometimento da função da medula óssea, o que contribui para a trombocitopenia, comum em pacientes com dengue. A ativação endotelial e plaquetária leva à liberação de mediadores vasoativos e à desregulação da hemostasia, o que pode resultar em coagulopatia, sangramentos e falência orgânica em casos mais avançados (Guzman *et al.*, 2010; Sinha *et al.*, 2024).

O desequilíbrio entre as respostas imunes protetoras e patológicas é, portanto, um fator determinante na progressão clínica da dengue. A melhor compreensão desses mecanismos tem sido fundamental tanto para o desenvolvimento de vacinas quanto para a busca por terapias antivirais e imunomoduladoras que possam prevenir a evolução para formas graves da doença (Sinha *et al.*, 2024).

2.6. CONTROLE E VACINA

O controle dos mosquitos é o principal método de prevenção e controle da dengue e de outras doenças transmitidas por vetores, por meio do manejo integrado de vetores ou da prevenção pessoal dentro das residências (Brasil, 2023b). Embora o Brasil conviva com epidemias de dengue desde o ano de 1981 (Teixeira; Barreto, 1996), até o momento não há uma vacina eficaz que proteja contra os quatro sorotipos. No entanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou duas vacinas, uma em 2015 e a mais recente em março de 2023 (Pimpim, 2023).

A primeira vacina autorizada no Brasil contra a dengue foi desenvolvida pelo laboratório francês Sanofi. Contudo, por apresentar riscos em casos de primeira infecção, passou a ser indicada apenas para evitar reinfecções. A Dengvaxia® (CYD-TDV) foi a primeira vacina licenciada em alguns países endêmicos e teve seu registro concedido pela ANVISA, no Brasil, em dezembro de 2015 (Godói, 2018). Para seu uso, são necessárias algumas recomendações, e ela se mostra pouco eficaz contra os quatro sorotipos, não sendo considerada específica para o controle clínico da dengue nem se configurando como uma terapia antiviral efetiva (Hasan *et al.*, 2016).

A segunda vacina aprovada pela ANVISA, a Qdenga, foi produzida pelo laboratório japonês Takeda Pharmaceutical Company. Trata-se de uma vacina de vírus atenuado e tetravalente, que apresentou eficácia de 80,2% na avaliação clínica. Diferentemente da vacina anterior, ela é destinada a um público mais amplo, entre 4 e 60 anos, podendo ser utilizada inclusive por pessoas que nunca tiveram contato com a doença (Brasil, 2024b).

2.7. MOLÉCULAS ANTIVIRAIS

A dengue representa um alto custo para a sociedade, envolvendo salários perdidos, diminuição da produtividade e despesas relacionadas à prestação de cuidados de saúde, além de custos médicos diretos (Pereira *et al.*, 2014). Nesse contexto, a utilização de moléculas com atividade antiviral configura-se como uma estratégia importante para a redução de gastos e para um tratamento mais eficaz. Para isso, empregam-se análises *in silico*, como estudos de

similaridade estrutural, modelos de relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica (QSAR), acoplamento molecular (*molecular docking*), dinâmicas moleculares e outros métodos de aprendizado de máquina (MLT) (Barrows, 2016).

Essas análises, aliadas a testes *in vitro* e à triagem de substâncias sintéticas, semissintéticas e de produtos naturais, podem ser ferramentas promissoras para o desenvolvimento de novas terapias antivirais (Leonel *et al.*, 2018). Considerando que uma carga viral elevada pode favorecer a progressão para a forma grave da dengue, a identificação de antivirais específicos para o DENV tem sido um foco importante nas pesquisas terapêuticas. Os produtos naturais oferecem vantagens nessa busca (Koishi, 2014), sendo considerados uma alternativa eficiente e economicamente viável. Ademais, podem causar menos efeitos colaterais em comparação aos medicamentos sintéticos (Estevam, 2017).

2.7.1. ATIVIDADE ANTIVIRAL EM FUNGOS

Os fungos proporcionam uma enorme gama de compostos bioativos, incluindo diferentes classes de metabólitos secundários, tais como terpenoides, poliquetídeos, alcaloides, poliacetilenos e outros, com variadas atividades biológicas. Um dos produtos naturais mais conhecidos derivados de fungos (*Penicillium notatum*) é a penicilina, descoberta em 1929 por Alexander Fleming, utilizado amplamente como antibiótico (Mann, 1994).

Os macrofungos (políporos), basidiomicetos e ascomicetos são uma importante fonte de substâncias farmacologicamente ativas. Cerca de 75% dos fungos políporos testados mostraram forte atividade antimicrobiana, e muitos exibiram atividades antiviral, citotóxica, antineoplásica, cardiovascular, anti-inflamatória, imunomoduladora e anticancerígena (Zjawiony, 2004). Extratos obtidos de fungos basidiomicetos demonstraram atividade antiviral contra o vírus Influenza A, *in vitro* e *in vivo* (Kabanov *et al.*, 2014). Em outro estudo, verificou-se que o extrato aquoso do fungo *Inonotus obliquus* possui efeito virucida elevado contra o vírus da hepatite C (Shibnev *et al.*, 2011).

Diante das ações biológicas descritas e da busca por fármacos que reduzam os principais fatores envolvidos na gravidade da dengue, propõe-se a investigação *in vitro* do peptídeo Glandicolina B.

2.7.2. GLANDICOLINA B

A Glandicolina B é um alcaloide indólico produzido por fungos do gênero *Penicillium*. Trata-se de um importante intermediário na biossíntese das micotoxinas meleagrinas e oxalina, de natureza heterocíclica, cuja estrutura química complexa inclui grupos indólicos,

imidazólicos e lactâmicos, conferindo-lhe propriedades biológicas diversas, com destaque para sua atividade antibacteriana (Koolen *et al.*, 2012). A fórmula molecular da glandicolina B é $C_{22}H_{21}N_5O_4$, com massa molar de aproximadamente 419,43 g/mol, e sua classificação química inclui também compostos enólicos e heterotetracíclicos orgânicos (Koolen *et al.*, 2012).

No contexto da biossíntese fúngica, a Glandicolina B representa um intermediário na via de formação da roquefortina C e da meleagrina, outras micotoxinas produzidas por espécies de *Penicillium*. Sua síntese ocorre a partir da modificação enzimática da roquefortina C, catalisada por monooxigenases específicas (RoqM e RoqO), seguida por uma metilação promovida pela enzima RoqN (Glandicolina B O-metiltransferase), que converte a molécula em meleagrina (Ali *et al.*, 2013; Kosalková *et al.*, 2015). Essas reações são parte de um sofisticado sistema biossintético que exemplifica a versatilidade metabólica dos fungos na produção de compostos bioativos.

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista, o caráter emergente e reemergente da dengue, com forte prevalência nas regiões tropicais e subtropicais, como é o caso de Manaus. Anualmente, a doença resulta em diversas mortes, representando uma significativa preocupação para a saúde pública global. Nesse contexto, é fundamental a continuidade das pesquisas e o desenvolvimento de tratamentos eficazes, não apenas para combater o vírus, mas também para modular a resposta inflamatória e aliviar os sintomas da doença. A busca por terapias que reduzam a gravidade da dengue e, conseqüentemente, o número de casos fatais, é crucial para o enfrentamento desse desafio de saúde pública.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Avaliar a possível atividade antiviral do peptídeo Glandicolina B em linhagem de hepatócitos infectados pelo vírus DENV-2.

4.2. ESPECÍFICOS

- Verificar a citotoxicidade do peptídeo Glandicolina B na cultura de hepatócitos (Huh-7);
- Dosar por ELISA o antígeno viral NS1 nos sobrenadantes de Huh-7 infectadas pelo DENV-2.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Imunofarmacologia Celular - LIFCEL da Universidade Estadual do Amazonas – UEA, situado na Escola Normal Superior – ENS.

5.1. GLANDICOLINA B

A substância Glandicolina B foi isolada do fungo *Penicillium rubens*, no laboratório de Bioensaio e Microrganismos da Amazônia - LABMICRA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM e cedida pela Dra. Antônia Queiroz Lima de Souza para o Laboratório de Imunofarmacologia Celular - LIFCEL da Universidade Estadual do Amazonas – UEA.

5.2. LINHAGEM CELULAR E DENV-2

A linhagem celular de hepatócitos (Huh-7) e as alíquotas do DENV-2 foram gentilmente doados pela Dra. Claire Fernandes Kubelka, do Laboratório de Imunologia Viral da FIOCRUZ-RJ para o Laboratório de Imunofarmacologia Celular (LIFCEL) da Escola Normal Superior – ENS da UEA.

As células Huh-7 foram cultivadas em frascos de cultura (25 cm²) com 8 ml de meio de cultura DMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de Estreptomicina e 100U/mL de Penicilina, e mantidos em estufa com 37 °C e 5% de CO². Uma vez observada a formação de uma monocamada confluyente, os hepatócitos foram passados para novas garrafas (expansão celular). Quando necessário, para manter um estoque, as células foram congeladas em criotubos contendo solução de DMSO a 10% numa temperatura de -80 °C.

5.3. AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR

A substância Glandicolina B foi avaliada quanto à sua citotoxicidade nas células Huh-7 por meio de ensaios colorimétricos quantitativos de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) diphenyl tetrazolium bromide) (Mosmann, 1983).

O MTT é um sal hidrossolúvel que tem sua estrutura molecular em forma de anel, e é clivado por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, dando origem aos cristais de Formazan de coloração violeta. Este sal é armazenado no citoplasma celular e solubilizado após adição de dimetilsulfóxido (DMSO) ocorrendo formação de um produto de coloração roxa, cuja intensidade de cor é lida em espectrofotômetro a 540 nm, de modo que, a absorbância obtida é diretamente proporcional à viabilidade celular (Mosmann, 1983).

Foram utilizadas três placas de 96 poços, sendo cada uma destinada a um tempo experimental específico: 24, 48 e 72 horas. Em cada poço, foram semeadas 1×10⁴ células da linhagem Huh-7, totalizando 44 poços utilizados por placa. As placas foram então incubadas

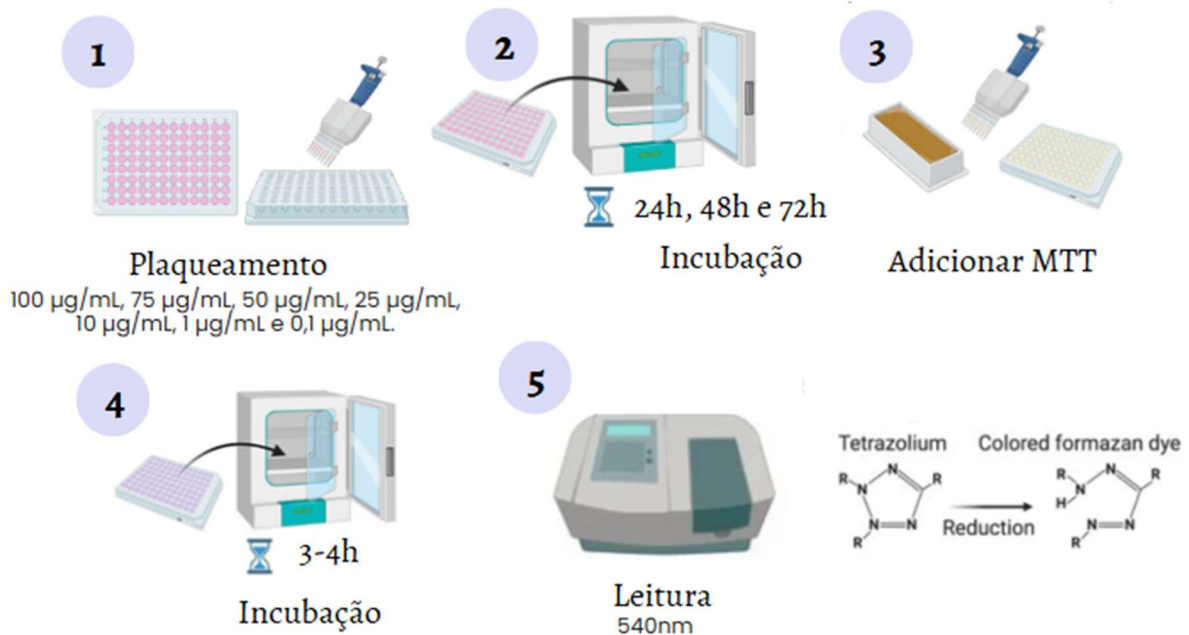
em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações do peptídeo Glandicolina B: 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL, conforme ilustrado na figura 9.

Os tratamentos foram distribuídos conforme o seguinte esquema experimental (em quadruplicata):

- A1–D1: Controle positivo
- A2–D2: Controle negativo
- A3–D3: Glandicolina B – 100 µg/mL
- A4–D4: Glandicolina B – 75 µg/mL
- A5–D5: Glandicolina B – 50 µg/mL
- A6–D6: Glandicolina B – 25 µg/mL
- A7–D7: Glandicolina B – 10 µg/mL
- A8–D8: Glandicolina B – 1 µg/mL
- A9–D9: Glandicolina B – 0,1 µg/mL
- A10–D10: Controle com DMSO a 0,2%
- A11–D11: Controle com DMSO a 0,02%

Após a adição da Glandicolina B, o ensaio de viabilidade celular MTT foi realizado em diferentes intervalos de tempo, conforme cada placa: 24 horas (placa 1), 48 horas (placa 2) e 72 horas (placa 3). Esse delineamento permitiu a análise cinética do efeito tempo-dependente do peptídeo sobre a viabilidade em células Huh-7. Esse procedimento foi realizado três vezes.

Figura 9. Esquema ilustrativo do procedimento de avaliação da viabilidade celular.



Fonte: Elaboração própria com elementos do Canva.

5.4. INFECCÃO E TRATAMENTO DA LINHAGEM DE HEPATÓCITOS (HUH-7)

Para os ensaios de infecção da linhagem Huh-7, foi utilizada a cepa asiática padrão universal do vírus DENV-2 (16681). Inicialmente, foram semeadas 2×10^5 células por poço em placas de cultura de 24 poços, completando-se o volume com meio de cultura DMEM até 1.000 µL por poço. As placas foram então incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas para permitir a aderência e estabilização celular (Figura 10).

Após esse período, o sobrenadante foi removido e substituído por 250 µL de inóculo viral, diluído na proporção de 1:10 em meio DMEM sem soro fetal bovino (SFB). Os poços destinados ao controle negativo não receberam o inóculo viral. O processo de adsorção viral foi realizado por 2 horas, em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, com homogeneização a cada 20 minutos para garantir a distribuição uniforme do vírus.

Finalizado o período de adsorção, o inóculo foi descartado, e adicionaram-se 500 µL por poço de DMEM suplementado com 10% de SFB. Os poços infectados foram então tratados com diferentes concentrações do peptídeo Glandicolina B: 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL.

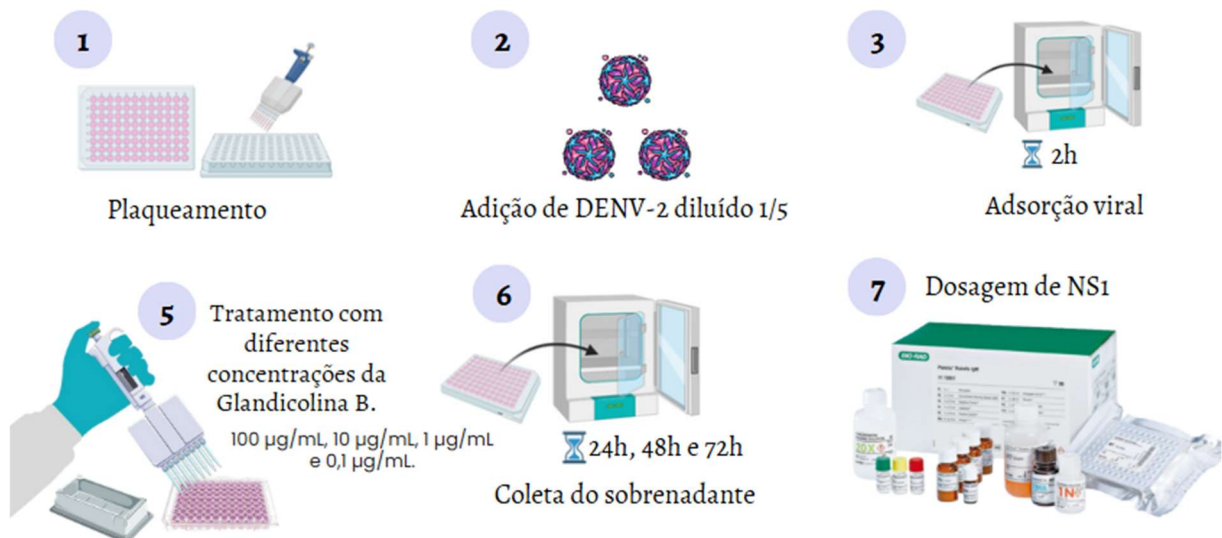
Os tratamentos foram distribuídos em triplicata, conforme o seguinte esquema experimental:

- A1–C1: Controle positivo (células infectadas, sem tratamento)
- A2–C2: Glandicolina B – 100 µg/mL

- A3–C3: Glandicolina B – 10 µg/mL
- A4–C4: Glandicolina B – 1 µg/mL
- A5–C5: Glandicolina B – 0,1 µg/mL
- A6–C6: Controle negativo (células não infectadas)

Após o tratamento, as placas foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, sendo que, a cada 24 horas, durante três dias consecutivos, os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados, identificados e armazenados a –80 °C para posterior quantificação do antígeno viral NS1 por ensaio ELISA.

Figura 10. Esquema ilustrativo do procedimento de infecção e tratamento.



Fonte: Elaboração própria com elementos do Canva.

5.5. ATIVIDADE ANTIVIRAL

A possível atividade antiviral foi determinada usando o Kit de ELISA Platelia Dengue NS1 Ag (BioRad), que é um ensaio imunoenzimático rápido e confiável para a quantificação relativa de antígeno NS1 de pacientes (Silva *et al.*, 2011) e no sobrenadantes de células em cultura (Ceballos-Olvera *et al.*, 2010).

Inicialmente, foi realizada a quantificação da massa viral por meio de uma curva de diluição na amostra viral. As diluições testadas foram: 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:200, 1:400, 1:600 e 1:800. A partir dos resultados obtidos, a diluição de 1:400 foi selecionada para os experimentos posteriores, por apresentar valores ideais para detecção e quantificação da proteína NS1.

Com base na diluição padronizada, foi realizado o ensaio de dosagem da proteína NS1 com as diferentes concentrações da Glandicolina B aliqüatadas no ensaio de infecção e tratamento

realizados anteriormente. O ensaio foi conduzido em placa de 96 poços, conforme a distribuição a seguir:

- A1: Ensaio 1 - Controle positivo - poço A
- B1: Ensaio 1 - Controle positivo - poço B
- C1: Ensaio 1 - Controle positivo - poço C
- D1: Ensaio 1 - C=100µg/mL - poço A
- E1: Ensaio 1 - C=100µg/mL - poço B
- F1: Ensaio 1 - C=100µg/mL - poço C
- G1: Ensaio 1 - C=10µg/mL - poço A
- H1: Ensaio 1 - C=10µg/mL - poço B
- A2: Ensaio 1 - C=10µg/mL - poço C
- B2: Ensaio 1 - C=1µg/mL - poço A
- C2: Ensaio 1 - C=1µg/mL - poço B
- D2: Ensaio 1 - C=1µg/mL - poço C
- E2: Ensaio 1 - C=0,1µg/mL - poço A
- F2: Ensaio 1 - C=0,1µg/mL - poço B
- G2: Ensaio 1 - C=0,1µg/mL - poço C
- H2: Ensaio 1 - Controle negativo - poço A
- A3: Ensaio 1 - Controle negativo - poço B
- B3: Ensaio 1 - Controle negativo - poço C
- C3: Ensaio 2 - Controle positivo - poço A
- D3: Ensaio 2 - Controle positivo - poço B
- E3: Ensaio 2 - Controle positivo - poço C
- F3: Ensaio 2 - C=100µg/mL - poço A
- G3: Ensaio 2 - C=100µg/mL - poço B
- H3: Ensaio 2 - C=100µg/mL - poço C
- A4: Ensaio 2 - C=10µg/mL - poço A
- B4: Ensaio 2 - C=10µg/mL - poço B
- C4: Ensaio 2 - C=10µg/mL - poço C
- D4: Ensaio 2 - C=1µg/mL - poço A
- E4: Ensaio 2 - C=1µg/mL - poço B
- F4: Ensaio 2 - C=1µg/mL - poço C

- G4: Ensaio 2 - C=0,1µg/mL - poço A
- H4: Ensaio 2 - C=0,1µg/mL - poço B
- A5: Ensaio 2 - C=0,1µg/mL - poço C
- B5: Ensaio 2 - Controle negativo - poço A
- C5: Ensaio 2 - Controle negativo - poço B
- D5: Ensaio 2 - Controle negativo - poço C
- E5: Ensaio 3 - Controle positivo - poço A
- F5: Ensaio 3 - Controle positivo - poço B
- G5: Ensaio 3 - Controle positivo - poço C
- H5: Ensaio 3 - C=100µg/mL - poço A
- A6: Ensaio 3 - C=100µg/mL - poço B
- B6: Ensaio 3 - C=100µg/mL - poço C
- C6: Ensaio 3 - C=10µg/mL - poço A
- D6: Ensaio 3 - C=10µg/mL - poço B
- E6: Ensaio 3 - C=10µg/mL - poço C
- F6: Ensaio 3 - C=1µg/mL - poço A
- G6: Ensaio 3 - C=1µg/mL - poço B
- H6: Ensaio 3 - C=1µg/mL - poço C
- A7: Ensaio 3 - C=0,1µg/mL - poço A
- B7: Ensaio 3 - C=0,1µg/mL - poço B
- C7: Ensaio 3 - C=0,1µg/mL - poço C
- D7: Ensaio 3 - Controle negativo - poço A
- E7: Ensaio 3 - Controle negativo - poço B
- F7: Ensaio 3 - Controle negativo - poço C
- G7: Ensaio 1 - C=100µg/mL - poço B
- H7: Ensaio 3 - C=100µg/mL - poço A

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da viabilidade celular da Glandicolina B foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico com MTT. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (Berridge; Tan, 1993). O ensaio detecta células viáveis, e o aumento de formazan

em culturas celulares *in vitro* indica a sobrevivência e a proliferação celular. Portanto, trata-se de um método colorimétrico quantitativo rápido, de baixo custo e amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade e a proliferação celular (Mosmann, 1983).

De acordo com trabalhos descritos anteriormente (Lima-Junior *et al.*, 2013; Mello *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2008), são consideradas tóxicas as concentrações que induzem uma redução superior a 10% na produção de formazan, em relação ao controle positivo. Seguindo estes parâmetros, neste trabalho, a molécula Glandicolina B não apresentou citotoxicidade significativa nas células Huh-7 após a cinética de 24h, 48h e 72h (Figura 11 e Tabela I) de exposição. As diferentes concentrações testadas (100µg/mL, 75µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 10µg/mL, 1µg/mL e 0,1µg/mL) mantiveram a viabilidade celular acima de 90%, sendo que, em algumas delas, como a de 75 µg/mL, observou-se um leve aumento da atividade metabólica em relação ao controle positivo. Esse resultado pode indicar um possível efeito proliferativo ou estimulante em determinadas doses.

O controle negativo, composto por células infectadas por DENV-2, apresentou valores de viabilidade próximos a zero, validando a sensibilidade do ensaio. Já os grupos tratados com DMSO (0,02%, 0,1% e 0,2%), utilizado como solvente, não demonstraram efeitos deletérios sobre a viabilidade celular, mantendo níveis semelhantes ao controle positivo. Isso evidencia que os efeitos observados não são decorrentes do solvente, mas refletem a ação específica da molécula testada.

Figura 11. Avaliação da citotoxicidade da Glandicolina B em células Huh-7 após 24h, 48h e 72h de tratamento. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT usando diferentes concentrações de Glandicolina B. Os dados foram normalizados utilizando-se como referência o controle positivo de células sem o tratamento (100% viabilidade celular) e o controle negativo (células tratadas com 3% de Tween 20). Cada gráfico representa a média de 3 experimentos independentes em triplicata.

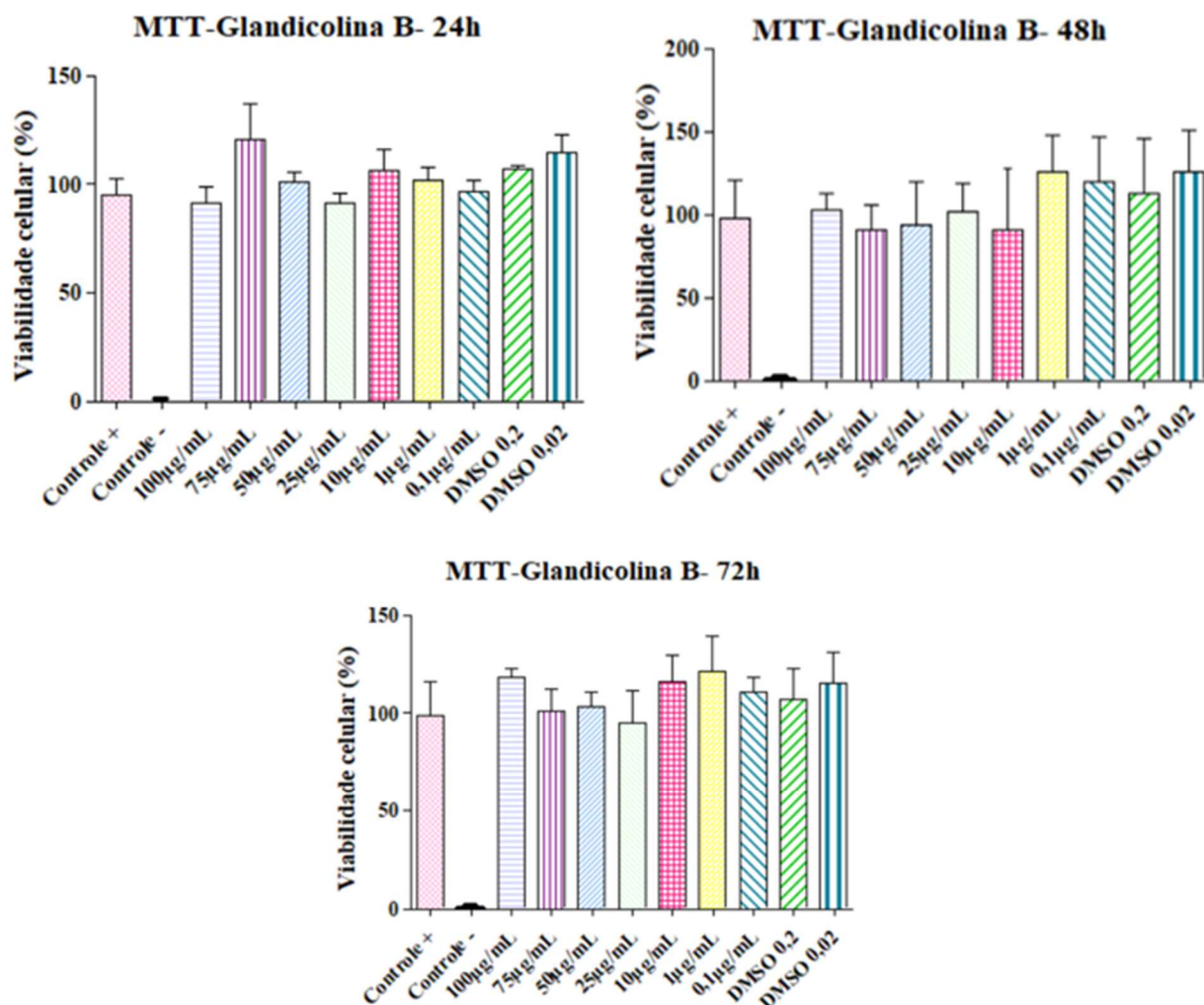


Tabela 1. Citotoxicidade celular da Glandicolina B em células Huh-7 durante 24h, 48h e 72h.

Nesta tabela estão os valores das porcentagens dos ensaios de MTT mostrados nos gráficos acima.

	Controle +	Controle -	100 µg/mL	75 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	10 µg/mL	1 µg/mL	0,1 µg/mL	DMSO 0,2%	DMSO 0,02%
24h	95.26	95.26	95.26	95.26	95.26	95.26	95.26	95.26	95.26	95.26	95.26
48h	97.3	0.31	102.42	90.84	93.77	102.06	91.07	125.78	119.3	113.14	125.36
72h	98.85	0.15	118.48	101.13	103.56	94.66	116.2	121.35	110.67	107.29	115.23

6.2. ATIVIDADE ANTIVIRAL

A dosagem da proteína NS1 foi realizada nos sobrenadantes do ensaio de 48 horas após o tratamento das células Huh-7 infectadas com DENV-2, com o objetivo de avaliar o efeito da molécula Glandicolina B na produção viral. Os dados obtidos foram expressos em densidade óptica (DO) a 450nm, conforme mostrado na Figura 12 e Tabela 2.

O controle positivo (sobrenadante infectado com DENV-2 sem tratamento) apresentou os maiores níveis de expressão de NS1, confirmando a efetividade da infecção viral. Em contraste, o controle celular negativo (sobrenadante de células Huh-7 não infectadas) apresentou valores próximos de zero, validando a especificidade do ensaio.

Nos grupos tratados com Glandicolina B, nas concentrações de 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL, observou-se uma leve redução nos níveis de NS1 em comparação ao grupo infectado sem tratamento. No entanto, essas reduções não apresentaram significância estatística (*teste-t* pareado) mantendo-se próxima dos valores observados no controle positivo. A concentração de 100 µg/mL apresentou a menor média entre os grupos tratados, sugerindo um discreto efeito inibitório na produção de NS1, embora insuficiente para caracterizar uma atividade antiviral marcante sob as condições testadas.

Esses resultados indicam que, nas condições experimentais adotadas, a Glandicolina B não demonstrou inibição significativa da replicação viral, medida indiretamente pela dosagem da proteína NS1, sugerindo a necessidade de novos testes com ajustes de tempo, concentrações ou combinações terapêuticas.

A dosagem da proteína NS1 nos tempos de 24h e 72h não foi realizada em razão da indisponibilidade de recursos financeiros para a aquisição de mais kits de ELISA. No entanto, há perspectiva de realizar esses experimentos em etapas futuras da pesquisa, a fim de obter um panorama mais completo da cinética de liberação da NS1. É importante destacar que estudos anteriores, como o de Reis *et al.* (2008), realizaram a quantificação da NS1 utilizando apenas o sobrenadante de monócitos infectados por 48 horas com DENV, demonstrando que esse tempo de infecção é suficiente para detectar níveis expressivos da proteína. Assim, os dados obtidos aos 48h já fornecem uma base relevante para avaliação preliminar da resposta viral, embora análises em múltiplos tempos possam aprofundar a compreensão dos efeitos da molécula testada sobre a dinâmica da infecção.

Figura 12. Avaliação da atividade antiviral de Glandicolina B em células Huh-7 infectadas pelo DENV-2 realizada por dosagem do antígeno NS1.

As células Huh-7 foram infectadas com DENV-2 e depois tratadas com diferentes concentrações da Glandicolina B (100µg/mL, 10µg/mL, 1µg/mL e 0,1µg/mL) durante 24h. A atividade antiviral foi determinada pela quantificação do antígeno NS1, por ELISA, no sobrenadante das células Huh-7 infectadas e tratadas. DO = densidade óptica em 450 nm.

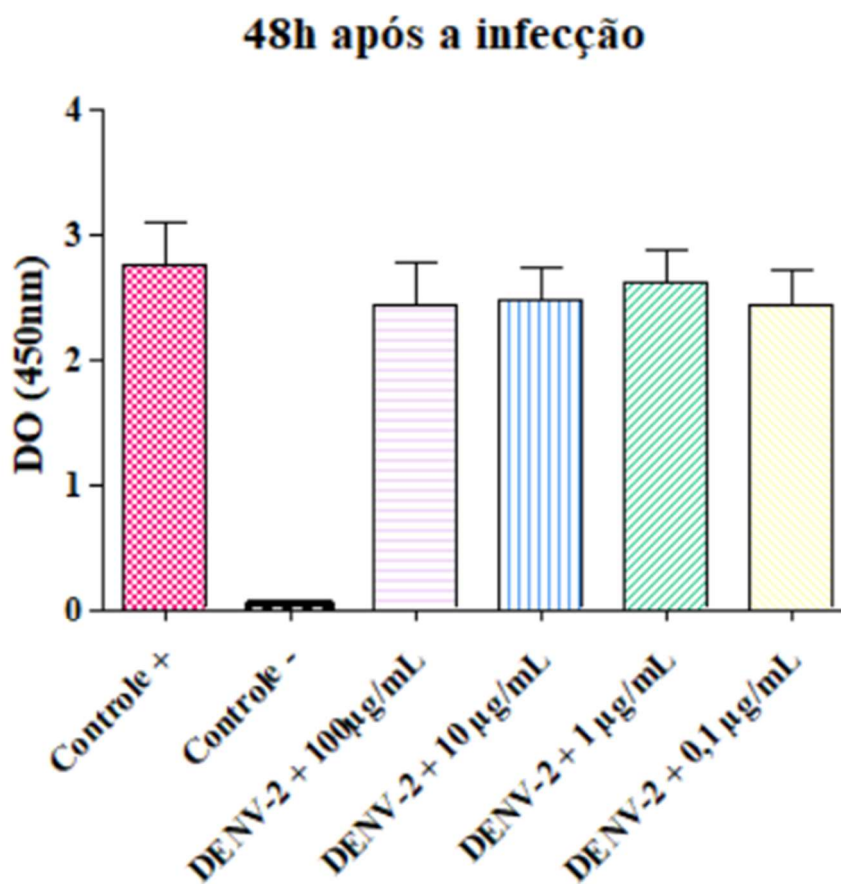


Tabela 2. Avaliação da atividade antiviral de Glandicolina B em células Huh-7 infectadas pelo DENV-2 realizada por dosagem do antígeno NS1.

Nesta tabela estão os valores das médias das DO's dos ensaios de dosagem da proteína NS1 mostrados no gráfico acima.

	Controle +	Controle -	100µg/mL	10µg/mL	1µg/mL	0,1µg/mL
1º ensaio	3.88	0.05	2.5	3.07	2.73	2.49
2º ensaio	2.83	0.05	3.22	2.89	3.37	3.31
3º ensaio	1.52	0.07	1.58	1.47	1.75	1.46

7. CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo principal avaliar a atividade antiviral do peptídeo Glandicolina B em hepatócitos humanos (Huh-7) infectados *in vitro* pelo vírus da dengue (DENV-2). Os resultados demonstraram que a substância apresentou baixa citotoxicidade em todas as concentrações testadas, mantendo a viabilidade celular acima de 90%, o que indica sua segurança para uso em modelos celulares. No entanto, apesar de sua segurança, os testes de dosagem da proteína viral NS1 por ELISA não evidenciaram inibição estatisticamente significativa da replicação viral, embora tenha sido observada uma leve redução nos níveis da proteína em concentrações mais elevadas. Esses achados sugerem que, embora a Glandicolina B não tenha demonstrado uma ação antiviral eficaz nas condições avaliadas, seu potencial terapêutico não deve ser descartado.

Adicionalmente, destaca-se que, mesmo na ausência de efeitos antivirais significativos, nada impede que sejam conduzidas análises complementares, como a dosagem de citocinas inflamatórias, com o objetivo de investigar possíveis efeitos imunomoduladores da Glandicolina B. Essa abordagem pode revelar outras formas de atuação da molécula na resposta do hospedeiro à infecção viral.

Reforça-se, portanto, a necessidade de realizar novos experimentos com ajustes nas concentrações testadas, tempo de incubação, combinação com outros compostos antivirais e avaliação de outros marcadores virais. A continuidade dessas investigações pode contribuir significativamente para a descoberta de alternativas terapêuticas eficazes contra a dengue, uma doença que permanece como um grave problema de saúde pública, especialmente em países tropicais como o Brasil.

8. REFERÊNCIAS

- ACOSTA, E.G. *et al.* Functional entry of Dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 2, p. 474-484, 2008.
- ALI, H. *et al.* A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*. **PLoS one**, v. 8, n. 6, p. e65328, 2013.
- BARROWS, N.J. *et al.* A screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 2, p. 259-270, 2016.
- BERRIDGE, M.V.; TAN, A.S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.
- BHATT, P. *et al.* Current understanding of the pathogenesis of Dengue virus infection. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 17-32, 2021.
- BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.
- BRASIL. M.S. Dengue: causas, sintomas, tratamento e prevenção, 2023.
- BRASIL. M.S. Dengue: diagnóstico e manejo clínico. 6. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024b.
- BRASIL. M.S. Monitoramento das arboviroses, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/aedes-aegypti/monitoramento-das-arboviroses>. Acesso em: 19 maio 2025.
- BRASIL. M.S. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas (Dengue, Chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas 1 a 14 de 2024a. Volume 55, n. 11. Brasília: Ministério da Saúde, 2024a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-11.pdf>. Acesso em: 9 maio 2025.
- BYK, L.A.; GAMARNIK, A.V. Properties and functions of the Dengue virus capsid protein. **Annual Review of Virology**, v. 3, n. 1, p. 263-281, 2016.
- CEBALLOS-OLVERA, I. *et al.* JNK phosphorylation, induced during Dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. **Virology**, v. 396, n. 1, p. 30-36, 2010.

ESTEVAM, E.B.B. Composição química e atividades biológicas do óleo essencial das folhas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* e dos frutos verdes e folhas de *Protium ovatum*. 91F. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2017

FARRAR, J. *et al.* Towards a global dengue research agenda. **Tropical Medicine & International Health: TM & IH**, v. 12, n. 6, p. 695, 2007.

FISHBURN, A.T. *et al.* Let's get physical: flavivirus-host protein-protein interactions in replication and pathogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 847588, 2022.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

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.

GODÓI, I.P. Avaliação econômica de uma vacina da dengue no Brasil baseado em seu valor terapêutico no sistema único de saúde. 190F. Tese (Doutorado em Medicamentos e Assistência Farmacêutica) -Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

GUZMAN, M.G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. Suppl 12, p. S7-S16, 2010.

GUZMAN, M.G.; HARRIS, E. Dengue. **The Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453-465, 2015.

GUZMÁN, M.G. *et al.* A study of fatal hemorrhagic dengue cases in Cuba, 1981. Bulletin of the Pan American Health Organization (PAHO); 18 (3), 1984, 1984.

HALSTEAD, S.B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ?. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 20, p. 407-415, 2006.

HALSTEAD, S.B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of Dengue viruses. 2003.

HASAN, S. *et al.* Dengue virus: a global human threat: review of literature. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, 2016.

HEINZ, F.X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4301-4306, 2012.

HENDERSON, B.R. *et al.* Analysis of RNA binding by the Dengue virus NS5 RNA capping enzyme. **PLoS one**, v. 6, n. 10, p. e25795, 2011.

HOWE GM. A world geography of human diseases. New York: **Academic Press**. 302-317. 1977.

- JOHNSON, B.W. Neurotropic flaviviruses. Neurotropic **Viral Infections: Volume 1: Neurotropic RNA Viruses**, p. 229-258, 2016.
- KABANOV, A.S. *et al.* Study of antiviral activity of extracts obtained from basidial fungi against influenza viruses of different subtypes in experiments *in vitro* and *in vivo*. **Brazilian Journal of Poultry Science**. v. 14, n. 3, p. 275–280, 2014.
- KOISHI, A.C. Caracterização do efeito de substâncias naturais extraídas de macroalgas marinhas e de um painel de substâncias sintéticas na inibição da infecção pelo vírus da dengue em modelo *in vitro*. 130F. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- KOK, B.H. *et al.* Dengue virus infection—a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy. **Virus Research**, v. 324, p. 199018, 2023.
- KOOLEN, H.H.F. *et al.* An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. An endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L. **Química Nova**, v. 35, p. 771-774, 2012.
- KORSMAN, S.N.J. *et al.* VIROLOGIA. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora LTDA, 2014.
- KOSALKOVÁ, K. *et al.* A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrins in three different *Penicillium roqueforti* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 7601-7612, 2015.
- KUHN, R.J. *et al.* Structure of Dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.
- LEE, M.F. *et al.* Innate and adaptive immune evasion by Dengue virus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1-14, 2022.
- LEE, W.H.K. *et al.* Dengue virus protease activity modulated by dynamics of protease cofactor. **Biophysical Journal**, v. 120, n. 12, p. 2444-2453, 2021.
- LEONEL, C.A. *et al.* Pharmacophoric characteristics of dengue virus ns2b/ns3pro inhibitors: a systematic review of the most promising compounds. **Arquivos de Virologia**, v. 163, n. 3, p. 575–586, 2018.
- LIBRATY, D.H. *et al.* High circulating levels of the Dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165-1168, 2002.
- LIMA-JUNIOR, R.S. *et al.* *Uncaria tomentosa* alkaloidal fraction reduces paracellular permeability, IL-8 and NS1 production on human microvascular endothelial cells infected with Dengue virus. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 11, p. 1934578X1300801112, 2013.

LOPES, N. *et al.* Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 10-10, 2014.

MACIEL, I.J. *et al.* Epidemiologia e desafios no controle do Dengue. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 2, p. 111-130, 2008.

MAHMOOD, S. Dengue: An epidemic is largely a failure in public health administration. In: 11th Asian Conference on Diarrhoeal Diseases and Nutrition (ASCODD). 2006.

MANN J. Murder, Magic, and Medicine. 1 ed. New York: Oxford University Press. p. 164–170, 1994.

MARQUES, A.B. *et al.* Dengue-perspectivas atuais e desafios futuros. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, n. 1, p. 6765-6773, 2024.

MARTINA, B.E.E. *et al.* Dengue virus pathogenesis: an integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564-581, 2009.

MCLEAN, J.E. *et al.* Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 25, p. 22147-22159, 2011.

MELLO, C.S. *et al.* Decrease in Dengue virus-2 infection and reduction of cytokine/chemokine production by *Uncaria guianensis* in human hepatocyte cell line Huh-7. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 458-468, 2017.

MODHIRAN, N. *et al.* Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, p. 304ra142-304ra142, 2015.

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

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological**, v. 65, p. 55-63. 1983.

MUSTAFA, M.S. *et al.* Discovery of fifth serotype of Dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p. 67-70, 2015.

NEUFELDT, C.J. *et al.* ER-shaping atlastin proteins act as central hubs to promote flavivirus replication and virion assembly. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 2416-2429, 2019.

NORMILE, D. Surprising new Dengue virus throws a spanner in disease control efforts. 2013.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Dengue e dengue grave. 2023.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Epidemiological Update: Dengue in the Americas. Washington, D.C., 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents>. Acesso em: 11 maio 2025.

PEREIRA, C.A.R. *et al.* Avaliação econômica dos casos de dengue atribuídos ao desastre de 2011 em Nova Friburgo (RJ), Brasil. **Ciência & Saúde coletiva**, v. 19, p. 3693-3704, 2014.

PIMPIM, E.M.L. Análise de sentimentos dos usuários da rede social x sobre a vacina da dengue no Brasil, 2023.

PINHEIRO, F. Re-emergence of dengue and emergence of dengue haemorrhagic fever in the Americas. 1997.

PINHEIRO, F.P.; TRAVASSOS-DA-ROSA, J.F.S. Febres hemorrágicas viróticas. Febre hemorrágica do dengue. **Tratado de Infectologia**. p. 258-263, São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

POMPEO, C.M. Dengue: caracterização clínica e variáveis associadas ao agravamento. 72F. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Enfermagem) Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2016.

POSTLER, T.S. *et al.* Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. **Archives of Virology**, v. 168, n. 9, p. 224, 2023.

REIS, S.R. *et al.* Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 3, p. 468-476, 2008.

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.

ROY, S.K.; BHATTACHARJEE, S. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 687-702, 2021.

SANTOS, V.L. O papel do capsídeo dos Flavivírus na interação com hospedeiros vertebrados e invertebrados: a influência das condições biofísicas nessas interações. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

SHIBNEV, V.A. *et al.* Antiviral activity of *Inonotus obliquus* fungus extract towards infection caused by Hepatitis c virus in cell cultures. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 151, n. 5, p. 612-614, 2011.

- SILVA, F.G. *et al.* Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-Dengue – São Paulo. **Bepa**, v. 8, n. 91, p. 14-26, 2011.
- SINHA, S. *et al.* Dengue virus pathogenesis and host molecular machineries. **Journal of Biomedical Science**, v. 31, n. 1, p. 43, 2024.
- TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do Dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 867-871, 2002.
- TAY, M.Y.F. *et al.* Nuclear localization of dengue virus (DENV) 1–4 non-structural protein 5; protection against all 4 DENV serotypes by the inhibitor Ivermectin. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2013.
- TEIXEIRA, M.D.G.; BARRETO, M. L. Porque devemos, de novo, erradicar o *Aedes aegypti*. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 1, n. 1, p. 122–136, 1996.
- TEIXEIRA, M.G. *et al.* Epidemiologia e medidas de prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, 1999.
- TEIXEIRA, M.G. *et al.* Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. S7-S18, 2009.
- VASCONCELOS, P.F.C. *et al.* Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. **The Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 91-97, 2001.
- VASILAKIS, N. *et al.* Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532-541, 2011.
- VERDEAL, J.C.R. *et al.* Recomendações para o manejo de pacientes com formas graves de dengue. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, p. 125-133, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue and severe dengue. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 11 maio 2025.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control – New edition. Geneva: WHO, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 2009.
- ZJAWIONY, J.K. Biologically active compounds from aphyllloporales (polypore) fungi. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 300–310, 2004.