UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Vanessa Danielle Menjon Müller

**Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e
escorpião contra os virus da dengue e da febre amarela**

Ribeirão Preto

2011

VANESSA DANIELLE MENJON MÜLLER

**Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e
escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino
Quintana

Versão corrigida da Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Muller, Vanessa Danielle Menjon

Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela. Ribeirão Preto 2011.

102 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Aquino, Victor Hugo.

1. Antiviral. 2. Dengue. 3. Febre Amarela. 4. Toxinas animais.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vanessa Danielle Menjon Müller

Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino

Aprovado em: 12 de maio de 2011.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, José e Elvira.

Aos meus irmãos, Leandro e Eduardo.

À minha cunhada Pamela.

Às maiores preciosidades de minha vida, Alice e Arthur.

Aos meus amigos.

Nós chegamos até aqui juntos, esta conquista é nossa.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, por oferecerem as condições necessárias para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro, sem os quais seria impossível a realização desta pesquisa e o estabelecimento de contatos científico de extrema importância em minha carreira.

Às secretárias(os) da Pós-Graduação da FCFRP, em especial à Rozana, Henrique, Carlos e Ana. Por toda a ajuda e apoio ao longo desses anos.

À Associação dos Pós-Graduandos da USP, *campus* de Ribeirão Preto (APG/USP-RP) e a todos os seus membros, em especial à Helena, David, Eduardo, Maira, Rute, Mirna, Lorena, Willian, Jaba, Fernandas, Pedro, Regiane, Luciana com os quais muito convivi ao longo desses 3 anos de APG. Por todas as discussões, pelo crescimento que a representação discente proporciona, pela oportunidade de conhecer o sistema organizacional da Universidade, como ela é constituída e consolidada.

Aos inesquecíveis amigos, membros da comissão organizadora do III SINPOSPq, com os quais dividimos oito meses de trabalho e amizade de onde frutificaram grandes amizades.

Aos Professores Benedito Antonio Lopes da Fonseca, George Miler, Michael Capelo, Eliaj, à Yale University e a Pró-reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo, por permitirem minha participação no YALE's International Training Center for Global Infectious Diseases Research (ITC-GIDR).

À querida Jill Countryman, *in memoriam*, por toda sua paciência e zelo em minha estadia na YALE, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais. A ciência perde muito com sua ausência. À Lyn, Ruth, Lee, Carmen, Sue, pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas virologistas do Centro de Pesquisa em Virologia e também a seus "agregados", pelos ensinamentos, convivência, amizade, apoio e por nos acolher no CPV.

Aos Funcionários Soraia, Suely, Pitty, Danilo, Pavaneli, Paulo, Dona Maria, Helder, pelo permanente apoio e amizade.

Ao Professor Eurico Arruda, por todo o apoio nos momentos difíceis, pelas maravilhosas aulas e pela conversa gostosa sobre ciência.

Aos ex-alunos de IC Cynthia, Leandro, Denise, Natalia, Harryson, Carol, Wallace e Larissa.

Às queridas amigas Mariana, Tereza, Luiza, Emiliana, Paula, Andréia, Talitha, Kariane por todo apoio e companheirismo. Ao Daniel pelos empréstimos de livros e apoio.

Aos meus inesquecíveis e sempre presentes amigos Monika, Tiago, Vladi, Carlos, Mariza, Italo, Aline, Thiaguinho e Ana. Também a Graciele, Gabi, Mayte, Sofia e Rosane.

À minha querida amiga-irmã, Juliana, por todos esses sete anos de convivência e cumplicidade, por ter "aberto as portas" para minha vinda à Ribeirão.

À querida Telma, por sua presença, amizade, bom humor e carinho. Aos amigos de Laboratório: Nilton, Jassen, Adriana, Veridiana, Fernanda, Sheila.

À Lorena, Thalita e Flávia, pela amizade e carinho, eternas SINPOSPquianas. A Karina pelo companheirismo e apoio científico.

À Professora Eliane Cardiane e seu grupo de trabalho, pelo fornecimento da peçonha de escorpião e do veneno sapo. À Professora Suely Vilela e sua equipe de trabalho, em especial

à Adélia, pelo fornecimento das peçonhas de serpente e realização dos ensaios de purificação e enzimáticos.

À Liz, Alberto, Albert e Elizabeth pela amizade, ajuda, apoio, por sempre estarem ao meu lado.

Aos queridos amigos Adriano, Mirna e Rute, que alegam meus dias e não me deixam sentir sozinha. A Rute, minha companheira de virar noites acordadas escrevendo ou estudando.

À minha querida Maira Gabriela, por sua amizade, alegria, cumplicidade. Tu me faz muita falta.

Ao querido Fábio, meu grande irmão, por toda sua dedicação e comprometimento para comigo. Por me apoiar, ajudar, abraçar, pelo seu carinho, pelo seu amor que são muito importantes para mim.

Anibal, muito mais que um amigo, muito obrigada por toda a proteção e cuidado que me proporciona, pelo carinho, companheirismo, cumplicidade.

À grande amiga Clélia, por ser uma verdadeira mãe, sempre se preocupando e zelando por mim e a querida Neusa, sempre presente e disposta a ajudar a todos.

À minha grande amiga e companheira de fluxo Raquel, sem a qual esse trabalho não seria possível, muito obrigada por sua amizade, determinação, dedicação. Esse trabalho é nosso.

Victor Hugo Aquino Quintana, por confiar em mim aceitando me orientar. Muito obrigada pela sua amizade, companheirismo, pelo profissional que é, sempre buscando melhorar. Aprendi muito contigo.

Aos meus queridos avós Lauro (*in memoriam*), Cecília, Morocines e Eliza (*in memoriam*).

Pamela, minha amiga e cunhada, muito obrigada pelo carinho e amizade.

Aos meus irmãos, Leandro e Eduardo e aos meus pais, José e Elvira. Muito obrigada por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado, por nunca me abandonarem, por terem paciência comigo e entenderem minha ausência, por seu amor incondicional. Por respeitarem minha essência e ajudarem a construir meu caráter. Tudo o que sou ou busco ser, é por vocês.

Aos maiores tesouros que a vida me deu, meus sobrinhos Alice e Arthur. Muito obrigada por transformarem minha vida, alegrarem meus dias, pelos sorrisos no skype, pelas conversas no telefone, pelos gestos de carinho, por toda a felicidade que me proporcionam.

À Deus, por nunca me abandonar, por estar sempre ao meu lado, por fazer com que todas essas pessoas existam em minha vida me proporcionando tanta felicidade.

A todas as pessoas que fazem parte de minha vida.

Muito obrigada

Vanessa

A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor!

Francisco Cândido Xavier

RESUMO

MULLER, V.D.M. Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpentes e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela. 2011. 102f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A dengue é a mais importante arbovirose no mundo; aproximadamente 50 milhões de infecções ocorrem anualmente acarretando 500.000 casos de dengue hemorrágica e 22.000 mortes. A febre amarela é uma doença hemorrágica viral com elevada mortalidade que é transmitida por mosquitos. Vacinas eficazes contra a febre amarela já estão disponíveis há quase 70 anos e são responsáveis por uma redução significativa de ocorrências da doença no mundo, no entanto, cerca de 200.000 casos de febre amarela ainda ocorrem anualmente, principalmente na África. Dessa forma, o desenvolvimento de fármacos antivirais contra essas viroses é uma prioridade de saúde pública. Os produtos naturais sejam de origem vegetal ou animal, possuem uma extensa diversidade química, sendo uma fonte inesgotável de compostos com promissoras atividades biológicas. No Brasil, é grande a incidência de animais venenosos ou peçonhentos, tais como serpentes, sapos e escorpiões. Os venenos desses animais são fontes de diversas substâncias químicas que ainda não possuem a sua atividade biológica e farmacológica completamente estudada. Neste trabalho avaliamos a potencial ação antiviral de peçonhas de serpentes (*Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops pirajai*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops brasili* e *Bothrops fonseca*) e escorpião (*Tityus serrulatus*) contra os vírus da febre amarela e dengue usando diferentes estratégias metodológicas (pré-tratamento, pós-tratamento, virucida, adsorção e internalização). Primeiramente realizamos um screening com as peçonhas brutas, observando que a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* inibiu a replicação viral apresentando os maiores índices de seletividade (IS). Crotoxina, crotamina, crotapotina, convulxina, giroxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC, isoladas de *Crotalus durissus terrificus*, foram então testadas nas diferentes estratégias metodológicas contra os vírus dengue e febre amarela. Foi possível verificar que crotoxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC inibiram a replicação viral com altos índices de seletividade (IS). A ação verificada ocorreu na fase inicial do ciclo de replicação viral (pré-tratamento, virucida, adsorção). A ação antiviral verificada neste estudo foi atribuída a ação da PLA₂, visto que a crotoxina é um complexo protéico composto pela crotapotina e pela PLA₂-CB. Posteriormente avaliamos uma fosfolipase sem atividade catalítica isolada de *Bothrops jararacussu*, a BthTX-I. Essa fosfolipase apresentou baixa inibição da replicação viral, sugerindo que a atividade catalítica da fosfolipase é importante, mas possivelmente não a única responsável pela ação antiviral. Os resultados obtidos permitem sugerir também que as fosfolipases apresentam ação tanto sobre a partícula viral quanto sobre receptores celulares, o que justifica os altos índices de seletividade observados.

Palavras-chave: Antiviral, Dengue, Febre Amarela, Toxinas animais.

ABSTRACT

MULLER, V.D.M. Evaluation of antiviral activity of snake and scorpion venoms against dengue and yellow fever virus. 2011. 102f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Dengue is the most important arbovirus disease in the world; nearly 50 million infections occur annually resulting in 500,000 cases of DHF and 22,000 deaths. Yellow fever is a viral haemorrhagic fever with high mortality that is transmitted by mosquitoes. Effective vaccines against yellow fever have been available for almost 70 years and are responsible for a significant reduction of the disease worldwide. However, about 200,000 cases of yellow fever still occur annually, mainly in Africa. Thus, the development of antiviral drugs against these viruses is a public health priority. Natural products of plant or animal origin have an extensive chemical diversity, and an inexhaustible source of compounds with promising biological activities. In Brazil, there is a high incidence of poisonous or venomous animals such as snakes, frogs and scorpions occur. The venoms of these animals are a source of several chemicals that does not possess biological and pharmacological activity completely studied. In this study, we assess the potential antiviral action of snake venom (*Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops pirajai*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops brasili* and *Bothrops fonseca*) and Scorpion (*Tityus serrulatus*) against yellow fever and dengue viruses using different methodological strategies (pre-treatment, post-treatment, virucidal, adsorption and internalization). First, we performed a screening with the crude venoms, founding that the venom of *Crotalus durissus terrificus* inhibited viral replication showing the highest selectivity index (SI). Crotoxin crotamin, crotapotin, convulxin, gyroxin, PLA₂-CB and PLA₂-IC isolated from *Crotalus durissus terrificus*, were then tested in the different methodological strategies against dengue and yellow fever viruses. We found that crotoxin, PLA₂-CB and PLA₂-IC inhibited viral replication with high SI. The action of these compounds against the virus was at the first steps of the replication cycle (pre-treatment, virucidal, adsorption). The antiviral action observed in this study was attributed to the action of PLA₂, since crotoxin is a protein complex composed of crotapotin and PLA₂-CB. Afterwards, we evaluated a phospholipase without catalytic activity isolated from *Bothrops jararacussu*, the BthTX-I. This phospholipase showed low inhibition of viral replication, showing that the catalytic activity of phospholipase is important, but perhaps not the only one responsible for the antiviral action. Our results also suggest that phospholipases have action on the viral particle and on cell receptors, which explains the high levels of selectivity observed.

Keywords: Antiviral, Dengue, Yellow fever, animal toxins

RESUMEN

MULLER, V.D.M. Evaluación de la actividad antiviral de venenos de serpientes y escorpión contra los virus de la fiebre amarilla y del dengue. 2011. 102f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

El dengue es la arbovirosis más importante en el mundo, cerca de 50 millones de infecciones ocurren anualmente resultando en 500.000 casos de dengue hemorrágico y 22.000 muertes. La fiebre amarilla es una fiebre hemorrágica viral con alta mortalidad que es transmitida por mosquitos. Vacunas eficaces contra la fiebre amarilla han estado disponibles desde hace casi 70 años y son responsables por una reducción significativa de la ocurrencia de la enfermedad en todo el mundo, sin embargo, alrededor de 200.000 casos de fiebre amarilla todavía se ocurren anualmente, principalmente en África. Por lo tanto, el desarrollo de medicamentos antivirales contra estos virus es una prioridad de salud pública. Los productos naturales de origen vegetal o animal tiene una amplia diversidad química y son una fuente inagotable de compuestos con actividad biológica promisorias. En Brasil, una alta incidencia de animales ponzoñosos o venenosos como serpientes, ranas y escorpiones son observados. El veneno de estos animales son una fuente de varios productos químicos que no poseen actividad biológica y farmacológica completamente estudiada. En este trabajo, evaluamos la potencial acción antiviral del veneno de serpientes (*Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops pirajai*, *Bothrops moojen*, *Bothrops brasili* y *Bothrops Fonseca*) y escorpión (*Tityus serrulatus*) contra los virus de la fiebre amarilla y del dengue utilizando diferentes estrategias metodológicas (pretratamiento, postratamiento, virucida, adsorción y internalización). En primer lugar, se evaluaron los venenos brutos, observando que el veneno de *Crotalus durissus terrificus* inhibió la replicación viral mostrando el mayor índice de selectividad (IS). Crotoxin crotamin, crotapotina, convulxin, giroxina, PLA₂ y PLA₂-IC-CB aislados de *Crotalus durissus terrificus* fueron analizadas en las diferentes estrategias metodológicas contra el virus del dengue y la fiebre amarilla. Observamos que PLA₂-CB crotoxina y PLA₂-IC inhibió la replicación viral con alta selectividad (IS). La acción de estos compuestos contra el virus fue vista en las primeras etapas del ciclo de replicación viral (pretratamiento, la adsorción y virucida). La acción antiviral observada en este estudio se atribuyó a la acción de la PLA₂, ya que la crotoxina es un complejo de proteínas compuesto por crotapotina y PLA₂-CB. Posteriormente, se evaluó una fosfolipasa sin actividad catalítica aislada de *Bothrops*, la BthTX-I. Esta fosfolipasa mostró una inhibición de la replicación viral baja, sugiriendo que la actividad catalítica de la fosfolipasa es importante, pero quizás no se la única responsable por la acción antiviral. Nuestros resultados también sugieren que las fosfolipasas presentan acción sobre la partícula viral y sobre los receptores celulares, lo que explica los altos niveles de IS observados.

Palabras clave: antivirales, dengue, fiebre amarilla, toxinas animales

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sugestão de classificação de casos e níveis de severidade.....	6
Figura 2: Microscopia eletrônica da partícula viral imatura de DENV.....	11
Figura 3: Organização estrutural do DENV	12
Figura 4: Ciclo de replicação viral	13
Figura 5: Organização estrutural do DENV	17
Figura 6: Organização do Genoma e função das proteínas virais	19
Figura 7: Avaliação da potencial ação antiviral das peçonhas brutas na estratégia de pré-tratamento	49
Figura 8: Cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex da peçonha bruta de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	53
Figura 9: Cromatografia em DEAE Sephadex da Crotoxina.	54
Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	54
Figura 11: Atividade fosfolipásica da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações sobre os venenos brutos, frações e toxinas utilizadas.	30
Tabela 2: Títulos dos estoques de DENV e YFV.....	37
Tabela 3: Concentração citotóxica a 50% da monocamada celular (CC ₅₀) dos materiais teste frente a células VERO E6.	46
Tabela 4: CE ₅₀ e IS dos materiais teste contra YFV e DENV-2 no pré-tratamento de células VERO E6.	48
Tabela 5: Percentagem de inibição da infecção viral das células VERO E6 induzida pelas peçonhas brutas.....	50
Tabela 6: Avaliação da atividade virucida dos materiais teste contra YFV e DENV-2 em células VERO E6.	51
Tabela 7: CE ₅₀ e IS dos materiais teste contra YFV e DENV-2 no pré-tratamento de células VERO E6.	57
Tabela 8: CE ₅₀ e IS dos materiais teste contra o vírus da febre amarela no pós-tratamento de células VERO E6.	58
Tabela 9: Avaliação da atividade virucida das toxinas isoladas contra o YFV e DENV-2 em células VERO E6.	58
Tabela 10: CE ₅₀ e IS dos materiais teste na adsorção do YFV e DENV-2 em células VERO E6.	60
Tabela 11: CE ₅₀ e IS dos materiais teste na internalização de YFV e DENV-2 em células VERO E6.	61
Tabela 12: CE ₅₀ e IS da crotoxina, PLA ₂ -CB e BthTx-1 contra DENV-1, DENV-2, DENV-4 e YFV no pré-tratamento de células VERO E6.	62
Tabela 13: CE ₅₀ e IS da crotoxina, PLA ₂ CB e BthTX-I contra DENV-1, DENV-2, DENV-4 e YFV no pós-tratamento de células VERO E6.....	63
Tabela 14: CE ₅₀ e IS da crotoxina, PLA ₂ CB e BthTx-I contra DENV-1, DENV-2, DENV-4 e YFV no tratamento virucida em células VERO E6.	64
Tabela 15: CE ₅₀ e IS de BthTX-I contra os vírus YFV e DENV-2 na adsorção dos e na internalização dos vírus à células VERO E6.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácido
ADE	do inglês <i>antibody dependent enhancement</i>
Asp	Aspartato
BthTX-I	Miotoxina I (Lys49) isolada da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i>
C	Proteína de capsídeo
cap	do inglês <i>catabolite gene activator protein</i>
CB	Crotoxina B isolada da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
CC ₅₀	Concentração citotóxica a 50% da monocamada celular
cDNA	DNA complementar
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
CE ₅₀	Concentração efetiva que protege 50% da monocamada celular
CK	Enzima creatina cinase
CLR	Receptores lectina tipo-C
CMC	Carboximetilcelulose
Cs	Sequência de ciclicização
C-terminal	Extermidade carboxi-terminal
DC	Células dendríticas
DCM	Dose coagulante mínima
DC-SIGN	do inglês <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DENV	Vírus da dengue
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DP	Desvio padrão
E	Proteína do envelope viral
EDTA	Ácido etilenodiamina tetraácetico
FD	Febre clássica da dengue
FDH	Dengue hemorrágica febril
GDD	Motif Gly-Asp-Asp
Gly	Glicina
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC	Intercro isolada da peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
idoxuridina	5-iodo-20-deoxyuridine
IgG	Imunoglobulina G

IS	Índice de seletividade
JEV	Vírus da encefalite japonesa
L-15	Meio de cultura Leibovitz L-15
LAAO	L-aminoácido oxidase
Lys	Lisina
M	Proteína da membrana viral
MIAF	Mistura de fluido ascítico imune de camundongo
MR	Receptor de manose
MTT	3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MVEV	Vírus da encefalite de Murray Valley
ND	Não determinado
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2A	Proteína não-estrutural 2A
NS2B	Proteína não-estrutural 2B
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4A	Proteína não-estrutural 4A
NS4B	Proteína não-estrutural 4B
NS5	Proteína não-estrutural 5
N-terminal	Extremidade amino-terminal
NTPase	Nucleotidotri-fosfatase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	do inglês <i>open reading frame</i>
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
polyA	Poliadenilada
preM	Proteína precursora da proteína M
PSA	Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina B
RdRp	RNA-dependente de RNA polimerase
RE	Retículo endoplasmático
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
RNC3'	Região não codificadora da extremidade 3'
RNC5'	Região não codificadora da extremidade 5'
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SA	Sem atividade
SCD	Síndrome do choque da dengue
SFB	Soro fetal bovino
SL	do inglês <i>stem loop</i>
SLEV	Vírus Saint Louis
sn-2	Substituição nucleofílica bimolecular ou de 2ª ordem

ssRNA-	RNA de fita simples polaridade negativa
ssRNA+	RNA de fita simples polaridade positiva
Tris-HCL	Tris hidrocloreto
TsTX-1	Tityustoxina-I isolada da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>
TsTX-6	Tityustoxina-VI isolada da peçonha de <i>Tityus serrulatus</i>
UAR	Upstream região AUG

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	DENGUE	4
1.1.1	A situação da dengue no Brasil	6
1.1.2	PREVENÇÃO.....	7
1.2	FEBRE AMARELA	8
1.2.1	A situação da febre amarela no Brasil	9
1.2.2	Prevenção da febre amarela.....	10
1.3	CARACTERÍSTICAS DA PARTÍCULA VIRAL DOS FLAVIVIRUS	11
1.4	CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL	12
1.5	CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E NÃO ESTRUTURAIS E SEU ESTUDO COMO POSSÍVEIS ALVOS ANTIVIRAIS.....	15
1.5.1	Proteínas estruturais	16
1.5.2	Proteínas não-estruturais	18
1.6	PROTEÍNAS DA SUPERFÍCIE DO HOSPEDEIRO COMO POSSÍVEIS ALVOS PARA FÁRMACOS ANTIVIRAIS	20
1.7	A NECESSIDADE DA BUSCA DE FÁRMACOS CONTRA OS FLAVIVIRUS	20
1.8	VENENOS E PEÇONHAS ANIMAIS NA BUSCA POR FÁRMACOS ANTIVIRAIS	22
2	OBJETIVOS:	27
2.1	GERAL.....	27
2.2	ESPECÍFICOS	27
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	VENENOS BRUTOS, FRAÇÕES E TOXINAS ISOLADAS DE SERPENTES, ESCORPIÃO E SAPO.....	29
3.1.1	Diluição dos materiais teste	31
3.1.2	Determinação da quantidade de proteínas.....	31
3.1.3	Veneno e toxinas isoladas da serpente <i>Crotalus durissus terrificus</i>	31
3.1.4	Caracterização da atividade enzimática das toxinas isoladas de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	31
3.2	CULTURAS CELULARES	32
3.2.1	Células	32
3.2.2	Meio de cultura e reagentes.....	32
3.3	VÍRUS	33
3.3.1	Cepas virais.....	33

3.3.2	Preparo dos estoques virais.....	33
3.3.3	Confirmação da infecção viral pela técnica de Imunofluorescência	344
3.3.4	Confirmação da Infecção viral pelo método de RT-PCR	34
3.3.5	Determinação dos títulos virais pelo método das placas de lise	35
3.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	37
3.5	AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL.....	38
3.5.1	Tratamento das células VERO E6 com as amostras teste e posterior infecção com DENV ou YFV (PRÉ-TRATAMENTO):.....	39
3.5.2	Tratamento das células VERO E6 com os materiais teste após a infecção com DENV ou YFV (PÓS-TRATAMENTO):	40
3.5.3	Avaliação da atividade virucida.....	40
3.5.4	Avaliação do efeito dos materiais-teste na adsorção viral.....	41
3.5.5	Avaliação do efeito dos materiais-teste na internalização viral	42
3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	43
4	RESULTADOS.....	46
4.1	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS TESTES	46
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS MATERIAS TESTES	47
4.2.1	Peçonhas brutas	47
4.2.2	Toxinas isoladas de <i>Crotallus durissus terrificus</i>	52
4.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PEÇONHA BRUTA E TOXINAS ISOLADAS DE <i>Crotallus durissus terrificus</i> NAS FASES INICIAIS DO CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL	59
4.3.1	Adsorção	59
4.3.2	Internalização	60
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA FOSFOLIPASE NA AÇÃO ANTIVIRAL	61
4.4.1	Pré-tratamento.....	62
4.4.2	Pós-tratamento	63
4.4.3	Virucida.....	63
4.4.4	Adsorção e internalização	64
4.5	TOXINAS ISOLADAS DE <i>B. jararacussu</i>, <i>B. jararaca</i>, <i>Tytius serrulatus</i> e fração de baixo peso de <i>Buffo schneideri</i>	65
5	DISCUSSÃO.....	68
6	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	79

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Flavivirus* é composto por 53 espécies virais, desses, 27 são transmitidos por mosquitos, 12 por carrapatos e 14 por outros agentes zoonóticos com vetores ainda não conhecidos (GUBLER; KUNO; MARKOFF, 2007). Os flavivirus transmitidos por mosquitos estão divididos em dois grandes grupos: (i) Sorogrupo da encefalite Japonesa, que compreende os vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus West Nile (WNV), vírus da encefalite de Murray Valley (MVEV), e vírus St. Louis (SLEV); (ii) o outro grupo inclui o vírus da febre amarela (YFV) e os vírus dengue (DENV), ambos são viscerotrópicos e podem causar a febre hemorrágica. Esses vírus apresentam um ciclo silvestre com primatas como hospedeiro vertebrado e o mosquito *Aedes* como principal vetor. Atualmente, o DENV está completamente adaptado ao ambiente urbano, não necessitando mais do ambiente silvestre para se manter (GUBLER, 2002).

A dengue e a febre amarela são duas doenças de grande importância em saúde pública no Brasil e em outros países tropicais e subtropicais. A dengue é a mais prevalente doença viral transmitida por artrópodes em humanos (DAMONTE; PUJOL; COTO, 2004) e a febre amarela merece especial destaque, pois afeta regiões Africanas e tropicais da América do Sul (BARRETT, MONATH, 2003). Essas duas viroses são consideradas doenças reemergentes, devido ao aumento da incidência da doença nos últimos 20 anos (MACKENZIE; GUBLER; PETERSEN, 2004). As condições sócioambientais favoráveis à expansão do *Aedes aegypti* possibilitaram a dispersão deste vetor e o avanço dessas doenças. Vários fatores se somam produzindo condições favoráveis à transmissão dos vírus da dengue e da febre amarela: o rápido crescimento populacional, migração rural-urbana, infraestrutura urbana básica inadequada e aumento do volume de resíduos sólidos, tais como embalagens plásticas descartadas e outros objetos abandonados que fornecem habitats para as larvas do vetor em áreas urbanas. Vários programas para o controle do vetor foram implantados pelas autoridades de saúde, mas até agora nenhum foi realmente efetivo (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2009a).

Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivam nos mais de 100 países endêmicos e em áreas onde há transmissão do vírus da dengue. Mais de 50 milhões de infecções ocorrem anualmente acarretando 500.000 casos de dengue hemorrágica e 22.000 mortes, principalmente entre crianças. O atual método de controle da doença tem se baseado no combate ao vetor. O único tratamento disponível para essa doença é a terapia de suporte (WHO, 2009a).

A infecção pelo vírus da febre amarela pode ser evitada por campanhas de vacinação em massa, no entanto, há uma estimativa de que mesmo existindo a vacina, ocorram 200.000 casos de febre amarela a cada ano, dentre as quais, 30.000 evoluem ao óbito. Não existe cura para a febre amarela. O tratamento é sintomático, visando a redução dos sintomas para o conforto do paciente (WHO, 2010 a). Até a década de 90, apenas cinco fármacos antivirais tinham sido licenciados para o tratamento de infecções virais. Desde então, os avanços na virologia, particularmente pela necessidade de combate ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), resultaram na descoberta e validação de vários fármacos para intervenção terapêutica nas infecções virais (DE CLERCQ, 2002).

Nossa fauna e flora possuem muitas espécies que são fontes de substâncias com potentes efeitos sobre os diferentes sistemas biológicos. Os produtos naturais sejam de origem vegetal ou animal, possuem uma extensa diversidade química, sendo uma fonte inesgotável de compostos com promissoras atividades biológicas, não apenas pelo grande número de espécies com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade estrutural dos seus metabólitos (CHE, 1991; HOUGHTON, 1996; HUDSON, 1990; NIELSEN, 2002). Toxinas animais têm contribuído significativamente para o desenvolvimento das Ciências Biológicas e Biomédicas. Essas toxinas, utilizadas como elementos importantes na investigação de mecanismos celulares e moleculares, estão envolvidas em processos imunológicos, farmacológicos e de intoxicação. Além disso, essas toxinas constituem modelos moleculares interessantes para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas aplicáveis na geração de agentes terapêuticos e/ou de ferramentas experimentais para a pesquisa básica e aplicada. Em nosso país, é grande a incidência de animais peçonhentos, em especial grande proporção de animais como escorpiões, serpentes e sapos. Os venenos desses animais são

fontes de diversos componentes químicos os quais apresentam poucos estudos relacionados a suas atividades microbiológicas (VARANDA; GIANNINNI, 1994).

1.1 DENGUE

A febre da dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa causada pelo vírus da dengue (DENV) e reconhecida como entidade clínica desde 1779 (SILER; HALL; KITCHENS, 1926). O DENV é transmitido ao homem pela picada de mosquitos hematófagos, principalmente do gênero *Aedes*. Outros mosquitos do gênero *Aedes* como *Aedes albopictus* e *Aedes africanus* tem sido relacionados como transmissores secundários da dengue na Ásia e na África, respectivamente. Nas Américas, o DENV persiste na natureza através do ciclo homem → *Aedes aegypti* → homem, em que a fêmea do mosquito ao se alimentar do sangue de um indivíduo virêmico se torna apta a transmitir a doença após um período de incubação (extrínseca) de 8 a 10 dias, em que o vírus replica no trato digestivo do mosquito e extravasa do epitélio intestinal sendo carregado pela hemolinfa atingindo as glândulas salivares infectando-as. Desse modo, o mosquito tem a capacidade de transmitir o vírus a outros indivíduos ao introduzir substâncias anticoagulantes durante o ato da picada; e uma vez infectado, o mosquito assim permanece durante toda a sua vida. Um homem ao ser infectado passa por um período de incubação (intrínseca) que varia de 3 a 15 dias, após o qual se iniciam os primeiros sintomas que podem perdurar de 2 a 8 dias. Apesar do ciclo normal envolver apenas o homem e o mosquito, foi descrito, na Ásia e na África, um ciclo selvagem envolvendo primatas não humanos como reservatórios da doença. (BRASIL, 2008a; DAMONTE; PUJOL; COTO, 2004; FIGUEIREDO, 2006; GUBLER, 1998; WEAVER; REISEN, 2010).

A dengue pode apresenta-se em três formas clínicas principais; doença febril indiferenciada, febre clássica da dengue (FD) e dengue hemorrágica com ou sem choque (DHF/DSS) (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO), 1994). A FD apresenta-se como uma enfermidade aguda febril autolimitada que perdura por aproximadamente 4 a 5 dias. Os sintomas se iniciam 2 a 8 dias após a picada (período de incubação intrínseco), quando surgem febre alta que dura de 2 a 7 dias,

calafrios, dor retro-orbitária, cefaléia de grau variável, erupção maculopapular, astenia importante de onde deriva o nome dengue (RIGAU-PÉREZ, 1998), além de dor musculoesquelética e abdominal intensas, fato que levou a doença a ser inicialmente conhecida como “febre quebra-ossos”. A contagem total de leucócitos está diminuída, pode ocorrer trombocitopenia e fenômenos hemorrágicos leves. A dengue clássica é usualmente autolimitada, porém a convalescença é prolongada com persistência das queixas de fadiga e prostração. No momento de defervescência, alguns pacientes desenvolvem a FHD/SCD cuja principal característica é a permeabilidade capilar aumentada com consequente extravasamento de plasma para o interstício. Este extravasamento pode resultar numa diminuição do volume plasmático que compromete o sistema circulatório levando ao choque hipovolêmico e morte. Pacientes com FHD/SCD não apresentam sangramentos de grande importância devido a distúrbios de coagulação. Quando este tipo de hemorragia ocorre, ela está associada com o choque profundo, pois a combinação de trombocitopenia, hipóxia e acidose levam à falência múltipla de órgãos e à coagulação intravascular disseminada (WILLS et al., 2002).

Mudanças na epidemiologia da dengue, levaram a dificuldades na classificação em FD/FHD/SCD. Tornou-se difícil a aplicação dos critérios de FHD na situação clínica, juntamente com o aumento de casos de dengue grave, que clinicamente não cumpriam os rigorosos critérios de FHD, por este motivo, esta classificação teve de ser reconsiderada. Embora atualmente a classificação em FD/FHD/SCD continue sendo amplamente utilizada, a OMS apoiou um estudo multicêntrico prospectivo em todas as regiões endêmicas de dengue, o qual foi criado para coletar evidências sobre os critérios para a classificação de dengue em níveis de gravidade. Os resultados do estudo confirmam que, usando um conjunto de clínicas e/ou parâmetros laboratoriais, vê-se uma diferença clara entre os pacientes com dengue grave e as pessoas com dengue não grave. No entanto, por motivos práticos, seria desejável dividir o grande grupo de pacientes com dengue não grave em dois subgrupos - os pacientes com sinais clínicos e sem sinais (WHO, 2009a). Uma sugestão da nova classificação é demonstrada na Figura 1.

Figura 1: Sugestão de classificação de casos e níveis de severidade. Modificado de: Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition, 2009.

Com base em testes sorológicos, 4 sorotipos antigenicamente distintos são conhecidos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GUBLER, 2002). No homem, a infecção por DENV, independente do sorotipo, produz imunidade permanente contra re-infecção pelo mesmo sorotipo causador da primeira infecção, mas não contra outros sorotipos. Estudos epidemiológicos têm identificado a infecção secundária (infecção por um segundo sorotipo) e a presença de anticorpos pré-existentes contra DENV como fatores de risco para desenvolvimento de DHF/DSS (BURKE et al., 1988; SANGKAWIBHA et al., 1984). Entretanto, apesar do grande número de infecções secundárias em áreas endêmicas, uma pequena percentagem de casos evolui para DHF/DSS. Acredita-se que fatores ambientais, virais e do hospedeiro contribuem para o desenvolvimento da DHF/DSS (HALSTEAD, 1988; LOKE et al., 2001; MATHEW et al., 1998; MONATH, 1994; SPAULDING et al., 1999).

1.1.1 A situação da dengue no Brasil

Segundo a revisão realizada por Claro, Tomassini e Rosa (2004), o primeiro registro de casos de dengue ocorreu na década de 1920. Entretanto, durante os 63 anos seguintes, não foram relatados casos no país e o *Aedes aegypti* foi erradicado do Brasil e de mais 17 países das Américas nas décadas de 1950 e 1960. A reinfestação do país pelo vetor ocasionou epidemias de DENV-1 em Boa Vista, Roraima, em 1981/1982 e, em março de 1986, outra epidemia começou numa cidade vizinha ao Rio de Janeiro. No mesmo ano, o vírus chegou à cidade do Rio de Janeiro e foi o começo de uma epidemia explosiva. Em 1990/1991, começou a primeira epidemia de DENV-2 na cidade do Rio de Janeiro, na qual foram notificados 17.000 casos sendo 1.952 de dengue hemorrágica, com 24 mortes.

Epidemias de DENV-2 têm sido notificadas em praticamente todas as regiões do Brasil, com circulação simultânea dos sorotipos 1 e 2.

DENV-3 foi isolado pela primeira vez em 1999 de um paciente que retornou de uma viagem a Nicarágua, e em janeiro de 2001 ocorreu o primeiro surto no Rio de Janeiro. DENV-3 rapidamente se espalhou pelas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil sendo o sorotipo mais isolado nas últimas epidemias (BRASIL, 2002). E causou entre janeiro e fevereiro de 2002 da maior e mais grave epidemia de dengue registrada no município do Rio de Janeiro. A alta susceptibilidade da população a este novo sorotipo, infecções prévias pelo sorotipo 1 ou 2 e a virulência da cepa podem justificar a dimensão desta epidemia e sua gravidade (MIAGOSTOVICH et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2001; ROCCO; KAVAKAMA; SANTOS, 2001).

Em 23 de agosto de 2010, o Ministério da Saúde divulgou o isolamento do sorotipo DENV-4 em Roraima. Sendo confirmados três casos autóctones em Boa Vista e nove casos permanecem como suspeitos, sendo oito autóctones de Boa Vista e um do município de Cantá (BRASIL, 2010a). E segundo balanço divulgado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010b), até a 26ª semana de 2010 foram notificados 942.153 casos de dengue. O que corresponde a um aumento de 78,02% nos casos em comparação a todo o período de 2009, em que foram notificados 529.237 casos. No final de 2010, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2010c) divulgou um mapeamento das áreas de risco de epidemia de dengue para 2011, ficando fora da área de perigo apenas os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Vários programas para o controle do vetor foram implantados pelas autoridades de saúde, como o Brasil Unido contra a dengue, mas até agora nenhum foi realmente efetivo.

1.1.2 Prevenção

O principal método de combate contra a dengue é o controle da população de vetores, que deve ser mantido durante os períodos de baixa transmissão e reforçado nas épocas de pico. Isso ocorre, pois não existe nenhum agente terapêutico específico para o vírus da dengue, o tratamento é apenas sintomático. Os esforços para o desenvolvimento de uma vacina para a dengue formam um

desafio há décadas. A questão principal é a inabilidade das vacinas de proteger simultaneamente a todos os quatro sorotipos existentes. Já que, um modelo ideal de vacina tem que fornecer imunidade de longa duração contra os quatro sorotipos virais, levando em consideração aspectos relacionados ao mecanismo de replicação mediada por anticorpo (ADE) que se acredita ser um dos fatores que favorecem o aparecimento dos casos mais graves (DHF/DSS). Embora muitas das vacinas até agora desenvolvidas (vivo atenuado, quimérico, de DNA, e subunidades de vacinas) tenham mostrado resultados promissores, nenhuma é suficientemente imunogênica para o uso na rotina (BLAIR et al., 2006; DONG, ZHANG, SHI, 2008; MORRISON et al., 2010; PERERA, KHALIQ, KUHN, 2008; RAVIPRAKASH et al., 2003).

1.2 FEBRE AMARELA

O vírus da febre amarela é o protótipo do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae* e é utilizado como modelo para elucidar fatores relacionados à replicação, estrutura genômica e outras características de vírus do mesmo gênero (GUBLER, KUNO, MARKOFF, 2007). Estudos genéticos do YFV revelam variações genéticas entre as cepas virais associadas a diferentes regiões geográficas. Ao todo foram identificados sete genótipos baseados em uma variação nucleotídica maior ou igual a 9%, dos quais cinco estão presentes na África e dois na América do sul (BARRETT; HIGGS, 2007). Existem dois ciclos de transmissão: o silvestre e o urbano. Nas Américas, a forma silvestre é transmitida, principalmente, entre primatas não humanos (macacos) e por mosquitos fêmeas dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* infectados; o homem não imunizado se infecta acidentalmente quando penetra nesse ecossistema. Já a forma urbana é mantida por meio da transmissão homem → mosquito → homem e tem como vetor e reservatório principal o mosquito *Aedes aegypti*. No mosquito *Aedes aegypti*, o período de incubação é de 9 a 12 dias, após o qual se mantém infectado por toda a vida; já no homem o período de incubação varia de três a seis dias e o de transmissibilidade é igual ao tempo que corresponde ao período de viremia, sendo 24 a 48 horas antes do aparecimento dos sintomas até três a cinco dias após (BRASIL, 2008a; PACCA et al., 2009; WEAVER; REISEN, 2010). A apresentação

da doença varia de infecções subclínicas a infecções sistêmicas graves, que incluem febre, icterícia, fenômenos hemorrágicos e falência renal (BARNETT, 2007). Estima-se que, aproximadamente, 90% dos casos de febre amarela se apresentem na forma leve e moderada e que somente 10% sejam das formas graves associadas à alta letalidade (VASCONCELOS, 2003). Existem três fases bem caracterizadas da doença. A fase inicial é denominada de fase de infecção e é caracterizada pela presença de febre, náuseas, vômitos, tonturas e dores no corpo. Nesta fase é possível isolar o vírus do sangue do paciente ou detectá-lo através de exames envolvendo técnicas moleculares de detecção viral. Outros achados laboratoriais consistem em leucopenia durante o início dos sintomas e a elevação dos níveis de transaminase no soro durante o 2^o e o 3^o dia da doença. A segunda fase, também chamada de fase de remissão, caracteriza-se por uma melhora das manifestações clínicas, incluindo a febre, e pode durar até 48 horas. A estimativa é que, aproximadamente 85%-90% dos pacientes se recuperem nessa fase sem desenvolverem icterícia. A terceira fase, também conhecida como fase de intoxicação, caracteriza-se pelo retorno dos sintomas característicos da primeira fase, mas com o desenvolvimento de icterícia, oligúria e diátese hemorrágica, esta caracterizada, principalmente, por hematêmese (vômitos negros), além da ocorrência de bradicardia acompanhando a febre elevada, evento denominado sinal de Faget (BARNETT, 2007; VASCONCELOS, 2003). O acometimento de múltiplos órgãos é comumente descrito no desenvolvimento desta fase da doença e os níveis de transaminase no soro estão diretamente relacionados à gravidade da infecção. A gravidade da doença também está associada à idade dos pacientes, sendo que os casos mais severos são geralmente observados em idosos e crianças (BARNETT, 2007).

1.2.1 A situação da febre amarela no Brasil

No Brasil, a febre amarela apareceu pela primeira vez em Pernambuco, no ano de 1685, onde permaneceu durante 10 anos. A cidade de Salvador também foi atingida, onde causou cerca de 900 mortes durante os seis anos em que ali esteve. A realização de grandes campanhas de prevenção possibilitou o controle das

epidemias, mantendo um período de silêncio epidemiológico por cerca de 150 anos no País. A última ocorrência de febre amarela urbana no Brasil foi em 1942, no Acre. Hoje, ainda se teme a presença da febre amarela em áreas urbanas, especialmente depois do final da década de 70, quando o mosquito *Aedes aegypti* retornou ao Brasil (BRASIL, 2008b; PACCA et al., 2009).

O ciclo silvestre só foi identificado em 1932 e desde então surtos localizados acontecem em estados do Centro-oeste, Norte e Nordeste do país. No período de 1980 a 2004, houve 662 casos humanos de febre amarela, sendo que 339 desses chegaram a óbito. Os casos silvestres da doença têm sido notificados principalmente na Amazônia e no Pantanal, com ocorrência de 71 casos de 2003 a 2006. Sendo que a taxa letalidade desses casos no período 2003-2004 foi de 60% e de 100% nos anos seguintes (BRASIL, 2008b; PACCA et al., 2009).

Além disso, as epidemias estão se dirigindo de seu epicentro original, central-norte do país, para estados mais populosos do sudeste. Em 2000, 2 casos humanos autóctones foram reportados no estado de São Paulo, os primeiros após 50 anos. Os últimos dados divulgados pelo Ministério da Saúde apontam que no período de setembro de 2008 a setembro de 2009, foram notificados 274 casos humanos suspeitos de febre amarela silvestre no Brasil, com 51 casos (18,6%) confirmados; e destes, 21 evoluíram para o óbito (BRASIL, 2009; PACCA et al., 2009).

1.2.2 Prevenção da febre amarela

Por não existir tratamento ou cura para a febre amarela, é de grande interesse o desenvolvimento de estratégias que controlem a doença (VOLK et al., 2009). A vacinação é a mais importante medida de controle. A vacina (cepa 17D atenuada) é administrada em dose única e confere proteção próxima a 100% com reforço a cada 10 anos. Outro método de prevenção da doença é controle do vetor, o *Aedes aegypti*, para eliminação do risco de reurbanização da doença (BRASIL, 2008b).

No caso da febre amarela, mesmo existindo uma vacina contra a doença, o estudo de fármacos antivirais é muito importante. Isso, pois nem toda a população foi imunizada; indivíduos com imunodepressão transitória ou permanente não

podem ser vacinados devido ao elevado risco de desenvolver complicações após o uso da vacina, bem como a vacina nessas pessoas pode não impedir que se instale a doença; e indivíduos que possuam hipersensibilidade a proteínas do ovo, eritromicina e gelatina não podem ser imunizados, visto que os vírus vivos atenuados da vacina são cultivados em ovos embrionados de galinha e a composição final da vacina produzida na Fundação Oswaldo Cruz - Bio-Manguinhos inclui vírus vivos atenuados da subcepa 17DD, sacarose, glutamato, sorbitol, gelatina bovina, eritromicina e kanamicina (BRASIL, 2008b).

1.3 CARACTERÍSTICAS DA PARTÍCULA VIRAL DOS FLAVIVIRUS

Os DENVs e YFV pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* (WESTAWAY et al., 1985). As partículas virais são esféricas, com 50 a 55 nm de diâmetro, constituídas por um nucleocapsídeo envolto por uma membrana bilipídica que constitui o envelope viral, no qual estão ancoradas as glicoproteínas de superfície (WESTAWAY et al., 1985) (Figura 2).

a)

b)

Figura 2: Microscopia eletrônica da partícula viral imatura de DENV modificadas de Yu et al. (2008) a) imagem da partícula viral imatura em diferentes pHs. b) Crio microscopia eletrônica da partícula viral imatura.

O genoma consiste de uma fita simples de RNA de polaridade positiva de aproximadamente 11 kilobases. Este RNA possui a estrutura cap ($m^7G5'ppp5' A$) no extremo 5', mas não contém cauda de polyA no extremo 3'. O RNA viral possui uma única fase de leitura (*open reading frame*, ORF), a qual codifica uma grande poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares e virais em 3 proteínas estruturais (C-preM-E) e 7 proteínas não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (Figura 3) (LINDENBACH, RICE, 2001; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Nas extremidades 5' e 3', flanqueando a ORF, existem regiões não codificadoras (RNC5', RNC3') com aproximadamente 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente (Figura 3). Estas regiões possuem seqüências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de replicação, tradução e empacotamento viral (LINDENBACH, THIEL, RICE, 2007).

Figura 3: Organização estrutural do DENV modificada de Fernandez-Garcia, et al., (2009). Uma única fase de leitura (ORF) codifica uma poliproteína precursora que é posteriormente clivada em 3 proteínas estruturais (em verde) e sete proteínas não estruturais (em vermelho). Aa: aminoácido, C: proteína de capsídeo, Cs: seqüência de ciclização, E: envelope, M: membrana, RdRp: RNA-dependente de RNA polimerase, UAR: upstream região AUG, VR: região variável, SL: stem loop.

1.4 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

A replicação viral ocorre dentro do citoplasma de células susceptíveis ao vírus (Figura 4). O ciclo de replicação inicia-se com a adsorção da partícula viral à célula-alvo através da ligação da proteína E ao receptor celular. Interações entre a proteína E e a molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas (DC-SIGN) são essenciais para a infecção destas células e para internalização eficiente da partícula viral por endocitose mediada por clatrina (LOZACH et al.,

2005). Após a endocitose, os endossomos que contêm as partículas virais fundem-se com os lisossomos, levando a uma diminuição do pH intra-endossômico, que potencializa mudanças conformacionais na proteína E, resultando em uma fusão do envelope viral com a membrana das vesículas endossomais e consequentemente, a desmontagem da partícula viral e liberação do genoma no citoplasma (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; LINDENBACH; RICE, 2003; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008).

Figura 4: Ciclo de replicação viral de Fernandez-Garcia, et al (2009). Os Flavivirus são internalizados por endocitose mediada por receptor. (1) e direcionadas para endossomo precoce, onde o meio ácido induz a fusão (2) entre o vírus e a membrana do hospedeiro, resultando na liberação do genoma viral. (3) A tradução do do RNA viral é seguida pelo processamento da poliproteína resultante do hospedeiro e proteínas do vírus codificado. (4) Os locais de clivagem das proteínas estruturais (em verde) e não estruturais (NS) (em vermelho), na membrana do retículo endoplasmático (RE) são ilustradas esquematicamente. Após a tradução, um complexo de replicação é montado e associada a membranas vírus-induzidas onde ocorre a replicação viral. (5) O complexo de replicação inicia a transcrição do RNA (+) em RNA(-), o qual serve como modelo para a nova síntese de RNA (+) Progênie de fita RNA (+) podem iniciar um novo ciclo de uma tradução, ou serem montados dentro do virion. (6) O empacotamento ocorre na superfície do RE, seguido pela germinação das proteínas estruturais e recém-sintetizadas de RNA para o lúmen do RE. Os *virions* resultantes e imaturos são transportados para o trans-Golgi, onde a clivagem da prM mediada pela furina gera partículas infecciosas madura (7) que são liberadas por exocitose (8).

O RNA liberado no citoplasma codifica um precursor da poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos. Esse polipeptídeo traduzido pelo hospedeiro sofre processamento co e pós-transducional originando as três proteínas virais estruturais (C, prM e E) e as sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) através da clivagem realizada pelas proteases virais e do hospedeiro. As proteínas prM, E e NS1 são direcionadas para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER), em cuja membrana permanecem ancoradas, enquanto que a proteína C e as outras proteínas não estruturais são liberadas no citoplasma da célula (LINDENBACH; RICE, 2003).

A replicase viral é montada a partir das proteínas NS3 e NS5 atuando sobre o RNA viral, provavelmente auxiliadas por alguns fatores do hospedeiro. A replicação começa com a síntese da fita negativa do RNA (ssRNA-), a qual serve para a formação de uma fita dupla de RNA, a partir da qual são sintetizadas várias cópias de fitas positivas de RNA (ssRNA+). A montagem do *virion* acontece em associação com membranas do retículo endoplasmático. A proteína C junto com o RNA formam o nucleocapsídeo que se liga à porção citoplasmática das glicoproteínas virais ancoradas na membrana bilipídica do retículo endoplasmático contendo heterodímeros das proteínas prM e E, resultando na montagem das partículas virais por brotamento para dentro do *lúmen* do retículo endoplasmático. Nesta fase as partículas virais formadas são imaturas e não infecciosas. Esses vírus imaturos são transportados pela via secretora celular até o Complexo de Golgi; onde no ambiente de baixo pH da face trans do Complexo de Golgi ocorre a clivagem de prM em M (proteína de membrana) por furinas levando a maturação da partícula viral. O peptídeo “pr” (86 aminoácidos) é secretado no meio extracelular. A maturação é acompanhada de rearranjo no envelope viral. Posteriormente, as partículas virais são liberadas para o meio extracelular pela via exocítica. Devido a diferenças no meio intracelular e pela natureza não-lítica do ciclo dos *Flavivirus*, a entrada, a replicação e o envelopamento desses vírus pode diferir nas células de mosquitos em comparação a células de vertebrados (DAMONTE; PUJOL; COTO, 2004; FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; LINDENBACH; RICE, 2001, 2003; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008).

Poucos receptores que medeiam a interação dos flavivirus com a célula hospedeira têm sido descritos, porém várias moléculas de superfície já foram propostas para a interação vírus-célula. Pouco se sabe sobre os receptores celulares para DENVs e YFV. Recentemente foi mostrado que DC-SIGN (lectina específica de manose), amplamente distribuídas na superfície de células dendríticas (DC) interage com os açúcares da proteína E. Esta interação seria o primeiro contato vírus-célula, a qual facilitaria a ligação da proteína E com o receptor celular ainda desconhecido (BARBA-SPAETH et al., 2005, LINDENBACH, THIEL, RICE 2007, LOZACH et al., 2005, MUKHOPADHYAY, KUHN, ROSSMANN, 2005). Sabe-se também que resíduos da proteína E carregados positivamente poderiam interagir com o heparansulfato, que estão amplamente distribuídos em muitas linhagens celulares e conseqüentemente facilitaria a infecção da célula (CHEN et al., 1997; KROSCHEWSKI et al., 2003).

Nos últimos anos, o conhecimento do ciclo de replicação do vírus nas células hospedeiras e as características estruturais e funcionais das proteínas virais, têm impulsionado o estudo de diversos alvos para a ação de antivirais, seja através do desenho racional de inibidores ou mediante ensaios empíricos de *screening* de compostos sintetizados ou produtos naturais isolados. Dessa forma, atualmente são avaliados inibidores que podem agir na entrada do vírus na célula, na replicação do RNA viral, na protease viral e na maturação das partículas virais. Por este motivo, é extremamente importante o entendimento do ciclo de replicação viral (DAMONTE, 2006).

1.5 CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E NÃO ESTRUTURAIS E SEU ESTUDO COMO POSSÍVEIS ALVOS ANTIVIRAIS

Para a identificação de pequenas moléculas que inibam passos específicos do ciclo de replicação viral, é necessário detalhada caracterização bioquímica e estrutural das proteínas virais (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009).

1.5.1 Proteínas estruturais

A proteína C, com peso molecular de 11 kDa, apresenta caráter altamente básico. Os resíduos básicos estão concentrados nas extremidades N e C-terminal, e provavelmente, atuam em forma cooperativa quanto à ligação específica ao RNA genômico. O capsídeo se dobra em um dímero, no qual cada monômero contém quatro α -hélices. A região central da proteína C possui um domínio hidrofóbico que atua na membrana celular e, também, poderia ter participação na montagem do *virion*. A dimerização da proteína C é induzida pela interação com o DNA ou RNA (LINDENBACH, THIEL, RICE 2007,). O desenvolvimento de um sistema de montagem *in vitro* poderia ser útil para Identificação de compostos que bloqueiam a dimerização do capsídeo ou a interação RNA-capsídeo a qual poderia levar a identificação de inibidores que bloqueiam cada um desses passos (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009).

Dentre as proteínas estruturais, a glicoproteína E (~50 KDa) do envelope, desempenha um papel central na geração de anticorpos neutralizantes e na indução da resposta imune do hospedeiro. Além disso, essa proteína é responsável por mediar a fase inicial da infecção, caracterizada pela ligação ao receptor ou moléculas de superfície da célula hospedeira, assim como a fusão com a membrana celular (LINDENBACH, THIEL, RICE 2007, MONATH, 2001; REY, 2003). A glicoproteína E é uma proteína de membrana que contém domínios transmembrana, adjacentes à extremidade C-terminal, os quais servem para ancorar esta proteína na membrana e atuam como sequências de sinal para a translocação de NS1 (LINDENBACH, 2007). A proteína E em sua forma dimérica é o maior componente da superfície viral. Nesta forma a proteína E é a responsável pela ligação à superfície celular, fusão e entrada viral nas células do hospedeiro (PERERA, 2008). A entrada viral, permitida pela acidificação endossomal induz mudanças estruturais, na qual rearranjos de E de 90 homodímeros em pH neutro mudam para 60 homodímeros em pH ácido. O loop de fusão do domínio III é agora exposto no estado fusogênico do trímero de E antes dessa inserção entrar na membrana celular do hospedeiro (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009). Levando em consideração o estudo de novos fármacos, o desenvolvimento de uma tecnologia *high throughput screening*, baseada na interação proteína-proteína poderia ser muito útil para

localizar transições conformacionais da prM e E. Três regiões da proteína E poderiam ser alvos de antivirais: o sítio de ligação β -OG, rafts da proteína E nos vírus maduros e homotrimeros da proteína E. O desenho racional de fármacos antivirais contra a proteína E baseia-se no conhecimento estrutural das partículas maduras e imaturas (SAMPATH; PADMANABHAN, 2009).

A Figura 5 mostra a organização estrutural dos vírus dengue.

Figura 5: Organização estrutural do DENV modificada de Perera. Khaliq e Kuhn (2008). Processamento e clivagem da poliproteína viral.

A extremidade N-terminal da proteína prM (~26KDa) é gerada no retículo endoplasmático (RE) por uma peptidase sinal do hospedeiro. Durante a saída do *virion* pela via secretora, a proteína prM é clivada pela enzima furina encontrada no trans-Golgi formando a proteína M (~8KDa), a qual está presente no *virion* maduro e o segmento N-terminal “pr” é secretado no meio extracelular. A associação da prM com E produz partículas virais imaturas. A organização de prM em heterodímeros prM-E nas partículas imaturas, protege o *loop* de fusão da proteína E da fusão prematura. A partícula “imatura” transita através de um ambiente de baixo pH no compartimento de Golgi e ocorre uma mudança reversível conformacional/morfológica na proteína E antes do processamento de prM. A clivagem de prM para M na rede trans-golgi pela serino proteases celular, furina, resulta numa mudança conformacional irreversível na proteína E. O peptídeo de

clivagem liberado de prM (pr) é retido no *virion*, e é liberado somente após o *virion* ter sido secretado e exposto ao pH neutro, protegendo a proteína E de uma fusão prematura. (LI et al., 2008, LINDENBACH, THIEL, RICE 2007,).

1.5.2 Proteínas não-estruturais

A glicoproteína NS1 (~46 KDa) existe em três formas: associada à célula, na superfície da célula, e em forma extracelular. NS1 é translocada para o *lúmen* do retículo endoplasmático (RE) e separada do extremo C-terminal da proteína E por peptidase sinal. NS1 é separada de NS2A por proteases celulares residentes no RE. NS1 também participa da replicação do RNA viral. sendo necessária para a síntese da fita negativa de RNA (LINDENBACH; RICE, 1997; MUYLAERT et al., 1997).

NS2A (~ 22 KDa) é uma proteína hidrofóbica que está envolvida na geração da membrana durante a montagem e é separada da NS1 por proteases do RE (LEUNG et al., 2008). NS1-2A é clivada da NS1 e o C-terminal é gerado por clivagem da junção NS2A/2B por serina protease do citoplasma. NS2B (~14KDa) é uma proteína de membrana com 2 domínios hidrofóbicos os quais rodeiam uma região hidrofílica conservada. Esta proteína forma um complexo com NS3, e é um cofator necessário para a função serina protease NS3.

Somente NS3 e NS5 sabidamente possuem atividade enzimática; o que as torna ideais alvos antivirais, uma vez que a atividade enzimática pode ser usada em ensaios que utilizem a tecnologia *high throughput screening* (NOBLE et al., 2010), na qual dentro de uma biblioteca de moléculas destacam-se aquelas que possuem relativa atividade farmacológica. NS3 é uma proteína citoplasmática de aproximadamente 70 KDa que se associa à membrana por interação com NS2B e possui várias atividades enzimáticas relativas ao processamento da poliproteína e à replicação do RNA. As atividades de NS3 são: serino protease junto com o cofator NS2B, necessária para o processamento da poliproteína; atividade helicase/NTPase, RNA trifosfato, necessário para o capeamento do RNA viral (BENARROCH et al., 2004; FALGOUT et al., 1991).

A organização do genoma e função das proteínas virais é demonstrado na Figura 6.

Figura 6: Organização do Genoma e função das proteínas virais adaptado de Fernandez-Garcia, (2009). As funções das proteínas são: c. proteína do nucleocapsideo; prM. chaperona da proteína E; E. ligação e fusão; NS1. replicação, patogenese e imunoevasão; NS2A. Montagem e replicação; NS2B. cofator da serino protease NS3; NS3. serino protease, helicase, replicação RNA trifosfato; NS4A- replicação, montagem, indução de rearranjo da membrana; NS4B. montagem; NS5- metiltransferase RNA dependente de RNA polimerase.

NS4A e NS4B (16KDa e 27 KDa) são proteínas hidrofóbicas que estão associadas à membrana. NS4A é uma proteína transmembrana integral a qual induz rearranjos transmembrana para formar o complexo de replicação viral MILLER et al., 2007). NS4B a resposta do Interferon tipo I das células do hospedeiro e pode modular a replicação viral via sua interação com NS3 (MUNOZ-JORDAN et al., 2005; UMAREDDY et al., 2006).

A proteína NS5 (~103 KDa) é a maior e mais conservada proteína dos flavivirus com mais de 75% de homologia entre os quatro sorotipos de DENV. Ela contém duas atividades enzimáticas distintas, separadas por uma região interdomínio: uma S-adenosil metiltransferase e uma RNA dependente de RNA polimerase (EGLOFF et al., 2002). Contém sequências homólogas à RNA polimerases dependente de RNA de outros vírus RNA com polaridade positiva. Dentre estas sequências homólogas destaca-se o motif GLy-Asp-Asp (GDD). A NS5 também apresenta homologia com metiltransferases envolvidas na formação de cap do RNA (LINDENBACH, THIEL, RICE 2007).

1.6 PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE DA CÉLULA DO HOSPEDEIRO COMO POSSÍVEIS ALVOS PARA FÁRMACOS ANTIVIRAIS

Em qualquer estudo sobre fármacos antivirais, é prudente se considerar os componentes da célula do hospedeiro como potenciais alvos, pois as interações vírus-hospedeiro não são importantes somente para o ciclo de replicação viral, mas também para a patogênese viral. Os *flavivirus*, assim como outros vírus patogênicos, entram nas células dos hospedeiros através de interações específicas entre uma proteína viral e receptores da célula do hospedeiro e estratégias para burlar esta interação podem levar a descoberta de candidatos a fármacos antivirais (PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008). Há um grande número de outras proteínas celulares relatadas que se ligam ao RNA viral e, em alguns casos, o rompimento de sua ligação parece afetar a replicação viral (BRINTON, 2001).

1.7 A NECESSIDADE DA BUSCA DE FÁRMACOS CONTRA OS FLAVIVIRUS

Em 1959, Bill Prusoff descreveu a síntese de idoxuridina (5-iodo-20-deoxyuridine), 1 ano depois este se tornou a primeira droga antiviral a ser licenciada para uso clínico. Isto marcou o nascimento dos fármacos antiviral, que agora tem cerca de 50 medicamentos antivirais licenciados, metade dos quais é recomendada no tratamento de infecções com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). O número de remédios antivirais para o tratamento de infecções por vírus de RNA é muito limitado e importantes infecções virais, como a dengue e febre amarela, por exemplo, permanecem sem fármacos para tratamento (DE CLERCQ, 2005a; LEYSSEN; DE CLERCQ; NEYTS, 2008).

Os fármacos antivirais atualmente disponíveis apresentam muitas restrições de uso devido ao baixo espectro de ação e alta toxicidade. E o aparecimento de resistência viral a drogas – decorrentes de mutações genéticas – e os efeitos colaterais relacionados a essas estão entre os principais motivos para um maior aprimoramento do design e desenvolvimento de drogas antivirais (RICE; BADER, 1995; DE CLERCQ, 2002). E embora existam eficientes vacinas que levaram, ou levarão, a erradicação de importantes patógenos virais, como pólio, rubéola, caxumba, varíola e sarampo; outras doenças virais, particularmente o HIV e o vírus

da hepatite C (HCV), tem se mostrado intratáveis à abordagem da vacina; devido a dificuldades como a imunização a todos os sorotipos, por exemplo (DE CLERCQ, 2002).

Essas e outras dificuldades no tratamento e prevenção de algumas viroses deveriam impulsionar o estudo de novos fármacos antivirais. Embora seja tecnicamente viável o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de várias famílias ou gêneros de vírus de RNA – por exemplo, *Flavivirus*, *Orthomyxovirus*, *Paramyxovirus*, *Picornavirus*, etc. – a indústria farmacêutica não é favorável ao desenvolvimento de antivirais para doenças cujo mercado é pequeno e incerto. O ideal, então, seria o desenvolvimento de antivirais que exerçam amplo espectro de atividade anti-RNA dos vírus. Para tal êxito no desenvolvimento de fármacos antivirais, se faz necessária a interação e colaboração entre a bioquímica, a biomedicina e a indústria. Essa interação é de importância crucial na concepção de compostos, ao validar sua utilidade biomédica e ao desenvolvê-lo com sucesso no uso clínico (DE CLERCQ, 2005b, 2010; LEYSSEN; DE CLERCQ; NEYTS, 2008).

Na última década, os *flavivirus* têm reemergido como agressivos patógenos humanos, causando um aumento no número de infecções no mundo todo. Há mais de 70 membros relacionados no gênero *flavivirus*. Muitos desses vírus produzem significante doenças em humanos, como os vírus da febre amarela, vírus West Nile, vírus dengue, vírus da encefalite japonesa e vírus da encefalite transmitida pelo carrapato. Vacinas são atualmente disponíveis contra os vírus da febre amarela, vírus da encefalite japonesa e vírus da encefalite de tick borne. Entretanto, surtos de doenças causadas por esses três vírus continuam sendo sérios problemas em muitos países em desenvolvimento. O desenvolvimento de uma vacina contra os vírus da dengue tem sido um desafio. Por exemplo, a prevenção de anticorpos sub-neutralizantes (ADE) é de extrema importância na concepção de vacinas e exige esforços visando a obtenção de uma resposta imune apropriada contra todos os quatro sorotipos do vírus (MONATH et al., 2006). Terapia antiviral para esses vírus estão em estágio de desenvolvimento muito inicial (RAY; SHI, 2006). Desse modo, os *flavivirus* precisam de uma nova abordagem para prevenção da replicação viral, patogênese e transmissão (PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008).

1.8 VENENOS E PEÇONHAS ANIMAIS COMO FONTE DE FÁRMACOS ANTIVIRAIS

Fármacos antivirais derivados de fontes naturais podem atuar nas diversas etapas da replicação viral, desde a adsorção do vírus na célula hospedeira até sua liberação, o que pode resultar em mecanismos de ação complementares àqueles dos fármacos atualmente disponíveis (HUDSON; TOWERS, 1999; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997). Além disso, a triagem antiviral de extratos de plantas ou fontes animais tem fornecido resultados promissores, que justificam a pesquisa de novas substâncias com potencial atividade antiviral a partir destas fontes (KHAN et al., 2005).

No Brasil, é grande a incidência de animais venenosos ou peçonhentos, tais como serpentes, sapos e escorpiões. Os venenos desses animais são fontes de diversas substâncias químicas que, mesmo com muitas já purificadas, ainda não possuem a sua atividade biológica e farmacológica determinada. Peçonhas de serpentes são misturas de compostos bioativos (proteínas, enzimas e peptídeos) produzidos e estocados em glândulas de veneno altamente especializadas. Esses venenos têm se mostrado importantes devido às diversas propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais de seus componentes. Na sua grande maioria são constituídos por inúmeras toxinas, em concentrações variadas, as quais incluem: neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, proteínas que agem na hemostasia (proteases) e peptídeos (desintegrinas, peptídeos potenciadores da bradiginina / inibidores da enzima conversora de angiotensina), oxidases (L-aminoácido oxidase), hialuronidases e lectinas (DOLEY, 2009).

O veneno bruto animal é inadequado para uso terapêutico, pois a ação conjunta das toxinas pode exercer intoxicação e afetar o sistema fisiológico de um indivíduo. Entretanto, vistos como uma rica fonte de compostos bioativos, esses venenos possuem um enorme potencial como agentes terapêuticos em doenças que afetam o homem (KOH, 2006), auxiliando no desenvolvimento de novos fármacos.

Existem no mercado agentes terapêuticos derivados de venenos de serpentes, como: o anti-hipertensivo Capoten® (captopril) derivado de um peptídeo do veneno de *Bothrops jararaca*; e o Integrilin® (eptifibatide) e o Aggrastat®

(tirofiban) - anti-coagulantes derivados dos venenos de *Sistrurus miliaris barbouri* e *Echis carinatus*, respectivamente. E outros ainda em estudo como o VRCTC-310-Onco, que é um agente antineoplásico composto por duas toxinas isoladas de serpentes: a crotoxina, isolada do veneno da *Crotalus durissus terrificus* e a cardiotoxina, isolada do veneno da serpente *Naja naja atra* (COSTA et al., 2001).

1.8.1 *Crotalus durissus terrificus*

As serpentes do gênero *Crotalus*, conhecidas popularmente por cascavéis, são responsáveis por aproximadamente 7,4% dos acidentes ofídicos no Brasil e destacam-se pela alta letalidade -1,87% (BRASIL, 1999). São serpentes robustas, ágeis e de hábitos terrestres, apresentando entre 1000 mm e 1800mm de comprimento. São facilmente identificadas por apresentarem na extremidade caudal um guizo ou chocalho. A *Crotalus durissus* é uma espécie com distribuição ampla, sendo encontrada desde o México até a Argentina. No Brasil este gênero é representado por uma única espécie, a *Crotalus durissus*, a qual é encontrada desde os cerrados do Brasil central até as regiões áridas e semi-áridas do nordeste, seguindo pelo extremo sul e norte do país. Dentro dessa espécie, subdividem-se cinco subespécies: *Crotalus durissus terrificus*, *crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus cascavella*, *Crotalus durissus ruruima* e a *Crotalus durissus marajoensis* (MELGAREJO, 2003).

Os sintomas locais do acidente crotálico são pouco expressivos, com pouca ou nenhuma dor, edema discreto e raramente apresentando eritema. O quadro clínico é caracterizado por manifestações sistêmicas onde o quadro neuromuscular aparece precocemente, caracterizando-se por ptose palpebral, diplopia, oftalmoplegia e flacidez da musculatura da face (ROSENFELD, 1971). Manifestações miotóxicas são evidenciadas por mialgia intensa e rabdomiólise generalizada, que levam a um aumento das enzimas musculares no soro e à mioglobinúria (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003). Esses efeitos, associados a fatores como desidratação e hipotensão arterial contribuem para instalação de insuficiência renal. Alterações da coagulação sanguínea, (como incoagulabilidade sanguínea ou aumento no tempo de coagulação, resultante do

consumo de fibrinogênio) são observados com frequência (AZEVEDO-MARQUES; HERING; CUPO, 2003; JORGE; RIBEIRO, 1992). Dessa forma, a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* é classificada como neurotóxica, miotóxica e coagulante (JORGE; RIBEIRO, 1992). As ações biológicas causadas pela sua peçonha são atribuídas às ações de várias componentes como as toxinas crotamina, convulxina, giroxina, crotapotina e crotoxina, enzimas como a L-amino ácido oxidases, fosfolipases, enzima trombina-símile, fosfodiesterases e peptídeos (BERCOVICI, 1987).

A crotoxina é o principal componente tóxico da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, representando cerca de 60% do veneno total, além de ser a principal responsável pela neurotoxicidade deste veneno (BEITHAUPT, 1976; SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938). Essa toxina é formada a partir da associação não covalente de duas sub-unidades: a crotapotina, ou componente A e a Fosfolipase A₂, conhecido como componente B (HABERMANN; BREITHAUPT, 1978)

A fosfolipase A₂ (PLA₂) compreende uma superfamília de enzimas que catalisam a hidrólise da posição *sn*-2 dos fosfolípidos de membranas celulares – plasmáticas e subcelulares, levando a produção de um ácido graxo livre e lisofosfolípidos (FENTON et al., 2000; KUDO; MURAKAMI, 2002).

Objetivos

2 OBJETIVOS:

2.1 GERAL

1. Avaliar a potencial atividade antidengue e antifebre amarela da peçonha bruta e toxinas isoladas de serpentes (*Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops pirajai*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops brasili* e *Bothrops fonseca*) e escorpião (*Tityus serrulatus*) em células VERO E6.

2.2 ESPECÍFICOS

1. Avaliar a atividade virucida da peçonha bruta e toxinas isoladas de serpentes e escorpião.
2. Avaliar a capacidade da peçonha bruta e toxinas isoladas de serpentes e escorpião de conferirem resistência às células contra infecção dos vírus da dengue e febre amarela.
3. Avaliar a capacidade da peçonha bruta e toxinas isoladas de serpentes e escorpião de inibirem a replicação dos vírus da dengue e febre amarela após internalização celular.
4. Avaliar a capacidade da peçonha bruta e toxinas isoladas de serpentes e escorpião de inibirem a adsorção dos vírus da dengue e febre amarela às células VERO E6.
5. Avaliar a capacidade da peçonha bruta e toxinas isoladas de serpentes e escorpião de inibirem a internalização celular dos vírus dengue e febre amarela.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PEÇONHAS BRUTAS, FRAÇÕES E TOXINAS ISOLADAS DE SERPENTES, ESCORPIÃO E SAPO

Os materiais teste foram cedidos por três diferentes laboratórios da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Esses laboratórios receberam os estoques iniciais de venenos e peçonhas de diferentes fornecedores e posteriormente realizaram o isolamento e caracterização das toxinas isoladas. Os fornecedores dos estoques iniciais de venenos e peçonhas foram:

- A Peçonha bruta liofilizado de *Crotalus durissus terrificus* foi obtida no Serpentario da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (Registro IBAMA 1/35/1998/000846-1, devidamente regularizado).
- As peçonhas brutas, liofilizadas de *B. Jararaca*, *B. Jararacusssu*, *B. Moojeni*, *B. Pirajai*, *B. Fonseca* foram adquiridas do serpentário Bioagentes, de Batatais, São Paulo.
- A peçonha do escorpião brasileiro *Tityus serrulatus*, extraída por estímulo elétrico do telson do animal, liofilizada e armazenada a -20°C, foi adquirida da *Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA* – Belo Horizonte, MG.
- O veneno do sapo *Rhinella schneideri* (sapos machos e fêmeas, coletados na região de Ribeirão Preto, Brasil) foi colhido por pressão das glândulas paratóides de animais previamente limpos, imediatamente dessecados e armazenados a - 20°C.

Todos os venenos e peçonhas obtidos apresentam registro no IBAMA, estando todos devidamente regularizados. Os laboratórios que obtiveram, processaram e nos forneceram os materiais teste, assim como as peçonhas e veneno bruto, frações e toxinas isoladas utilizadas nos ensaios antivirais são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Informações sobre os venenos brutos, frações e toxinas utilizadas.

Veneno Bruto	Fração	Toxinas isolados	Grupo de Origem
<i>Bothrops jararaca</i>	Fração I	-	Profa. Dra. Suely Vilela Sampaio do Laboratório de Toxinologia
	Fração II		
	Fração III		
	Fração IV		
	Fração V		
<i>Bothrops jararacussu</i>	Fração II	BthTX-I	Profa. Dra. Suely Vilela Sampaio do Laboratório de Toxinologia
	Fração III		
	Fração IV		
	Fração V		
<i>Bothrops moojeni</i>	-	-	Prof. Dr. Andreimar Martins Soares do Laboratório de Bioquímica de Proteínas: Toxinas e Antitoxinas.
<i>Bothrops pirajai</i>	-	-	Profa. Dra Eliane Candiani Arantes do Laboratório de Toxinas Animais
<i>Bothrops brasili</i>	-	-	Profa. Dra Eliane Candiani Arantes do Laboratório de Toxinas Animais
<i>Bothrops fonseca</i>	-	-	Profa. Dra Eliane Candiani Arantes do Laboratório de Toxinas Animais
<i>Crotalus durissus terrificus</i> (amarelo)*	-		Profa. Dra. Suely Vilela Sampaio do Laboratório de Toxinologia
<i>Crotalus durissus terrificus</i> (branco)*	-	Crotamina	Profa. Dra. Suely Vilela Sampaio do Laboratório de Toxinologia
		Crotoxina	
		Crotapotina	
		Convulxina	
		Giroxina	
		PLA ₂ -CB	
<i>Tityus serrulatus</i>		TsTx-1	Profa. Dra Eliane Candiani Arantes do Laboratório de Toxinas Animais
		TsTx-6	
<i>Rhinella schneideri</i>	Fração de baixo peso	-	Profa. Dra Eliane Candiani Arantes do Laboratório de Toxinas Animais

*Venenos isolados de *Crotalus durissus terrificus* de diferentes regiões geográficas.

A coloração amarelada de Cdt se deve a presença de uma maior quantidade de L-aminoácido oxidase (LAAO), a qual contém riboflavina como um grupo prostético (VARANDA, GIANNINI, 1999).

3.1.1 Diluição dos materiais teste

Os materiais teste foram exatamente pesados em balança analítica, diluídos em tampão PBS para uma concentração final de 1000ng/μL e filtrados assepticamente em filtro Millipore® 0,22μm, aliquotados em tubos tipo eppendorf, e armazenados a -80°C até a realização dos ensaios.

3.1.2 Determinação da quantidade de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método da absorbância 205/280 nm (PETERSON, 1983). Foram colhidas aliquotas dos materiais teste diluídos anteriores e posteriores a filtragem. As absorbâncias foram então determinada em espectrofotômetro a 280 nm.

3.1.3 Peçonhas e toxinas isoladas da serpente *Crotalus durissus terrificus*

A peçonha bruta extraída de *Crotalus durissus terrificus* foi preparado de acordo com Itzhaki e Gill (1964). O material foi filtrado em gel Sephadex G-75. As frações foram coletadas, dializadas e liofilizadas. A crotapotina e a PLA₂-CB foram isoladas e purificadas a partir da crotoxina de acordo com Hendon e Fraenkel-Conrat (1971). A homogeneidade das frações foi demonstrada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page) segundo a técnica de Laemmli (1970). Estes ensaios foram realizados pela Dra. Adélia C. O. Cintra, no laboratório de Toxinologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

3.1.4 Caracterização da atividade enzimática das toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus*

Estes ensaios foram realizados pela Dra. Adélia C. O. Cintra, no laboratório de Toxinologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

3.1.4.1 Atividade fosfolipásica A₂

A atividade fosfolipásica foi realizado em placas. Neste método, descrito por Gutiérrez et al. (1988), foi utilizada uma única modificação, a troca da agarose por ágar. O experimento consiste na elaboração de um gel contendo CaCl₂ a 0,01 M, gema de ovo 1:3 v/v PBS, pH 7,2, ágar bacteriológico a 1% e azida de sódio a 0,005%, sendo o volume final completado com PBS. Após a solidificação do gel foram feitos orifícios de tamanho uniforme (0,5 cm de diâmetro) e aplicadas as amostras diluídas em PBS, em volume final de 20µL. Os géis contendo as amostras foram mantidos em estufa a 37°C por 12 horas. A formação de halo translúcido ao redor do orifício no gel é um indicativo de atividade.

3.2 CULTURAS CELULARES

3.2.1 Células

Para preparação do estoque viral foram utilizadas células C6/36, que são clones celulares de larvas de *A. Albopictus*. Para a realização dos experimentos, foram utilizadas células VERO E6, que são culturas contínuas de rim de macaco verde Africano (*Cercopithecus aethiops*). As mesmas foram escolhidas por serem permissivas aos vírus dengue e febre amarela.

3.2.2 Meio de cultura e reagentes

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o Meio Leibovitz (L15) – Cultilab®. O L-15 foi suplementado com Soro Fetal Bovino – SFB (Cultilab®) na proporção de 10% para promoção do crescimento e 2% para manutenção da linhagem celular. As culturas celulares infectadas com DENV ou YFV foram mantidas com meio L-15 suplementado com 2% de SFB. Para prevenir a contaminação das culturas de células por bactérias, fungos e leveduras foram adicionados ao meio 1% de PSA (10.000 U de Penicilina, 10.000 µg de Streptomicina e 25 µg de Anfotericina B - Cultilab®). Para a obtenção de subculturas celulares, para a manutenção das células e para a realização dos experimentos com células VERO E6, utilizou-se como agente dissociante a tripsina (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução de EDTA 1: 250), que é

uma enzima proteolítica que catalisa reações de quebra de cadeia polipeptídica em determinadas seqüências de aminoácidos.

3.3 VÍRUS

3.3.1 Cepas virais

Foram preparados estoques virais dos quatro sorotipos de dengue (DENV-1 Mochizucki; DENV-2 NGC 8450; DENV-3 H87 e DENV-4 H241) e de Febre amarela (YF-17D). Os vírus foram mantidos e amplificados em células C6/36 e titulados em células VERO E6.

3.3.2 Preparo dos estoques virais

As suspensões virais já existentes (DENV-1 Mochizucki; DENV-2 NGC 8450; DENV-4 H241 e YF-17D) foram inoculadas em frascos de cultura de 75 cm² contendo uma monocamada de células C6/36 com aproximadamente 70% de confluência, passadas 24 h antes da infecção. O meio de cultura foi aspirado da garrafa e a monocamada celular foi lavada duas vezes com solução de tampão fosfato (PBS), com o objetivo de retirar células mortas e resquícios de SFB; em seguida, a camada celular foi inoculada com 200µL da suspensão viral e o frasco incubado por 1 h a 28°C para que o vírus fosse adsorvido. Em seguida, adicionou-se meio L-15 com 2% de SFB e as células foram incubadas a 37 °C por até 10 dias. Após destruição parcial da monocamada celular, a infecção viral foi confirmada por Imunofluorescência indireta das células e por RT-PCR do sobrenadante. Após confirmação da infecção viral, o fluido foi colhido, centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi completado com 20% de SFB, aliqotado em tubos estéreis (~300µl) e armazenados a -80 °C até sua utilização.

3.3.3 Confirmação da infecção viral pela técnica de Imunofluorescência

Células C6/36 resultantes de infecção viral, ou não infectadas para controle negativo da infecção, foram transferidas para um tubo tipo Falcon e lavadas com tampão PBS, sendo centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. Após 3 lavagens, foram adicionados aproximadamente 20µL do homogeneizado aos orifícios da lâminas de imunofluorescência e deixadas para secar a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. As células foram então fixadas em acetona gelada por 15 minutos. Como anticorpo primário foi utilizado 20µL de uma mistura de fluido ascítico imune de camundongo (MIAF) preparado contra os quatro sorotipos virais para dengue (diluição 1:50) e apenas contra febre amarela para febre amarela (diluição 1:50). A lâmina foi incubada a 37°C por 30 minutos em câmara úmida e lavada três vezes com PBS por 5 minutos. As lâminas foram colocadas para secar a temperatura ambiente e posteriormente, foram adicionados 20 µL de anti-IgG conjugado com fluoresceína (diluição 1:50) com o azul de Evans (diluído em PBS a 1:20.000). A lâmina foi incubada a 37°C por 30 minutos em câmara úmida e lavada três vezes com PBS por 5 minutos. A lâmina foi montada com glicerina tamponada e lamínula para visualização utilizando o microscópio de imunofluorescência. Após visualização, foi possível confirmar a infecção das células C6/36 pelos DENV (1,2,3 e 4) e pelo YFV.

3.3.4 Confirmação da Infecção viral pelo método de RT-PCR

3.3.4.1 Extração do RNA viral

O RNA viral foi purificado a partir de 140 µl do sobrenadante da cultura de células C6/36 utilizando o QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN, Alemanha), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA viral foi suspenso em 80 µl de água destilada livre de RNase.

3.3.4.2 Transcrição Reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A RT-PCR utilizada foi aquela descrita por Bronzoni et al., (2005) com algumas modificações. A mistura da reação para a síntese de cDNA continha: 10 µl de RNA; 1µl de *random primer* 50 ng/µl; 1µl de dNTP 2,5 mM/µl, 4µl de tampão 5X (250mM Tris-HCL [pH 8,3], 375mM KCl, 15mM MgCl₂); 80 U de inibidor de RNase (RNaseOUT, Invitrogen); 400 U da Transcriptase Reversa M-MLV (USB, USA); DTT (1µl) e água até volume de 20 µl. A mistura foi incubada a 25 °C por 10 min, seguida de uma incubação a 37 °C, por 2 horas e finalmente 5 min a 85 °C. A mistura da PCR continha 2 µl de cDNA; 5 mM de dNTP; 15 µM do *primer* SFG1 e dos primers específicos para dengue e febre amarela (nD1, nD2, nD3, nD4 e nYF); 100nM de cloreto de magnésio, 0,3µl de enzima *Taq platinum*, juntamente com 5 µl do respectivo tampão 10X próprio para enzima e de água livre de DNase/RNase até um volume final de 50 µl. A amplificação foi realizada com o termociclador (Termo Electron Corporation, USA). A mistura de reação foi aquecida primeiramente a 95 °C por 2 min seguida por 45 ciclos de: a) 95 °C por 20 seg, para desnaturação; b) 53 °C por 45 seg, para anelamento e; c) 72 °C por 2min, para extensão; finalizando a reação com uma extensão final a 72 °C por 5min. Os produtos de amplificação foram analisados aplicando 8µl das amostras em gel de agarose (GIBCO BRL); posteriormente o gel foi submetido a uma eletroforese a 100 V durante 45min, corado com brometo de etídio (0.5 mg/mL durante 5 min), lavado em água destilada por 20 min (para remoção do excesso do brometo de etídeo) e finalmente visualizado em luz UV. Todos os produtos de PCR foram comparados com um marcador de peso molecular conhecido.

3.3.5 Determinação dos títulos virais pelo método das placas de lise

O diferencial da técnica das placas de lise é que a adição de um meio semi-sólido (CMC) evita a formação de placas secundárias, impedindo a difusão dos vírus do lugar de origem para novos lugares, assegurando que cada placa formada no teste seja originalmente de uma partícula viral infecciosa do inóculo inicial (FIELDS, 1998).

Os vírus DENV-1 Mochizucki, DENV-2 NGC 8450, DENV-4 H241 e YF-17D foram titulado pelo método das placas de lise (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992; MORENS et al., 1985).

Células VERO E6, em uma densidade de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placa de 24 cavidades, com meio L-15, suplementado com 10 % de SFB e incubadas a 37°C. Após confluência, essas células foram infectadas com 400 µL de diluições decimais seriadas dos estoques virais (diluições de 10^{-1} a 10^{-10}), em meio L-15 sem SFB (duas réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas durante 1h, tendo sido agitadas cuidadosamente a cada 15 min para uma melhor distribuição da suspensão viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e foram adicionados a cada cavidade 1000 µL de uma solução de CMC¹¹(carboximetilcelulose) em meio L-15 (duas vezes concentrado) acrescido de 2% de SFB e 1% de PSA. As placas foram então incubadas por 120 h para DENV-2, 4 e YFV e por 240h para DENV-1. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 200 µL do corante preto de naftaleno² por 40 min, a temperatura ambiente, em agitador mecânico. Após este tempo, o corante foi aspirado e as placas colocadas para secar a temperatura ambiente, sendo quantificadas através da visualização das placas de lise a olho nu. Para calcular o título, contaram-se os placas de lise na última diluição que apresentava placas. O título viral é expresso em unidades formadoras de placas/mL (UFP/mL) e, portanto, de partículas virais, já que teoricamente cada placa é iniciada pela infecção de uma única partícula viral infectante.

O título viral foi calculado através da fórmula:

$$TV = NP \times \frac{1}{d} \times \frac{1}{V}$$

Onde:

---

¹ Preparação da solução de carboximetilcelulose: Meio L-15 2X + solução aquosa a 1,8% de carboximetilcelulose (Sigma®), na proporção 1:1, ambos previamente esterilizados e acrescidos de 1% de PSA e 2% de SFB.

² Preparação da solução de preto de naftaleno: 100 mg do corante preto de naftaleno (Sigma®), foram dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 5% de ácido acético (v/v) (Nuclear®), sendo o pH ajustado, se necessário, para 2,3-2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel filtro e estocada a 4 °C, sendo aquecida em banho-maria a 37°C, antes de seu uso.

TV= Título viral

NP=Nº Placas formadas na ultima diluição que apresenta placas de lise

d= Ultima diluição viral que apresenta placas

V= Volume da diluição viral utilizada para infectar a monocamada celular

Os títulos virais obtidos são apresentados na tabela 2:

Tabela 2: Títulos dos estoques de DENV e YFV.

Vírus	Cepa	Título viral em células C6/36
DENV-1	Mochizucki	$6,75 \times 10^6$ PFU/mL
DENV-2	NGC 8450	$2,34 \times 10^6$ PFU/mL
DENV-4	H241	$1,2 \times 10^5$ PFU/mL
YF	17D	5×10^6 PFU/mL

PFU: Plaque forming units

3.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Antes de iniciar os testes antivirais, foi realizada a avaliação da citotoxicidade dos materiais teste sobre as células utilizadas nos experimentos. Foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por Mosmann (1983), com modificações propostas por Sieuwerts et al. (1995). O MTT é um sal hidrossolúvel que é incorporado pelas mitocôndrias de células viáveis e reduzido pelas desidrogenases a sal de formazana. O sal de formazana é armazenado no citoplasma celular e solubilizado após a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) ocorrendo a formação de um produto colorido, cuja intensidade de cor é lida em espectrofotômetro a 540 nm. A absorbância obtida é diretamente proporcional a viabilidade celular.

Uma suspensão de células VERO E6, contendo aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100 µL/cavidade). A placa foi incubada por 24 h, a 37 °C. Após 24 h, com a monocamada celular confluyente, o meio L-15 foi substituído por 200 µL de L15 com 2% de SFB contendo os diversas concentrações dos materiais teste. A placa foi incubada por 120 ou 240h a 37 °C. O meio foi então

removido e foram adicionados 50 µL de MTT (1 mg/ml)³, a placa foi novamente incubada por 4 h. O meio com MTT foi então removido e substituído por 100 µL de DMSO/cavidade (Merck, Alemanha), a placa foi agitada por 10 min e realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A absorbância obtida é diretamente proporcional a viabilidade celular, a qual é calculada utilizando-se as absorbâncias das monocamadas tratadas com material-teste, comparados ao controle celular utilizando a seguinte fórmula:

$$V(\%) = \frac{DO_{mt}}{DO_{cc}} \times 100$$

Onde:

V (%)= Viabilidade celular em percentagem

DO_{mt} = Densidade Óptica do material testado

DO_{cc}= Densidade Óptica do Controle Celular

Os valores de CC₅₀, ou seja, a concentração de cada material teste que reduziu em 50% a viabilidade celular foram obtidas por análise de regressão dos percentuais referentes às diferentes concentrações dos materiais teste. Os valores de CC₅₀ representam a média de três experimentos independentes.

3.5 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL

Para a avaliação da ação antiviral de venenos brutos, frações e toxinas isoladas de serpentes, escorpião e sapo, primeiramente foi realizado um screening no qual os materiais teste foram testados contra os vírus DENV-2 e YFV. Venenos e toxinas que apresentaram resultados promissores nessa avaliação, foram testados contra os outros sorotipos de dengue. Foram consideradas sem atividade (SA), as toxinas que apresentaram percentuais de inibição da infecção inferior a 50%.

---

³ Preparação da solução estoque de MTT (Sigma®) a 5 mg/mL em PBS (p/v) – para uso, diluição subsequente em meio MEM (1mg/mL).

3.5.1 Tratamento das células VERO E6 com as amostras teste e posterior infecção com DENV ou YFV (PRÉ-TRATAMENTO):

O ensaio de Pré-tratamento foi realizado de acordo com metodologia proposta por Diamond e colaboradores (2002) com algumas modificações. Células VERO E6, em uma densidade de $2,0 \times 10^5$ células/mL, foram cultivadas em placas de 24 cavidades até confluência usando meio L-15 suplementado com 10% de SFB, e incubados a 37 °C. Após 24 h, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 400 µL de meio de cultura contendo diluições duplas seriadas dos materiais teste, a partir do valor da CC_{50} ou da concentração máxima não citotóxica de cada amostra. As amostras ficaram em contato com a monocamada celular por 3 h a 37 °C. Decorrido este período, o meio foi cuidadosamente aspirado e foi substituído por 400 µL de meio contendo 25-100 UFP de YFV ou DENV. Células não tratadas foram infectadas com vírus como controle da infecção. As placas foram incubadas nas mesmas condições citadas no item 3.3.5. Passado esse período, o meio foi aspirado e as células foram coradas e fixadas com 200µL de uma solução de preto de naftaleno em ácido acético. As células foram incubadas a temperatura ambiente com agitação por 40 minutos. Posteriormente, o corante foi aspirado e as placas de lise foram contadas por visualização direta.

A percentagem de inibição da replicação viral foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%I = \left[1 - \frac{NP_{mt}}{NP_{cv}} \right] \times 100$$

Onde:

%I= Percentagem de inibição da infecção viral

NPmt= Número de placas em células tratadas com material teste

NPcv= Número de placas em células infectadas mas não tratadas

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico que correlaciona a concentração dos materiais teste (eixo x) e a percentagem de inibição (eixo y), e através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de CE_{50} , ou seja, a concentração de cada amostra que manteve 50 % das células

viáveis na presença da infecção viral. Os valores de CE_{50} representam a média de três experimentos independentes $\pm$ desvio padrão.

Com posse dos valores de CC_{50} e CE_{50} foi possível calcular o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/CE_{50}$) de cada amostra, que demonstra quão promissora é determinada substância. Se o valor de IS for maior que 4, pode-se considerar que a amostra testada apresenta atividade antiviral (SIDWELL, 1986; LYU, RHIM, PARK, 2005).

3.5.2 Tratamento das células VERO E6 com os materiais teste após a infecção com DENV ou YFV (PÓS-TRATAMENTO):

Células VERO E6 foram cultivadas em placas de 24 cavidades conforme descrito acima. Após 24 h, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 400 μ L de suspensão viral (50 – 100 UFP) à monocamada celular. A seguir, a placa foi incubada a 37 °C 1h; após esse período, a suspensão viral foi cuidadosamente aspirada e, então, foram adicionados 400 μ L de diluições duplas seriadas dos materiais teste, a partir do valor da CC_{50} ou da concentração máxima não citotóxica de cada amostra. Células não tratadas foram infectadas com vírus como controle da infecção (controle viral). Após incubação por 120h (ou 240 h para DENV-1) nas mesmas condições citadas anteriormente, o meio foi aspirado e a quantificação das placas foi realizada da mesma forma que citado anteriormente, os valores foram também calculados de acordo com o item 3.5.1, sendo possível a obtenção dos valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) para cada material-teste (DIAMOND, ZACHARIAH, HARRIS 2002).

3.5.3 Avaliação da atividade virucida

Com o objetivo de avaliar uma ação direta das toxinas animais sobre a partícula viral, o teste virucida foi realizado de acordo com Petricevich e Mendonça (2003), Bettega e colaboradores (2004), com algumas modificações. Células VERO E6 [$2,0 \times 10^5$ células/mL (1 mL/cavidade)] foram cultivadas em placas de 24 cavidades e incubadas a 37°C, até confluência (24 h). Após confluência, 200 μ L de

suspensão viral (25-100 UFP) foram misturadas em um tubo tipo eppendorf com concentrações iguais e inferiores (diluídas de forma seriada) a CC_{50} ⁴ dos materiais teste (ou com concentrações iguais e inferiores a 100ng/ μ L no caso dos venenos que não apresentavam toxicidade a essa concentração). Como controle da replicação viral, foi realizado controle de vírus tratado com PBS. Os vírus tratados foram vortexados e incubados por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, os vírus tratados foram adicionadas às monocamadas celulares e incubados a 37°C por 1h. O sobrenadante foi então removido, e uma solução de CMC em L-15, adicionado de 2% de SFB e 1% de antibiótico foi adicionado. Após incubação por 120h (ou 240 h para DENV-1) nas mesmas condições citadas anteriormente, o meio foi aspirado e a quantificação das placas foi realizada da mesma forma que citado anteriormente. O cálculo do valor de CE_{50} Foi realizado conforme descrito no item 3.5.1, sendo possível a obtenção dos valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) para cada material-teste

3.5.4 Avaliação do efeito dos materiais-teste na adsorção viral

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar se as amostras são capazes de inibir a adsorção viral. Foram conduzidos, em parte, a 4°C, temperatura na qual os vírus adsorvem nas células, mas não as penetram.

Células VERO E6 [$2,0 \times 10^5$ células/mL (1 mL/cavidade)] foram cultivadas em placas de 24 cavidades e incubadas a 37°C, até confluência (24 h). Após confluência, as monocamadas celulares foram previamente resfriadas a 4°C por 30 minutos. Nesse período, foram realizadas as diluições das amostras nas concentrações de 100 a 0,0002 ng/ μ L⁵, e a diluição da suspensão estoque viral para uma concentração final de 25-100 UFP. O meio das placas foi aspirado e as células lavadas 1X com PBS gelado. Foram então adicionados às monocamadas celulares

---

⁴ As concentrações dos materiais-teste reduzem-se pela metade ao se adicionar volumes equivalentes de suspensão viral. Portanto, os mesmos foram diluídos a uma concentração duas vezes maior para que quando misturadas aos vírus, obtivessem a concentração desejada. O mesmo foi realizado com as suspensões virais.

⁵ As concentrações dos materiais-teste reduzem-se pela metade ao se adicionar volumes equivalentes de suspensão viral. Portanto, os mesmos foram diluídos a uma concentração duas vezes maior para que quando misturadas aos vírus, obtivessem a concentração desejada. O mesmo foi realizado com as suspensões virais.

200µL da suspensão viral (25-100 UFP) e 200 µL das diferentes concentrações de materiais-teste. As placas foram novamente incubadas a 4°C por 2h. No mesmo experimento foram realizados controles celulares (apenas meio de cultura) e controles virais (suspensão viral contendo 100UFP). Após o período de adsorção a 4°C, os materiais-teste e a suspensão viral foram aspirados e as células lavadas 2X com PBS gelado para retirar os vírus não adsorvidos e o restante dos materiais-teste. Para controle da metodologia empregada, foi realizada a lavagem de um dos controles virais com solução tampão citrato (pH3,0)⁶. Neste valor de pH, ocorre uma desestabilização das partículas virais adsorvidas nas membranas celulares, fazendo com que sejam liberadas e eliminadas após a aspiração e lavagem. Teoricamente, não deve haver penetração até este ponto do ensaio, uma vez que a temperatura de 4°C foi empregada, o que se reflete na ausência de placas de lise neste controle viral lavado com a solução de tampão citrato.

Posteriormente, uma solução de CMC em L-15, adicionado de 2% de SFB e 1% de antibiótico foi adicionado cuidadosamente às monocamadas celulares e as placas foram novamente incubadas a 37°C.

Após incubação por 120h (ou 240 h para DENV-1) nas mesmas condições citadas anteriormente, o meio foi aspirado e a quantificação das placas foi realizada da mesma forma que citado anteriormente. O cálculo do valor de CE_{50} Foi realizado conforme descrito no item 3.5.1, sendo possível a obtenção dos valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) para cada material-teste

3.5.5 Avaliação do efeito dos materiais-teste na internalização viral

Considerando que os vírus adsorvem nas células a 4°C, mas apenas as penetram quando a temperatura é aumentada, o efeito dos materiais-teste na penetração do DENV-2 e YFV em células VERO E6 foi avaliado, alterando-se as temperaturas de trabalho.

Células VERO E6 [$2,0 \times 10^5$ células/mL (1 mL/cavidade)] foram cultivadas em placas de 24 cavidades e incubadas a 37°C, até confluência (24 h). Após

---

⁶ **Preparo da solução tampão citrato:** 4,2g de ácido cítrico, 0,375g de KCl e 4g de NaCl foram dissolvidos em 500mL de água destilada e filtrados com auxílio de um papel filtro. O pH foi ajustado para 3,0 e a solução esterelizada por autoclavação.

confluência, as monocamadas celulares foram previamente resfriadas a 4°C por 30 minutos. Nesse período foi realizada a diluição viral e após o período de incubação, o meio foi aspirado e as monocamadas celulares foram infectadas com 400µL de suspensão viral (25-100 UFP) e incubadas por 2h a 4 °C para ocorrer a adsorção das partículas virais. Decorrido esse período, as células foram lavadas com PBS gelado para remover partículas virais não adsorvidas, e a temperatura do experimento foi rapidamente elevada por incubação das placas em estufa a 37 °C por 5 minutos para maximizar a penetração viral. Após, foram adicionados 400µL de diferentes concentrações de materiais-teste. Para cada ensaio, foram realizados os controles virais, onde as células foram infectadas e não tratadas, e os controles celulares, onde as células não foram infectadas nem tratadas.

Em seguida, as placas foram recolocadas a 37°C por mais 1h e as amostras permaneceram em contato com as células durante todo o tempo de penetração. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e com solução de tampão citrato (pH3,0) a 37°C por 1 minuto para inativar os virions que supostamente não penetraram nas células até esse período. O pH foi normalizado através de uma lavagem subsequente com PBS pH7,4. Posteriormente, uma solução de CMC em L-15, adicionado de 2% de SFB e 1% de antibiótico foi adicionado cuidadosamente às monocamadas celulares e as placas foram novamente incubadas a 37°C.

Após incubação por 7 dias (ou 10 dias para DENV-1) nas mesmas condições citadas anteriormente, o meio foi aspirado e a quantificação das placas foi realizada da mesma forma que citado anteriormente. O cálculo do valor de CE_{50} Foi realizado conforme descrito no item 3.5.1, sendo possível a obtenção dos valores de IS (CC_{50}/CE_{50}) para cada material-teste

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Tanto na avaliação da citotoxicidade como na avaliação da potencial atividade antiviral foi utilizada a metodologia de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo multifatorial dos tratamentos (SOKAL; ROHLF, 1995), onde cada cavidade da placa constitui uma unidade experimental e os tratamentos foram

realizados com os diferentes materiais-teste *versus* as diferentes concentrações testadas.

Os tratamentos (incluindo os controles) foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades da placa, tendo sido feitas duas ou três repetições, em placas diferentes e em dias diferentes. O sorteio dos tratamentos com relação às unidades experimentais aumenta a probabilidade de que possíveis fatores interferentes desconhecidos fiquem igualmente distribuídos nos blocos e faz com que a estimativa dos valores e médias dos tratamentos e do erro experimental não sejam tendenciosas. Cada placa correspondeu a um bloco, permitindo uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

Para calcular os valores de CC_{50} e de CE_{50} , realizou-se uma análise de regressão, a partir de curvas de concentração *versus* efeito dos materiais-teste. O estudo de qualquer atividade farmacológica em cultura celular tem como vantagem, entre muitas outras, a homogeneidade das amostras. Um erro grave que, normalmente, é cometido quando se trata de experimentos realizados em placas de microtitulação, é acreditar que, colocando-se as mesmas concentrações de um material-teste, em duas ou três colunas na placa, se estaria fazendo uma duplicata ou triplicata. Estatisticamente, esse procedimento é considerado apenas uma réplica de um mesmo tratamento e não uma repetição, pois a variância devido a fatores externos (erro experimental) não estaria sendo levada em consideração (SOKAL e ROHLF, 1995). Por isso, foram realizados dois ou três experimentos independentes, em dias subseqüentes, o que caracteriza uma duplicata ou triplicata.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS TESTES

A citotoxicidade frente as células VERO E6 foi determinada pela técnica de MTT utilizando concentrações de materiais teste que variaram entre 0,002 e 500 ng/ μ L. A percentagem de viabilidade celular foi calculada por comparação da absorbância das células tratadas com as células não tratadas. A CC₅₀ foi calculada por análise de regressão a partir das concentrações dos materiais teste e dos percentuais de viabilidade celular (Tabela 3). Para alguns materiais teste, não foi possível calcular a CC₅₀ porque a maior concentração testada (100 ou 500 ng/ μ L), não apresentou citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular. Concentrações maiores não foram testadas devido à escassez dos materiais teste

Tabela 3: Concentração citotóxica a 50% da monocamada celular (CC₅₀) dos materiais teste frente a células VERO E6.

Toxina		*CC ₅₀ (ng/ μ L) $\pm$ Desvio Padrão
Peçonha Bruta	<i>B. jararaca</i>	25,9 $\pm$ 2,3
	<i>B. jararacussu</i>	15,3 $\pm$ 9,4
	<i>B. fonseca</i>	64,3 $\pm$ 17
	<i>B. moojeni</i>	54 $\pm$ 8,9
	<i>B. pirajai</i>	0,428 $\pm$ 0,15
	<i>B. brasili</i>	54,1 $\pm$ 12,8
	<i>Tityus serrulatus</i>	>100 $\pm$ 0
	<i>Cdt branco</i>	>500 $\pm$ 0
	<i>Cdt amarelo</i>	>500 $\pm$ 0
Compostos isolados	Crotamina	>500 $\pm$ 0
	Crotoxina	>500 $\pm$ 0
	Crotapotina	>500 $\pm$ 0
	<i>Crotalus durissus</i> Convulxina	>500 $\pm$ 0
	terrificus	Giroxina
		>500 $\pm$ 0
		PLA ₂ -CB
		>500 $\pm$ 0
		PLA ₂ -IC
		>500 $\pm$ 0
	<i>B. jararacussu</i>	BthTx-1
		108,6 $\pm$ 8
	<i>Tytilus serrulatus</i>	TsTx-1
		>500 $\pm$ 0

*Os valores de CC₅₀ calculados representam a média de três experimentos independentes.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS MATERIAIS TESTES

A avaliação da ação antiviral dos diferentes materiais teste foi realizada de acordo com a quantidade disponível dos mesmos. Desta forma, não foi possível realizar todas as estratégias metodológicas (pré-tratamento, pós-tratamento e virucida) com todos os materiais teste. Primeiramente realizou-se um screening da atividade antiviral das peçonhas brutas de serpentes e escorpião e da fração de baixo peso de *Rhinella schneideri*. Foram considerados sem atividade antiviral aqueles materiais teste que não inibiram pelo menos 50% da infecção das células VERO E6 na máxima concentração testada.

4.2.1 PEÇONHAS BRUTAS

4.2.1.1 Pré-tratamento:

Para avaliar a capacidade das peçonhas brutas conferirem resistência às células VERO E6 contra a infecção de YFV e DENV, as células foram tratadas 3hs antes da infecção viral com concentrações iguais e inferiores às CC_{50} dos diferentes materiais teste. A percentagem de inibição de infecção celular induzida pelas diferentes concentrações dos materiais teste foi calculada por comparação com o número de focos da monocamada celular não tratada. A CE_{50} foi calculada por análise de regressão correlacionando os percentuais de inibição da infecção celular observada utilizando as diferentes concentrações dos materiais teste. Relacionando-se os valores de CE_{50} com CC_{50} foi possível calcular o índice de seletividade ($IS=CC_{50}/CE_{50}$) dos materiais teste analisados neste estudo (Tabela 4).

Tabela 4: CE₅₀ e IS dos materiais teste contra YFV e DENV-2 no pré-tratamento de células VERO E6.

Material teste	CC ₅₀ (ng/μL)	*Conc. testadas (ng/μL)	YFV			DENV-2		
			% de inibição da máxima concentração testada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	IS	% de inibição da máxima concentração testada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	IS
<i>B. jararaca</i>	25,9	25,9 a 3,2	22,3	SA	SA	ND	ND	ND
<i>B. jararacussu</i>	15,3	15,30 a 0,4	83	4,2±5 ng/μL	3,6	84,3	2,20±0,7	6,95
<i>B. moojeni</i>	54	54 a 6,75	81	10,77±1,2	5,01	67,5	11,46±1,4	4,71
<i>B. pirajai</i>	0,43	0,43 a 0,05	-32	SA	SA	ND	ND	ND
<i>B. brasili</i>	54,1	54,1 a 6,7	64	33,04±12	1,64	ND	ND	ND
<i>Tityus serrulatus</i>	> 100	100 a 12,5	28	SA	SA	13,53	SA	SA
<i>Crotalus durissus terrificus amarelo</i>	> 500		100	0,10±0,09	5000	100	0,054±0,004	9259
<i>Crotalus durissus terrificus branco</i>	>500	100 a 0,01	96	0,19±0,09	2631	100	0,067±0,003	7462

SA: sem atividade, o valor de inibição da infecção viral é inferior a 50%. ND: Não determinado devido à falta do material teste. DP= Desvio Padrão. CC₅₀= Concentração citotóxica a 50% da monocamada celular; CE₅₀= Concentração que inibe 50% da infecção viral; IS= Índice de seletividade (IS= CC₅₀/CE₅₀). * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/μL.

A peçonha bruta que apresentou maior ação antiviral foi aquela de *Crotalus durissus terrificus*. As peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. brasili* também mostraram atividade antiviral, mas com IS bem inferiores. Interessantemente, a peçonha de *B. pirajai* estimulou a infecção de YFV em 32%.

A Figura 7 mostra os valores de CE₅₀ e IS das peçonhas brutas.

Figura 7: Avaliação da potencial ação antiviral das peçonhas de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. brasili*, *Tityus serrulatus*, Cdt amarelo e Cdt branco na estratégia de pré-tratamento contra YFV e DENV-2. CE₅₀= Concentração que inibe 50% da infecção viral; IS= Índice de seletividade (IS= CC₅₀/CE₅₀).

Na Figura 7 é possível visualizar que quanto menor o valor de CE₅₀, maior é o IS. As peçonhas brutas de *Crotalus durissus terrificus* apresentaram altos IS.

4.2.1.2 Pós-tratamento:

Os venenos brutos foram avaliados quanto a sua ação antiviral 1h após a infecção celular. Células VERO E6 foram infectadas com o vírus da febre amarela ou DENV-2 e após 1 hora foram tratados com concentrações iguais e inferiores às CC₅₀ dos diferentes materiais teste. A percentagem de inibição de infecção celular

induzida pelas diferentes concentrações dos materiais teste foi calculada por comparação do número de focos observados na monocamada de células tratadas e não tratadas (Tabelas 5).

Tabela 5: Percentagem de inibição da infecção viral das células VERO E6 induzida pelas peçonhas brutas – Pós-tratamento.

Material teste	Concentrações testadas (ng/μL)	YFV		DENV-2	
		% de inibição da máxima concentração testada	CE ₅₀ (ng/μL)	% de inibição da máxima concentração testada	CE ₅₀ (ng/μL)
<i>B. jararaca</i>	25,9 a 3,2	-28	SA	ND	ND
<i>B. jararacussu</i>	15,30 a 1,9	-56	SA	44	SA
<i>B. fonseca*</i>	64,3 a 8,0375	-49	SA	ND	ND
<i>B. moojeni</i>	54 a 6,75	30	SA	28	SA
<i>B. brasili*</i>	54,1 a 6,8	-10	SA	ND	ND
<i>Cdt amarelo</i>	100 a 12,5	9,5	SA	34	SA
<i>Cdt branco</i>	100 a 12,5	25	SA	44	SA
<i>Tityus serrulatus</i>	100 a 12,5	ND	ND	17	SA

SA: sem atividade, o valor de inibição da infecção viral é inferior a 50%. ND: Não determinado devido a falta do material teste. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/μL.

Nenhum material teste foi capaz de inibir pelo menos 50% da infecção viral, apenas as peçonhas brutas de *B. moojeni*, *Crotallus durissus terrificus* branco e amarelo apresentaram um baixo percentual de inibição que variou de 30 a 9,5% para o YFV e de 44 a 17% para o DENV-2. Não foi possível calcular os valores de

CE₅₀ ou IS para nenhum material teste. As peçonhas de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. fonseca* e *B. brasili* estimularam a replicação viral de YFV.

4.2.1.3 Ensaio Virucida

No ensaio virucida, os vírus foram tratados por 1h antes da infecção celular com diluições duplas seriadas dos materiais teste iniciando a partir da CC₅₀ de cada um deles (Tabela 6).

Tabela 6: Avaliação da atividade virucida dos materiais teste contra YFV e DENV-2 em células VERO E6.

Material teste	CC ₅₀ (ng/μL)	*Conc. testadas (ng/μL)	YFV			DENV-2		
			% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	IS	% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	IS
<i>B. jararaca</i>	25,9	25,9 a 3,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>B. jararacussu</i>	15,3	15,3 a 0,1	ND	ND	ND	100	0,35±0,02	43,6
<i>B. moojeni</i>	54	54 a 0,8	ND	ND	ND	100	2,2±0,3	25
<i>B. pirajai</i>	0,43	0,43 a 0,05	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>B. brasili</i>	54,1	54,1 a 6,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Tityus serrulatus</i>	> 100	100 a 12,5	ND	ND	ND	39	SA	SA
<i>Crotalus durissus terrificus</i> amarelo	> 500	100 a 0,01	100	0,006±0,000826	83333	100	0,005±0,0006	100000
<i>Crotalus durissus terrificus</i> branco	>500		100	0,0045±0,0007	111111	100	0,004±0,0002	125000

SA: sem atividade, o valor de inibição da infecção viral é inferior a 50%. ND: Não determinado devido a falta do material teste. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/μL.

As peçonhas brutas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* apresentaram inibição do DENV-2, apresentando valores de IS de 43,6 e 25, respectivamente. Interessantemente, Cdt amarelo e branco apresentaram IS extremamente altos quando comparados com os IS obtidos para os outros materiais teste. A peçonha bruta amarela de *Crotalus durissus terrificus* apresentou IS de 83333 e 108131 e a branca de 111111 e 140964 para YFV e DENV-2, respectivamente.

Os resultados obtidos no teste virucida foram similares à aqueles observados no ensaio de pré-tratamento, ou seja, as peçonhas brutas de *Crotallus durissus terrificus* apresentam maior ação antiviral quando comparadas às demais peçonhas.

4.2.2 TOXINAS ISOLADAS DE *Crotallus durissus terrificus*

Comparando os resultados obtidos no screening inicial, foi possível observar que as peçonhas brutas de *Crotallus durissus terrificus* (amarela e branca) foram as que apresentaram maior índice de seletividade, tanto no ensaio de pré-tratamento quanto no virucida para ambos os vírus, YFV e DENV-2. Na tentativa de identificar qual componente da peçonha é o responsável pela ação antiviral, toxinas isoladas de *Crotallus durissus terrificus* (crotoxina, crotamina, crotaipotina, convulxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC) também foram testadas contra YFV e DENV-2. Primeiramente foi realizado o isolamento e purificação das toxinas e a caracterização da atividade enzimática de cada uma delas, após confirmação da atividade enzimática foi realizado a avaliação da atividade antiviral dessas toxinas.

4.2.2.1 Isolamento das toxinas da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*

O fracionamento da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* foi realizado por cromatografia de exclusão em gel de Sephadex G-75, demonstrando a presença de diferentes toxinas (Figura 8).

Figura 8: Cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G-75 de 500 mg da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*. De acordo com o peso molecular, as frações foram identificadas como (I) Convulxina, (II) Giroxina, (III) Crotoxina, (IV) PLA₂-IC e (V) Crotamina.

Através da cromatografia de exclusão molecular foi possível isolar a convulxina, giroxina, crotoxina, PLA₂-IC, crotamina e demais peptídeos. Para a obtenção da crotapotina e PLA₂-CB a partir da crotoxina, esta foi submetida a tratamento conforme descrito em materiais e métodos (Figura 9).

Figura 9: Cromatografia em DEAE Sephadex da Crotoxina mostrando isolamento da fosfolipase A₂ básica - PLA₂-CB (CB) e crotapotina (CA).

Na figura 9 podemos observar o isolamento da PLA₂-CB e da crotapotina. Antes da caracterização da atividade enzimática de cada toxina, é necessário primeiramente confirmar a pureza de cada toxina através de uma eletroforese em gel de poliácridamida (Figura 10).

Figura 10: Eletroforese com SDS a 13,5% em acrilamida, do veneno bruto e toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus*. A: Peçonha Bruta: 1. *Crotalus durissus terrificus* branco; 2. *Crotalus durissus terrificus* amarelo; B: Toxina isolada: 3. Crotamina; 4. Crotoxina; 5. Crotapotina; 6. Convulxina; 7. Giroxina; 8. PLA₂-CB; 9. PLA₂-IC; 10. PM.

Na figura 10 é possível confirmar que a pureza da crotamina (3) e que a crotoxina (4) é composta por dois dímeros compostos dois monômeros distintos – isoforma CB1 (monômeros B e C) e CB2 (monômeros A e D). Quando a crotoxina é separada da crotopotina (5) é possível observar a evidencia as duas cadeias da CB (8). Não é possível observar a banda da crotopotina neste gel, pois a mesma apresenta um tamanho de aproximadamente 9KDa, no entanto a mesma encontra-se purificada (dados nao mostrados). A Giroxina (7) esta associado com uma PLA₂ que não é a crotoxina pois apresenta baixa atividade fosfolipásica. A Intercro é uma variante de fosfolipase A₂.

Foi possível confirmar a pureza das toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus*, no entanto, é visível uma contaminação na giroxina, a qual, devido a essa contaminação, será descartada de nossos estudos.

Após confirmação da pureza dessas toxinas, foi realizada avaliação de suas atividades enzimáticas.

4.2.2.2 Caracterização da atividade enzimática das toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus*

4.2.2.2.1 Avaliação da atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica da peçonha bruta e toxinas isoladas de *Crotallus durissus terrificus* foi avaliada conforme descrito por Gutiérrez et al. (1988) (Figura 11).

Figura 11: Atividade fosfolipásica da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. *terrificus* e frações. 1.Veneno Bruto C.d.t.(amarelo), 2.Veneno Bruto C.d.t. (branco), 3. Convulxina, 4. Giroxina, 5. Crotoxina, 6.Crotaipotina, 7.Crotamina, 8.PLA₂ CB, 9.PLA₂ IC, 10. BthTX-I.

Com este ensaio foi possível observar a atividade fosfolipásica presente na peçonha bruta de *Crotallus durissus terrificus* (branco e amarelo), na crotoxina e nas fosfolipases CB e IC. A crotoxina apresentou atividade fosfolipásica por ser um heterodímero composto por PLA₂-CB e crotaipotina. A giroxina apresentou pouca ação fosfolipásica, no entanto, esta toxina não deveria apresentar esta ação, o que confirma sua contaminação e a necessidade de exclusão deste material teste de nossos ensaios antivirais.

4.2.2.3 Pré-tratamento:

As toxinas isoladas de *Crotallus durissus terrificus*, foram avaliadas contra os vírus da febre amarela e da dengue no ensaio de pré-tratamento. Os resultados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: CE₅₀ e IS dos materiais teste contra YFV e DENV-2 no pré-tratamento de células VERO E6.

Material teste	CC ₅₀ (ng/μL)	*Concentrações testadas (ng/μL)	YFV			DENV-2		
			% de inibição da máxima concentração testada	CE ₅₀ ±DP	IS	% de inibição da máxima concentração testada	CE ₅₀ ±DP	IS
<i>Crotoxina</i>	>500	100 a 0,01	93	0,04±0,04	12500	100	0,05±0,002	10000
<i>Crotapotina</i>	>500	100 a 12,5	43	SA	SA	68	39±0,04	12,8
<i>Crotamina</i>	>500	100 a 12,5	20	SA	SA	11	SA	SA
<i>Convulxina</i>	>500	100 a 12,5	22	SA	SA	5	SA	SA
<i>PLA₂-CB</i>	>500	100 a 0,01	100	0,26±0,17	1923	100	0,06±0,002	8333
<i>PLA₂-IC</i>	>500	100 a 0,01	100	1,30±0,67	385	100	0,78±0,09	641

ND: Não determinado devido ao valor de inibição da infecção viral ter sido inferior a 50%. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/μL.

Uma maior inibição da infecção viral foi observada quando as células foram tratadas com a crotoxina, a qual apresentou IS de 12500 e 9437, contra YFV e DENV-2, respectivamente. As PLA₂-CB e PLA₂-IC também apresentaram alta atividade antiviral com IS de 1023 e 8299 para PLA₂-CB e 385 e 645 para PLA₂-IC, contra YFV e DENV-2, respectivamente.

A crotapotina apresentou percentual de inibição da infecção de YFV inferior a 50%, no entanto apresentou IS de 12,8 contra DENV-2.

4.2.2.4 Pós-tratamento:

As toxinas isoladas foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir a infecção de YFV e DENV-2 após a entrada desses vírus nas células (Tabelas 8). Nenhum material teste foi capaz de inibir pelo menos 50% da infecção viral, portanto todos foram considerados sem atividade antiviral.

Tabela 8: CE₅₀ e IS dos materiais teste contra o YFV e DENV-2 no pós-tratamento de células VERO E6.

Material teste	Concentrações testadas (ng/uL)	YFV		DENV-2	
		% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ (ng/uL)	% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ (ng/uL)
Crotoxina		-37	SA	44	SA
Crotapotina		-38	SA	-32	SA
Crotamina	100 a 12,5	9	SA	25,2	SA
Convulxina		-30	SA	-36	SA
PLA ₂ - CB		-21	SA	47	SA
PLA ₂ - IC		-16	SA	15	SA

ND: Não determinado devido ao valor de inibição da infecção viral ter sido inferior a 50%. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/μL.

4.2.2.5 Virucida

No ensaio virucida, os vírus foram tratados por 1h antes da infecção celular com diluições duplas seriadas das toxinas isoladas iniciando a partir da CC₅₀ de cada um delas (Tabela 9).

Tabela 9: Avaliação da atividade virucida das toxinas isoladas contra o YFV e DENV-2 em células VERO E6.

Material teste	CC ₅₀ (ng/uL)	*Concentrações testadas (ng/uL)	YFV			DENV-2		
			% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/uL)	IS	% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP	IS
Crotoxina	>500	100 a 0,01	100	0,00045 ± 0,00007	1111111	100	0,001± 0,0003	500000
Crotapotina	>500	100 a 12,5	100	66±29	7,8	100	0,82± 0,08	610
Crotamina	>500	100 a 12,5	14,34	SA	SA	33	SA	SA
Convulxina	>500	100 a 12,5	25,5	SA	SA	32	SA	SA
PLA ₂ - CB	>500	100 a 0,01	100	0,0047± 0,002	106382	100	0,00003± 0,000003	16666666
PLA ₂ - IC	>500	100 a 0,01	100	0,0054± 0,0017	92592	100	0,014± 0,005	35714

ND: Não determinado devido ao valor de inibição da infecção viral ter sido inferior a 50%. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/ μ L.

Crotoxina, crotapotina, PLA₂-CB e PLA₂-IC mostraram atividade antiviral, sendo que crotoxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC apresentaram IS extremamente altos quando comparados com os IS obtidos para os outros materiais teste.

Os resultados obtidos no teste virucida foram similares àqueles observados no ensaio de pré-tratamento, mostrando novamente que a crotoxina e a PLA₂-CB possuem potente atividade antiviral.

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PEÇONHA BRUTA E TOXINAS ISOLADAS DE *Crotallus durissus terrificus* NAS FASES INICIAIS DO CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

Analisando os resultados anteriores, foi possível observar que a peçonha bruta, a crotoxina, a PLA₂-CB e a PLA₂-IC, isoladas de *Crotallus durissus terrificus* apresentam uma alta ação antiviral nos ensaios virucida e de pré-tratamento, o que caracteriza uma ação antiviral nas fases iniciais do ciclo de replicação viral. Para investigar essa hipótese, ensaios que avaliam a capacidade destes materiais teste de inibirem a adsorção e/ou a internalização viral, passos iniciais do ciclo de replicação viral, foram realizados. Nestes ensaios também foram incluídas as outras toxinas isoladas de *Crotallus durissus terrificus* (crotamina, crotapotina e convulxina).

4.3.1 ADSORÇÃO

As peçonhas brutas e toxinas isoladas de *Crotallus durissus terrificus* foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir a adsorção dos vírus às células VERO E6. Para isso, células VERO E6 incubadas a 4 °C foram tratadas com os materiais teste e infectadas ao mesmo tempo. Posteriormente, as células foram incubadas a 37°C por 120h e após isso, foram calculados os valores de CE₅₀ e IS para cada material teste (Tabela 10).

Tabela 10: CE₅₀ e IS dos materiais teste na adsorção do YFV e DENV-2 em células VERO E6.

Material teste	CC ₅₀ (ng/uL)	*Concentrações testadas (ng/uL)	YFV			DENV-2		
			% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP	IS	% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP	IS
<i>Cdt Amarelo</i>	>500	100 a 0,01	100	0,037 ± 0,005	13553,50	100	0,07262 ± 0,005	6885
<i>Cdt Branco</i>	>500	100 a 0,01	100	0,03608 ± 0,004	13858	100	0,0174 ± 0,003	28735
<i>Crotoxina</i>	>500	100 a 0,01	100	0,0365 ± 0,004	13698	100	0,018 ± 0,002	27777
<i>Crotapotina</i>	>500	100 a 12,5	90	13,1 ± 0,12	38	70	53±17	9,4
<i>Crotamina</i>	>500	100 a 12,5	66	33,7 ± 4,2	14,8	8	SA	SA
<i>Convulxina</i>	>500	100 a 12,5	66	59,3 ± 4,3	8,4	12,6	SA	SA
<i>PLA₂-CB</i>	>500	100 a 0,01	100	0,016 ± 0,004	31250	100	0,044 ± 0,007	11363
<i>PLA₂-IC</i>	>500	100 a 0,01	100	0,268 ± 0,04	1865	100	0,133 ± 0,03	3759

ND: Não determinado devido ao valor de inibição da infecção viral ter sido inferior a 50%. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/uL.

As peçonhas brutas de Cdt amarela e branca e as toxinas isoladas crotoxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC, apresentaram altos índices de seletividade da infecção viral tanto para YFV quanto para DENV-2. Já as toxinas isoladas crotamina, convulxina e não inibiram a replicação de DENV-2, mas inibiram a replicação de YFV, mostrando IS que variaram entre 8,4 e 26.

4.3.2 INTERNALIZAÇÃO

Para avaliar a ação das peçonhas brutas e toxinas isoladas de *Crotallus durissus terrificus* na internalização viral, células VERO E6 foram incubadas a 4 °C e posteriormente infectadas. Após 2h, o sobrenadante foi removido e a monocamada celular lavado e tratado com concentrações iguais e inferiores a CC₅₀ de cada material teste. Os valores de CE₅₀ e IS foram calculados conforme descrito anteriormente (Tabela 11).

Tabela 11: CE₅₀ e IS dos materiais teste na internalização de YFV e DENV-2 em células VERO E6.

Material teste	CC ₅₀ (ng/uL)	*Concentrações testadas (ng/uL)	YFV			DENV-2		
			% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP	IS	% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP	IS
<i>Cdt Amarelo</i>	>500	100 a 0,01	76	28,7 ± 3,3	17	85	27,7 ± 3,8	18
<i>Cdt Branco</i>	>500	100 a 0,01	67	40,6 ± 0,6	12	73	53,9 ± 1,4	9,3
<i>Crotoxina</i>	>500	100 a 0,01	83	13,7 ± 1,05	36	77	34,4 ± 2,7	14,5
<i>Crotapotina</i>	>500	100 a 12,5	56	69,9 ± 5,5	7,2	41	SA	SA
<i>Crotamina</i>	>500	100 a 12,5	32	SA	SA	46	SA	SA
<i>Convulxina</i>	>500	100 a 12,5	- 70	SA	SA	2,6	SA	SA
<i>PLA₂- CB</i>	>500	100 a 0,01	95	3,3 ± 1,05	153	89	17,2 ± 3,3	29
<i>PLA₂- IC</i>	>500	100 a 0,01	46	SA	SA	76	21,5 ± 3,4	23

ND: Não determinado devido ao valor de inibição da infecção viral ter sido inferior a 50%. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/uL.

As peçonhas brutas de Cdt (amarelo e branco) demonstraram potencial ação na internalização de YFV e DENV-2 (IS=17 e 18 para a peçonha amarela e 12 e 9,3 para a branca - YFV e DENV-2, respectivamente). A crotoxina também inibiu a internalização de YFV e DENV-2 (IS=36 e 13, respectivamente). A convulxina, curiosamente, estimulou a infecção viral em 70% de YFV e inibiu apenas 2,26% a infecção de DENV-2.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA FOSFOLIPASE NA AÇÃO ANTIVIRAL

Analisando os resultados obtidos nos experimentos anteriores é possível observar que as peçonhas brutas, a crotoxina, a PLA₂-CB e a PLA₂-IC apresentaram alta atividade antiviral quando comparados as outras toxinas. Com o objetivo de avaliar se a ação antiviral dessas toxinas pode estar relacionada com a

atividade catalítica da fosfolipase, foram realizados ensaios antivirais incluindo a BthTX-I, uma fosfolipase sem atividade catalítica, isolada da peçonha de *B. Jararacussu*, analisando todas as estratégias metodológicas citadas anteriormente contra YFV, DENV-1, DENV-2 e DENV-4.

4.4.1 Pré-tratamento

Células VERO E6 foram tratadas por 3h com crotoxina, PLA₂-CB e BthTx-1. Posteriormente, as células foram infectadas com DENV-1, DENV-2, DENV-4 ou YFV (Tabela 12).

Tabela 12: CE₅₀ e IS da crotoxina, PLA₂-CB e BthTx-1 contra DENV-1, DENV-2, DENV-4 e YFV no pré-tratamento de células VERO E6.

Material teste	CC ₅₀ (ng/uL)	*Conc. testadas (ng/uL)	DENV-1			DENV-4		
			% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	IS	% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	IS
Crotoxina	>500	100 a 0,01	100	0,10±0,009	5128	100	0,12±0,02	4042
PLA ₂ -CB	>500		100	0,16±0,04	3198	100	0,26±0,04	1940
BthTx-1	108,6		14,5	SA	SA	29,7	SA	SA
		100 a 3,1		DENV-2			YFV	
BthTx-1	108,6		9,2	SA	SA	ND	ND	ND

ND: Não determinado devido ao valor de inibição da infecção viral ter sido inferior a 50%. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/μL.

A crotoxina e a PLA₂-CB apresentaram altos IS para DENV-1 e DENV-4. A crotoxina e a PLA₂-CB já haviam apresentado anteriormente altos IS para YFV e DENV-2 (Tabela 5). No entanto, BthTx-I apresentou apenas 14,5% de inibição da infecção viral contra DENV-1, 9,2 contra DENV-2 e 29,7%, contra DENV-4, não sendo possível o cálculo de CE₅₀ nem de IS.

4.4.2 Pós-tratamento

Embora nenhum material teste tenha apresentado atividade antiviral quando avaliado utilizando a estratégia de pós-tratamento contra YFV e DENV-2, as toxinas isoladas rotoxina, PLA₂-CB e BthTx-1 foram avaliadas também contra os vírus DENV-1 e DENV-4. A BthTX-I foi também avaliada contra YFV e DENV-2 (Tabela 13). Nenhuma das toxinas testadas mostrou atividade antiviral.

Tabela 13: CE₅₀ e IS da crotoxina, PLA₂-CB e BthTX-I contra DENV-1, DENV-2, DENV-4 e YFV no pós-tratamento de células VERO E6.

Material teste	CC ₅₀ (ng/uL)	*Conc. testadas (ng/uL)	DENV-1		DENV-4	
			% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)
Crotoxina	>500	100 a 0,01	32	SA	9	SA
PLA ₂ - CB	>500		34	SA	13	SA
BthTx-1	108,64		26	SA	6	SA
		100 a 3,125	DENV-2		YFV	
BthTx-1	108,64		11	SA	ND	ND

ND: Não determinado devido ao valor de inibição da infecção viral ter sido inferior a 50%. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/μL.

4.4.3 Virucida

Para avaliação da atividade virucida, a crotoxina, PLA₂-CB e BthTX-I foram incubadas com DENV-1, DENV-2, DENV-4 ou YFV por 1h e posteriormente adicionadas a monocamada celular (Tabela 14).

Tabela 14: CE₅₀ e IS da crotoxina, PLA₂-CB e BthTx-I contra DENV-1, DENV-2, DENV-4 e YFV no tratamento virucida em células VERO E6.

Material teste	CC ₅₀ (ng/uL)	*Concentrações testadas (ng/uL)	DENV-1			DENV-4		
			% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	IS	% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	IS
Crotoxina	>500	100 a 0,000001	100	0,004 ± 0,0003	122910	100	0,005±0,0001	93445
PLA ₂ -CB	>500		100	0,00002 ± 0,0000003	33105347	100	0,0005 ± 0,00005	976562
BthTx-1	DENV-1 107,6	100 a 3,125	14,5	6,2 ± 0,7	17,36	100	7,3 ± 0,2	14,8
				DENV-2			YFV	
BthTx-1	Demais virus 108,64		9,2	SA	SA	100	7,063±0,252	15,4

ND: Não determinado devido ao valor de inibição da infecção viral ter sido inferior a 50%. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/μL.

Crotoxina e PLA₂-CB apresentaram altos IS contra DENV-1 e DENV-4. Essas toxinas já haviam apresentado ação antiviral contra YFV e DENV-2 (Tabela 7). BthTX-I inibiu a replicação de DENV-1, DENV-4 e YFV, apresentando IS significativamente inferiores aos observados com crotoxina e PLA₂-CB.

4.4.4 Adsorção e Internalização

Os ensaios de avaliação da ação de BthTX-I na adsorção e internalização de YFV e DENV-2 são demonstrados na Tabela 15.

Tabela 15: CE₅₀ e IS de BthTX-I contra os vírus YFV e DENV-2 na adsorção e na internalização dos vírus à células VERO E6.

Material teste	CC ₅₀ (ng/uL)	*Conc. testadas (ng/uL)	YFV			DENV-2		
			% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	IS (CC ₅₀ /CE ₅₀)	% de inibição da máxima concentração utilizada	CE ₅₀ ±DP (ng/μL)	IS (CC ₅₀ /CE ₅₀)
Adsorção	108,6	100 a 0,01	77%	25±3,6	4,3	79%	57,3 ± 0,8	1,89
Internalização	108,6		78%	23,4±1,8	4,6	64%	69,0 ± 5,3	1,57

ND: Não determinado devido ao valor de inibição da infecção viral ter sido inferior a 50%. DP= Desvio Padrão. * Para os materiais teste que não apresentaram citotoxicidade a pelo menos 50% da monocamada celular foi utilizada a concentração máxima de 100 ng/μL.

A toxina BthTX-I apresentou inibição da infecção de YFV e DENV-2 tanto na adsorção quanto na internalização viral. No entanto, esses resultados são inferiores aos obtidos com a crotoxina e PLA₂-CB (Tabelas 8 e 9).

4.5 TOXINAS ISOLADAS DE *B. jararacussu*, *B. jararaca*, *Tytius serrulatus* e fração de baixo peso de *Rhinella schneideri*

Também foi realizada a avaliação da atividade antiviral das frações de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, da TsTX-1 e TsTx-6, isoladas de *Tytius serrulatus* e da fração de baixo peso de *Rhinella schneideri*. Essas frações e toxinas estavam disponíveis em pequenas quantidades e por este motivo não foram testadas em todas as estratégias metodológicas. Nenhum destes materiais teste apresentaram atividade antiviral em nenhuma das estratégia testadas e contra nenhum vírus dos utilizados (dados não mostrados).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos descrevem a utilização de substâncias naturais ou sintéticas como potenciais agentes contra YFV ou DENV em ensaios *in vitro* e *in vivo* (BENARROCH et al., 2004; POH et al., 2009; TALARICO et al., 2005; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2009). Entretanto, atualmente não existe nenhum fármaco disponível no mercado para tratamento dessas viroses. Devido a este fator e aos altos índices de pessoas infectadas pela febre amarela ou pela dengue, principalmente em países subdesenvolvidos, é de extrema necessidade o desenvolvimento de novos fármacos que combatam essas viroses.

Peçonhas de serpentes e escorpião e venenos de sapos são misturas complexas de proteínas e polipeptídeos ativos farmacologicamente. Essas peçonhas são de interesse biológico devido à sua diversidade e aos seus efeitos fisiológicos e farmacológicos seletivos através de interação com vários alvos moleculares (VARANDA, GIANNINNI, 1994). Alguns trabalhos mostram a atividade antiviral de peçonhas, venenos e toxinas isoladas. Dentre esses, os trabalhos publicados por Borkow e colaboradores, que em 1992 mostraram a inibição do vírus Sendai por várias peçonhas de serpentes e em 1999 demonstraram a ação de toxinas, que apresentaram citotoxicidade específica às células infectadas pelo vírus. Fernand et al. (1999), demonstraram que PLA₂ inibe a liberação intracelular da proteína do capsídeo viral do HIV-1. Petricevich e Mendonça (2003), mostrando que o veneno de *Crotalus durissus terrificus* inibe a adsorção do vírus do sarampo às células VERO. Outro trabalho, publicado por Yu Zhao et al. (2005), mostrou o potencial inibitório da proteína BAS-AH isolada da pele do sapo *Bufo andrewsi* (BAS-AH) contra o vírus HIV-1 em células C8166.

Neste estudo avaliamos a potencial atividade antiviral de peçonhas e toxinas isoladas de serpentes e escorpião, assim como uma fração de veneno de sapo contra os vírus da dengue e da febre amarela. Foram utilizadas diferentes estratégias metodológicas, as quais objetivaram o estudo da ação dos materiais teste em diferentes fases do ciclo de replicação viral. Os resultados obtidos mostraram que varios materiais teste analisados possuem potencial antiviral.

Para a avaliação da potencial ação antiviral de um composto qualquer, é indispensável avaliação prévia de sua possível toxicidade em relação às células permissivas ao vírus em estudo (citotoxicidade), pois um agente antiviral ideal deve inibir o ciclo de replicação viral, interferindo o mínimo na estrutura e metabolismo das células hospedeiras (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986). A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que provoca uma série de modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas (NARDONE et al., 1977). A intensidade da lesão celular depende de vários fatores, tais como a concentração do material testado, o tempo de exposição, linhagem celular, a capacidade da amostra em penetrar na célula, entre outras (HU; HSIUNG, 1989). Além disso, a citotoxicidade pode ser evidenciada por alterações na síntese de proteínas, na atividade lisossomal, na atividade mitocondrial, entre outras (KORZENIEWSKI; CALLEWAERT, 1983). De uma forma geral, as peçonhas brutas apresentaram maior citotoxicidade às células VERO E6 do que frações ou toxinas isoladas. As peçonhas brutas de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. fonseca*, *B. moojeni*, *B. pirajai* e *B. brasili* apresentaram concentrações citotóxicas que variaram de 64,3 a 0,428 ng/μL. A peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt), não apresentou citotoxicidade a 50% da monocamada celular quando testada até 500 ng/μL. A maior citotoxicidade das peçonhas brutas, quando comparadas com as frações e compostos isolados pode ser justificada pelo fato das peçonhas da maioria das serpentes serem constituídas por inúmeras toxinas em concentrações variadas, as quais incluem: neurotoxinas, citotoxinas, cardiotoxinas, proteínas que agem na hemostasia (proteases), peptídeos (desintegrinas, peptídeos potenciadores da bradicinina/inibidores da enzima conversora de angiotensina), oxidases (L-aminoácido oxidase), hialuronidases e lectinas. Provavelmente por este motivo foi observado uma maior citotoxicidade nas peçonhas brutas (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000). Há vários trabalhos que relatam a variabilidade na composição e nas atividades biológicas das peçonhas de serpente, as quais podem ser observadas em níveis de variações interfamiliares, intergenéricas, inter-espécies, intra-espécies, geográficas, sazonais e sexuais (Mendonza et al., 1992, Moura da Silva, 1992). A

diferença de citotoxicidade entre a peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e as demais peçonhas brutas, poderia estar relacionada ao fato delas pertencerem a gêneros diferentes; *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. fonseca*, *B. moojeni*, *B. pirajai* e *B. brasili* pertencem ao gênero *Bothrops*, e a *Crotallus durissus terrificus* pertence ao gênero *Crotalus* da família *Crotalidae*. Essas variações também podem estar relacionadas ao tipo de dieta de uma determinada espécie, visto que uma das principais funções das peçonhas é a captura e morte das presas (Gans e Eliot, 1968; Daltry et al., 1996).

No presente trabalho, a citotoxicidade da peçonha bruta de *Crotallus durissus terrificus* foi de aproximadamente de 20% na concentração de 500ng/μL, ou seja, apresentou baixa citotoxicidade. Mendonça e Petricevich (2003), também avaliaram a citotoxicidade da peçonha bruta de *Crotallus durissus terrificus* e verificaram 23,5% de citotoxicidade em células VERO na concentração de 100 ng/μL. Embora exista uma pequena diferença entre os resultados obtidos (a qual pode ser justificada por diferenças metodológicas ou pela diferença natural existente entre a origem das serpentes e dos lotes de peçonhas testadas), os mesmos coincidem, apresentando baixa citotoxicidade da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* em células VERO.

A avaliação da atividade antiviral dos materiais teste foi realizada pela técnica das placas de lise, onde se avaliou a redução do número de placas na monocamada celular após o tratamento com os materiais testes. Apenas variando o momento da infecção celular e a temperatura de trabalho, é possível iniciar a elucidação do mecanismo de ação dos materiais testados, comparando-se os índices de seletividade obtidos. O ensaio de pré-tratamento foi realizado com o objetivo de identificar se os materiais teste conferem resistência à célula contra a infecção viral, enquanto que o ensaio do pós-tratamento foi para detectar se os materiais teste apresentam ação antiviral após a infecção celular, e o ensaio virucida foi realizado para verificar se as amostras teste apresentam ação direta sobre a partícula viral.

Neste trabalho, observamos que as peçonhas brutas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* apresentaram atividade antiviral nas estratégias de pré-tratamento e virucida contra o YFV e/ou DENV-2, enquanto a peçonha bruta de *B. jararaca*, *B. pirajai* e *Tityus serrulatus* não apresentaram ação

antiviral. Esta diferença pode estar relacionada com a composição química das peçonhas brutas dessas serpentes. Carballar-Lejarazú et al., (2008) mostraram que Scorpine recombinante, um recombinante do peptídeo isolado da peçonha do escorpião *Pandimus imperator*, inibe a replicação de DENV-2 em células C6/36. Além disso, Yan et al., (2010), mostraram que Hp1090, um peptídeo α -hélice isolado do escorpião *Heterometrus petersii*, apresenta ação virucida contra o vírus da hepatite C. No entanto, no presente trabalho não foi possível observar ação antiviral da peçonha de *Tityus serrulatus* contra os vírus DENV e febre amarela. Avaliamos também TsTx-1 e TsTx-6 (dados não mostrados), isolados da peçonha de *Tityus serrulatus*, mas ambas toxinas isoladas também não apresentaram ação contra os vírus DENV e febre amarela em nenhuma das estratégias antivirais utilizadas. Existem grandes variações na toxicidade das peçonhas das diferentes espécies de escorpiões. O efeito tóxico da peçonha dos escorpiões é função de alguns fatores, como a espécie do escorpião e o estado fisiológico das glândulas de veneno (HOFFMANN, 1938). As peçonhas aqui testadas são de gêneros diferentes dos escorpiões dos trabalhos anteriores, o que justifica os diferentes resultados encontrados.

As peçonhas de *B. jararacussu* e de *B. moojeni* apresentaram inibição da infecção viral, no entanto, essa inibição foi de 100 a 1000 vezes menor que a observada nas peçonhas brutas de *Crotalus durissus terrificus*. Foram também realizados ensaios de avaliação virucida com as frações II, III, IV e V de *B. jararacussu* (dados não mostrados), no entanto, embora algumas dessas frações tenham apresentado ação antiviral, essa inibição foi inferior as observadas com as toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus*. Não foi realizado nenhum ensaio antiviral com frações e/ou toxina isolada peçonha bruta de *B. moojeni*. Devido a necessidade de um maior enfoque a uma peçonha disponível em quantidades suficientes para realização de todos os ensaios, e que ao mesmo tempo apresentasse promissora inibição da infecção viral, optou-se continuar este estudo com as toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus*. No entanto, é importante ressaltar que as peçonhas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* também apresentam potencial ação antiviral. Desta forma, estudos posteriores podem explorar a ação antiviral dessas peçonhas .

Dentre as peçonhas brutas de serpente, as que apresentaram maior IS foram as da serpente *Crotalus durissus terrificus* (amarela e branca). Desta forma, as toxinas isoladas desta peçonha (convulxina, crotoxina, PLA₂-IC, PLA₂-CB, crotamina e crotapotina) foram submetidas à avaliação da atividade antiviral nas estratégias de pré-tratamento, pós-tratamento e ensaio virucida. Crotoxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC apresentaram inibição da replicação de YFV e DENV-2 nos ensaios de pré-tratamento e virucida. Nenhuma das toxinas testadas apresentou ação antiviral no ensaio de pós-tratamento. Tanto as peçonhas brutas (amarela e branca) quanto as toxinas isoladas crotoxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC apresentaram alta ação antiviral nos ensaios de pré-tratamento e virucida, ou seja, nas fases iniciais do ciclo de replicação viral. Para melhor caracterizar em que fase inicial do ciclo de replicação viral essas toxinas estão agindo, foram analisadas as estratégias de inibição da adsorção e de inibição da internalização de YFV e DENV-2 nas células VERO E6. As peçonhas brutas, a crotoxina, a PLA₂-CB e a PLA₂-IC inibiram a infecção de YFV e DENV-2 em ambas as estratégias metodológicas, entretanto no ensaio de adsorção os materiais testes apresentaram IS de 100 a 1000 vezes superiores aos obtidos no ensaio de Internalização. A crotoxina é o componente mais tóxico isolado da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*; sendo um complexo protéico reversível composto por um polipeptídeo ácido não tóxico e sem atividade enzimática (crotapotina) e um componente básico, responsável pela toxicidade do complexo, a PLA₂-CB (LANDUCCI, 1992; BREITHAUPT, 1976; CHOUMET, *et al.*, 1996; NEVALAINEN *et al.*, 2008). Sendo assim, os resultados obtidos sugerem que o efeito antiviral está associado às fosfolipases presentes na peçonha de *Crotalus durissus terrificus*.

As PLA₂s são enzimas comumente encontradas em uma variedade de fluídos biológicos e células, como a saliva, líquidos sinoviais, macrófagos, plaquetas, pâncreas, baço, músculo liso, placenta e peçonhas de serpentes, abelhas e escorpião. Sendo que, entre as serpentes, os venenos da família *Viperidae*, sub-família *Crotalinae*, que inclui os gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, possui uma alta atividade de PLA₂ (BARRAVIEIRA, 1994; KINI, 2003). As fosfolipases desempenham papéis importantes no catabolismo de lipídeos da dieta e no metabolismo geral de lipídeos estruturais das membranas celulares; onde catalisam

a hidrólise especificamente na ligação 2-acil éster de fosfolipídios, liberando como produtos os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres (LOMONTE et al., 2003; CHIOATO, WARD, 2003). Moléculas que agem especificamente na fase inicial (adsorção e internalização) da interação dos vírus à célula hospedeira, podem representar a primeira barreira contra a infecção. Essa inibição pode ocorrer por interferência com a molécula viral que se liga ao receptor cognato ou com seu próprio receptor. Entretanto, até o momento, pouco é sabido sobre os passos iniciais do ciclo de replicação dos flavivírus (LEYSEN, et al., 2008). Os dados encontrados neste trabalho nos permitem sugerir dois prováveis mecanismos de ação dessas fosfolipases: (i) ação das fosfolipases A₂ diretamente sobre a partícula viral, visto que altos índices de inibição foram observados no ensaio virucida; (ii) ação das fosfolipases sobre receptores celulares, visto que as células previamente tratadas se tornaram resistentes à infecção viral. Além disso, no ensaio virucida as toxinas podem agir também sobre receptores virais, e não só sobre o vírus.

O envelope viral é composto por uma bicamada lipídica derivada da membrana do retículo endoplasmático da célula hospedeira e as PLA₂ catalisam a hidrólise de fosfolipídios de membrana, dessa forma, a ação antiviral observada pode ser atribuída a ação direta das fosfolipases sobre o envelope viral. Estes dados coincidem com os da literatura, como o trabalho de Grönroos et al., (2001), que descreveram a ação antibacteriana de sPLA₂s recombinantes capazes de destruir bactérias gram-positivas degradando as membranas celulares bacterianas. Samy et al. (2010), também descreve a atividade antibacteriana de EcTx-I, uma PLA₂ isolada da peçonha da serpente *Echis carinatus*, que causa danos a membrana das bactérias.

Petrichevich e Mendonça (2003), avaliaram a ação antiviral da peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* sobre o vírus do sarampo. Nesse estudo eles observaram que esta peçonha inibiu a ligação do vírus as células, sugerindo que a peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus* pode interagir com os receptores celulares para bloquear a adsorção do vírus. Resultados que se assemelham aos observados no presente trabalho.

A ação das PLA₂s sobre outros vírus encontra-se descrita na literatura, o que valida ainda mais os resultados encontrados. Mitsuishi e colaboradores (2006),

descrevem a supressão da amplificação de adenovírus em células Hek 293A devido à adição de sPLA₂s humanas recombinantes na cultura. Outro trabalho, Fenard et al. (1999), mostrou que uma sPLA₂ isolada da peçonha de abelha inibe a entrada e consequentemente a replicação de HIV-1 em células mononucleares do sangue periférico através de um mecanismo vinculado a ligação da sPLA₂ as células. Entretanto, até agora, pouco se sabe sobre os efeitos das sPLA₂s de mamíferos sobre a infecção viral nas células hospedeiras.

O estudo da interação entre um vírus e seu receptor pode fornecer informações importantes sobre a patogênese da infecção viral e pode também fornecer alvos para desenhar fármacos que impeçam a infecção. A maioria dos compostos terapêuticos antivirais disponíveis bloqueiam o processo de replicação compartilhado pelo vírus e células alvo infectadas e, portanto, são tóxicos, mutagênicos e / ou teratogênico e pode, potencialmente, induzir cepas virais resistentes aos medicamentos. Portanto, a identificação de novos compostos antivirais, particularmente aqueles com novos mecanismos de ação, é de extrema importância (PETRICEVICH, MENDONÇA, 2003).

As fosfolipases A₂ representam uma classe de enzimas versáteis, considerando suas funções, localizações, regulações, mecanismo de ação, sequências e estruturas. Podem ser divididas em cinco grupos principais: PLA₂ secretórias (sPLA₂), citosólicas (cPLA₂), Ca²⁺ independentes, acetilhidrolases fator de agregação plaquetária (PAF-AH) e as lisossômicas, divididas de acordo com o mecanismo catalítico e suas características funcionais e estruturais. As PLA₂ secretórias foram subdivididas em dezessete grupos, de acordo com o número de resíduos de aminoácidos e posição das ligações dissulfeto, sendo que as PLA₂ das peçonhas de serpentes estão incluídas nos grupos I e II entre as secretórias (SCHALOSKE, DENNIS, 2006; VALENTIN, LAMBEAU, 2000; FERREIRA et al. 2008).

Para as PLA₂ que constituem o grupo II, o íon Ca²⁺, um cofator essencial, e um resíduo de aspartato (Asp) na posição 49 são requeridos para a catálise de substratos artificiais (PLA₂ Asp49). As fosfolipases que possuem uma lisina substituta na posição 49 (PLA₂ Lys49) apresentam muito baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos fosfolípidos artificiais (*in vitro*). Sendo essa a

diferença entre as PLA₂-CB/-IC e a BthTX-I, que são PLA₂ Asp49 e PLA₂ Lys49, respectivamente. Diferença essa que explica a baixa atividade antiviral da fosfolipase A₂ BthTX-I quando comparada as PLA₂-CB/-IC (LOMONTE et al., 2003; CHIOATO, WARD, 2003).

A atividade enzimática das PLA₂ pode ser influenciada por alguns fatores como a especificidade pelo substrato, a presença de diferentes classes de fosfolipídios na região do sítio catalítico e o poder de penetração, em que uma PLA₂ com maior penetração causa um dano mais significativo nos tecidos (KINI, 2003). Fato que possivelmente explica a diferença encontrada na ação antiviral das fosfolipases cataliticamente ativas, a PLA₂-CB e a PLA₂-IC. Desta forma, podemos sugerir que a atividade catalítica da fosfolipase é importante, mas provavelmente não o único responsável pela ação antiviral.

Com os ensaios antivirais realizados foi possível verificar o alto potencial inibitório de fosfolipases isoladas de *Crotalus durissus terrificus*, as quais apresentam ação nas fases iniciais do ciclo de replicação viral, agindo provavelmente de forma simultânea, sobre a partícula viral e sobre os receptores celulares. Esse potencial inibitório pode estar relacionado também a atividade catalítica das fosfolipases.

Os altos índices de seletividade obtidos neste trabalho abrem portas para futuras investigações, visto que não foi possível explorar o mecanismo de ação pelo qual as fosfolipases estão agindo. Além disso, a ação dessas fosfolipases podem ser utilizadas como ferramentas para o estudo do mecanismo de replicação viral.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

1. As peçonhas brutas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* (branco e amarelo), apresentaram inibição da infecção viral nos ensaios de pré-tratamento e virucida. Porém, as peçonhas brutas (branca e amarela) de *Crotalus durissus terrificus* apresentaram inibição da replicação viral 100 a 1000 vezes maior que as peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni*.
2. Dentre as toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus*, as que apresentaram maior ação antiviral foram a crotoxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC, sugerindo que a ação antiviral é devido às fosfolipases.
3. As peçonhas brutas de *Crotalus durissus terrificus* (amarela e branca), crotoxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC apresentaram ação nas fases iniciais do ciclo de replicação viral.
4. As peçonhas brutas de *Crotalus durissus terrificus*, crotoxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC apresentaram inibição da adsorção viral 100 a 1000 vezes maior do que no ensaio de internalização.
5. A peçonha bruta de *Crotalus durissus terrificus*, crotoxina, PLA₂-CB e PLA₂-IC estariam agindo sobre a partícula viral e sobre os receptores celulares.
6. A atividade catalítica das fosfolipases pode estar relacionada à alta ação antiviral, mas não parece ser o único fator para que esta atividade esteja presente.

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS

- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, H.; CUPO, P. Acidente crotálico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE C. M. S.; HADDA JR., V. (Eds.). **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier/FAPESP, 2003. p. 91-107.
- BARBA-SPAETH, G. et al. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. **J. Exp. Med.**, v. 202, n. 9, p. 1179-1184, 2005.
- BARNETT, A. D. Yellow fever: epidemiology and prevention. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, n. 6, p. 850-856, 2007.
- BARRAVIEIRA, B. Venenos animais: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Ed. De Publicações Científicas. 1994.
- BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annu. Rev. Entomol.** v. 52, p. 209-229, 2007.
- BARRETT, A. D.; MONATH, T. P. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. **Adv. Virus Res.**, v. 61, p. 291-315, 2003.
- BREITHAUPT, H. Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A₂ and the crotoxin complex. **Toxicon**, v. 14, p. 221-233, 1976.
- BENARROCH, D. et al. A structural basis for the inhibition of the NS5 dengue virus mRNA 2'-O-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 34, p. 35638-35643, 2004.
- BERCOVICI, D. A. Systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 49, n. 3, p. 69-78, 1987.
- BETTEGA, J. M. R. et al. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. **Phytother. Res.**, v. 18, p. 819-823, 2004.
- BLAIR, P. J. et al. Evaluation of immunity and protective efficacy of a dengue-3 premembrane and envelope DNA vaccine in *Aotus nancymae* monkeys. **Vaccine**, v. 24, p. 1427-1432, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF: Centro de documentação do Ministério da Saúde, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Programa Nacional de Controle da Dengue**. Brasília, DF, 2002. Disponível em: <<http://www.funasa.gov.br/epi/dengue/dengue0.htm>>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 7. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde. 2008a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010a. **Isolamento do sorotipo DENV 4 em Roraima / Brasil**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_denv_5_revisada_23_08_2010.pdf>. Acesso em: 26 de agosto de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010b. **Informe Epidemiológico da Dengue: Análise de situação e tendências - 2010**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_se_26_final_11_8_10.pdf> Acesso em: 26 de agosto de 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010c. **NOTA TÉCNICA N.º 118/2010 CGPNCD/DEVEP/SVS/MS**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_aval_vul_epid_dengue_verao_10_11.pdf. Acesso em: 3 de fevereiro de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre amarela**. 2008b. Disponível em: <<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/febreamarela/index.php>>. Acesso em: 25 jan. 2010.

BRINTON, M.A., Host factors involved in West Nile virus replication. *Ann N Y., Acad Sci.* v. 951, p. 207–219, 2001.

BRONZONI, R.V.M., BALEOTTI, F.G., NOGUEIRA, R.M.R., NUNES, M. Duplex reverse transcription-PCR followed by Nested PCR assays for detection and identification of Brazilian *Alphaviruses* and *Flaviviruses*. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 696-702, 2005.

BURKE, D. S. et al. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am. J. Trop. Med.*, v. 38, p. 172-180, 1988.

BURLENSON, F. G.; CHAMBERTS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. *Virology: a laboratory manual*. San Diego: Academic. 1992.

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

CHEN, Y. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.*, v. 3, n. 8, p. 866-871, 1997.

CHIOATO, L., WARD, R. J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. *Toxicon*, v. 42, n.8, p. 869-83, 2003.

CLARO, L. B. L.; TOMASSINI, H. C. B.; ROSA, M. L. G. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 20, n. 6, p. 1447-1457, 2004.

DAMONTE, E. B. Dengue: Um viejo y nuevo desafio para la quimioterapia antiviral. *Quím. Viva*, v. 5, n. 2, 2006.

COSTA, L. A.; FORNARI, M. C.; BERARDI, V. E.; MILES, H. A. & DIEZ, R. A. In vivo effect of snake phospholipase A₂ (crotoxin+cardiotoxin) on serum IL-1alpha, TNF-alpha and IL-1ra level in humans. *Immunol. Lett.*, v. 75, n.2, p.:137-41, 2001.

DAMONTE, E. B.; PUJOL, C. A.; COTO, C. E. Prospects for the therapy and prevention of dengue virus infections. *Adv. Virus Res.*, v. 63, p. 239-285, 2004.

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

DE CLERCQ, E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 8, p. 552–560, 2005a.

DE CLERCQ, E. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. *Antiviral Res.*, v. 67, p. 56–75, 2005b.

DE CLERCQ, E. In search of a selective therapy of viral infections. **Antiviral Res.**, v. 85, p. 19–24, 2010.

8

- 9 DIAMOND, M. S.; ZACHARIAH, M.; HARRIS, E. Mycophenolic acid inhibits dengue virus infection by preventing replication of viral RNA. **Virology**, v. 304, n. 2, p. 211-221, 2002.

DOLEY, R., KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, p.2851-2871, 2009.

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

EGLOFF, M.P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J.L., Canard, B., An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. **EMBO J.** v. 21, p. 2757–2768., 2002.

FALGOUT, B., PETHEL, M., ZHANG, Y.M., LAI, C.J., Both nonstructural proteins NS2b and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **J. Virol.** v.65, p. 2467–2475, 1991.

FENTON, W.S., HIBBELN, J., KNABLE, M. Essential fatty acids, lipid membrane abnormalities, and the diagnosis and treatment of Schizophrenia. **Biological Psychiatr.** v. 47, p. 8-21, 2000.

FENARD, D.; LAMBEAU, G.; VALENTIN, E.; LEFEBVRE, J.; LAZDUNSKI, M. DOGLIO, A. Secreted phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. **J Clin Invest**, v. 104, n. 5, p. 611-8, 1999.

FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318-328, 2009.

FERREIRA, F. B.; RODRIGUES, R. S.; CARDOSO, T., RODRIGUES, V. M. Caracterização química, enzimática e citotóxica de uma fosfolipase A₂ ácida isolada da peçonha de *Bothrops paulosensis*. **Horizonte Científico**, v. 01, p. 1-16, 2008.

FIELDS, B. N. **Fundamental virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 1998.

FIGUEIREDO, L. T. M. Febres Hemorrágicas por Vírus no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39(2), p. 203-210, 2006.

GRÖNROOS, J. O.; LAINE, V. J. O.; JANSSEN, M. J. W.; EGMOND, M. R., NEVALAINEN, T. J., Bactericidal Properties of Group IIA and Group V Phospholipases A₂. **J Immunol**, v. 166, p. 4029-4034, 2001.

GUBLER, D. J.. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch. Med. Res.**,v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GUBLER, D.; KUNO, G.; MARKOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott William &Wilkins, 2007. p. 1153-1253.

Gutiérrez, J.M.; Avila, C.; Rojas, E.; Cerdas, L. Alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**; v.26; p.411-413; 1988.

GWEE, M. C. E. et al. Studies on venom from the Black scorpion *Heterometrus longimanus* and some other scorpion species. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v. 15, p. 37-57, 1996.

HABERMANN, E., BREITHAUPT, H. Mini –review the crotoxin complex – an exemple of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v. 16, n. 1, p. 19-30, 1978.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, p. 476-481, 1988.

HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 68, p. 1560-1563, 1971.

HOUGHTON, P. J. Medicinal plants and the control of parasites: compounds with anti-HIV activity from plants. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, p. 601-604, 1996.

HU J.M.; HSIUNG G.D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v.11, p.217-232, 1989.

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

HUDSON, J. B., TOWERS, G. H N. Phytomedicines as antivirals. **Drugs Future** v. 24, p.295–320, 1999.

JAHN, R.; LANG, T.; SUDHOF, T. C. Membrane fusion. **Cell**, v. 112, p. 519–533, 2003.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por casacavel Sul Aericana (*Crotalus durissus*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 347-354, 1992.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827–840, 2003.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A., JEYASEELAN, K.. Snake venom Components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci.**,v. 63, p. 3030-3041, 2006.

KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D.M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v.64, p.313-320, 1983.

KRISHNAN, M. N. et al. Rab 5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. **J. Virol.**, v. 81, p. 4881-4885, 2007.

KROSCHEWSKI, H. et al. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus. **Virology**, v. 308, n. 1, p. 92-100, 2003.

KUDO, I., MURAKAMI, M. Phospholipase A2 enzymes. **Prostaglandins & others lipid Mediators**, v.68, p. 3-58, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of stuctural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**; v.227; p.680-685; 1970.

LEUNG, J.Y., PIJLMAN, G.P., KONDRATIEVA, N., HYDE, J., MACKENZIE, J.M., KHROMYKH, A.A., Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **J. Virol.** v. 82, p.4731–4741, 2008.

LEYSEN, P.; DE CLERCQ, E.; NEYTS, J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. **Antiviral Res.**, v. 78, p. 9–25, 2008.

LI, Z., KHALIQ, M. ZHOU, Z., POST, C.B., KUHN, R.J., CUSHMAN, M. Design, synthesis, and biological evaluation of antiviral agents targeting flavivirus envelope proteins, **J. Med. Chem.**, v.51, p.4660-4671, 2008.

- LINDENBACH, B.D., RICE, C.M., Trans-complementation of yellowfever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. **J. Virol.** v. 71, p. 9608–9617, 1997.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. R. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. v. 1, p. 991-1041.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv. Virus Res.** v. 59, p. 23-61, 2003.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Superinfection exclusion in cells infected with hepatitis C virus. **J. Virol.**, v. 81, n. 8, p. 3693-3703, 2007.
- LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J., RICE, C. M. *Flaviviridae* the virus and their replication. In: **Fields Virology**, Fifth Edition, D. M. , KNIPE and PM. Howley, p.1101-1152, 2007
- LIU, H.; CHIOU, S. S.; CHEN, W. J. Differential binding efficiency between the envelope protein of Japanese encephalitis virus variants and heparan sulfate on the cell surface. **J. Med. Virol.**, v. 72, p. 618–624, 2004.
- LOKE, H. et al. Strong HLA class I-restricted T cell responses in dengue hemorrhagic fever: a double-edged sword? **J. Infect. Dis.**, v. 184, p. 1369-73, 2001.
- LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y., CALDERÓN, L.. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p.885-901, 2003.
- LOZACH, P. Y. et al. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 23698–23708, 2005.
- MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nat. Med.**, p. S98-109, 2004.
- MATHEW, A. et al. Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. **J. Virol.**, v. 72, p. 3999-4004, 1998.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.
- MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 8, p. 869-872, 2002.
- MILLER, S., KASTNER, S., KRIJNSE-LOCKER, J., BUHLER, S., BARTENSCHLAGER, R., The nonstructural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **J. Biol. Chem.** v. 282, p. 8873–8882, 2007.
- MILLER, J. L. et al. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. **PLoS Pathog.**, v. 4, p. e17, 2008.
- MITSUISHI, M.; MASUDA, S.; KUDO, I. & MURAKAMI, M. Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells. **Biochem J**, v. 393, p. 97–106, 2006.
- MONATH, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 9, p. 2395-2400, 1994.
- MONATH, T. P. Yellow fever: an update. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, n. 1, p. 11-20, 2001.

- MONATH, T. P.; BURKE, D. S. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott William, Wilkins, 2001. cap. 33, p. 1043-1126.
- MONATH TP, LIU J, KANESA-THASAN N, MYERS GA, NICHOLS R, DEARY A, MCCARTHY K, JOHNSON C, ERMAKT, SHIN S, ARROYO J, GUIRAKHOO F, KENNEDY JS, ENNIS FA, GREEN S, BEDFORD P. A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2006.
- MORRISON, D.; LEGG, T.J.; BILLINGS, C.W.; FORRAT, R.; YOKSAN, S., LANG, J. A Novel Tetravalent Dengue Vaccine Is Well Tolerated and Immunogenic against All 4 Serotypes in Flavivirus-Naive Adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201(3, p. 370-377, 2010.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation in cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUNOZ-JORDAN, J.L., LAURENT-ROLLE, M., ASHOUR, J., MARTINEZ-SOBRIDO, L., ASHOK, M., LIPKIN, W.I., GARCIA-SASTRE, A., Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **J. Virol.** v. 79, p. 8004–8013, 2005.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 1, p. 13-22, 2005.
- MUYLAERT, I.R., GALLER, R., RICE, C.M., Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. **J. Virol.** v. 71, p. 291–298, 1997.
- NARDONE, R. M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Eds.). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, p. 471-495. 1977
- NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 6, p. 297-305, 2002.
- NOGUEIRA, R. M. R. et al. Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 925-926, 2001.
- PACCA, C. C. et al. RNA interference inhibits yellow fever virus replication in vitro and in vivo. **Virus Genes**, v. 38, p. 224-231, 2009.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Washington, DC: PAHO, 1994. (Pan American Health Organization, 548).
- PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Res.**, v. 80, p. 11-22, 2008.
- PETRICEVICH, V. L.; MENDONÇA, R. Z. Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. **Toxicon**, v. 42, p. 143-153, 2003.
- PIRET, J. et al. Comparative study of mechanisms of herpes simplex virus inactivation by sodium lauryl sulfate and a-lauroylsarcosine. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 2933-2942, 2002.
- POH, M. K. et al. A small molecule fusion inhibitor of dengue virus. **Antiviral Res.**, v. 84, n. 3, p. 260-266, 2009.
- RAVIPRAKASH, K. et al. Needle-free biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. **Virology**, v. 315, p. 345-352, 2003.

- RAY D, SHI PY. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. **Rec. Pat. Anti-Infect Drug Disc.** v. 1, p. 45–55, 2006.
- REY, F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. **PNAS**, v. 100, n. 12, p. 6899-6901, 2003.
- RICE, W. G.; BADER, J. P. Discovery and in vitro development of AIDS antiviral drugs as biopharmaceuticals. **Adv. Pharmacol.**, v. 33, p. 389-438, 1995.
- RIGAU-PÉREZ, J. G. The early use of break-bone fever (quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, n. 2, p. 272–274, 1998.
- ROCCO, M. I.; KAVAKAMA, B. B.; SANTOS, C. L. S. Brief communication first isolation of dengue 3 in Brazil from an imported case. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 55-57, 2001.
- ROSENFELD, G. Syntomatology, pathology and treatment of snake bites 111 south america. In: BUCHERL, W.; E. (Ed) **Venemous Animals and their Venoms** . New York: Academic Press, p. 345-384, 1971.
- SAMY, R. P.; GOPALAKRISHINAKONE, P.; BOW, H.; PUSPHARAJ, P. N. & CHOW, V. T. K., Identification and characterization of a phospholipase A2 from the venom of the Saw-scaled viper: Novel bactericidal and membrane damaging activities. **Biochimie**, v.92, p. 1854-1866, 2010.
- SAMPATH, A., PADMANABHAN, R., Molecular targets for flavivirus drug discovery **Antiv Research.**, V.81, P.6-15, 2009.
- SANGKAWIBHA, N. et al. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. The 1980 outbreak. **Am. J. Epidemiol.**, v. 120, p. 653-669, 1984.
- SCHALOSKE, R. H., DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761,p.1246–1259, 2006.
- SIEUWERTS, A. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀ – values and cell survival. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, v. 33, p. 813-823, 1995.
- SILER, J. F.; HALL, M. W.; KITCHENS, A. P. Dengue: its history, epidemiology, mechanisms of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Philippine J. Sci**, v. 29, p. 1-304, 1926.
- SLOTTA, K. H., FRAENKEL-CONTRAT, H. Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. **Mem. Inst. Butantan**, v. 12, p. 505-512, 1938.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 3rd ed. New York: W. H. Freeman, 1995.
- SOLLNER, T. H. Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 16, p. 429-435, 2004.
- SPAULDING, A. C. et al. Analysis of murine CD8(+) T-cell clones specific for the Dengue virus NS3 protein: flavivirus cross-reactivity and influence of infecting serotype. **J. Virol.**, v. 73, p. 398-403, 1999.
- SU, C. T.; HSU, J. T.; HSIEH, H. P.; LIN, P. H.; CHEN, T. C.; KAO, C. L.; LEE, C. N. &CHANG, S. Y.. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Res**, v. 79, n.1, p. 62-70, 2008.
- TALARICO, L. B. et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virusis dependent on virus serotype and host cell. **Antiviral Res.**, v. 66, p. 103-110, 2005.

- UMAREDDY, I., CHAO, A., SAMPATH, A., GU, F., VASUDEVAN, S.G., Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **J. Gen. Virol.** 87, p.2605–2614, 2006.
- VALENTIN, E., LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 59-70, 2000.
- VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J.; VAN HOOF, L. Plants products as potential antiviral agents. **Bull. Inst. Pasteur**, v. 84, p. 101-147, 1986.
- VAN DER MOST, R. G.; CORVER, J.; STRAUSS, J. H. Mutagenesis of the RGD motif in the yellow fever virus 17D envelope protein. **Virology**, v. 265, n. 1, p. 83-95, 1999.
- VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais, uma visão integrada**. Rio de Janeiro: EPUC, 1994.
- VASCONCELOS, P. F. Yellow fever. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 2, p. 275-93, mar.-abr. 2003.
- VLIETINCK, A. J., VANDEN BERGHE, D. A. Leads for Antivirals from traditional medicines. In: PREBDERGASTM, H. D. V.; ETKIN, N. L.; HARRIS, D. R. & HOUGHTON, P. J. (Ed.). *Plants for Food and Medicine*. London: Royal Botanic Gardens, p. 333-344, 1998.
- VOLK, D. E. et al. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III. **Virology**, v. 394, p. 12-18, 2009.
- WANG, Q.Y. et al. A small molecule dengue virus entry inhibitor. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 53, n. 5, p. 1823-1831, 2009.
- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, v. 85, p.328-345, 2010.
- WESTAWAY, E. G. et al. Flaviviridae. **Intervirology**, v. 24, p. 183-192, 1985.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Impact of dengue**. 2009a. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>>. Acesso em: 20 nov. 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue**: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. Geneva: World Health Organization, 2009b.
- WILLS, B. A. et al. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic fever: Serial investigations in 167 Vietnamese children with dengue shock syndrome. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 277-285, 2002.
- YU, I., ZHANG,W., HOLDAWAY,H., LI,L., KOSTYUCHENKO, V., CHIPMAN, P., KUHN,R., ROSSMANN,M., CHEN, J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, v.319, n.5871, p. 1834-1837, 2008.
- ZHAO, Y., JIN, Y., WEI, S., LEE, W., ZHANG, Y., Purification and characterization of an irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andrewsi*. **Toxicon**, v.46, n.6, p.635-640, 2005.
- ZHANG, X. G. et al. Antiviral activity of geneticin against dengue virus. **Antiviral Res.**, v. 83, p. 21–27, 2009.