



Departamento de Química e Farmácia

**QUIMIOTERAPIA DA DENGUE; FÁRMACOS DISPONÍVEIS E
PERSPETIVAS DE NOVAS TERAPÊUTICAS**

Pedro Gil Matias Fraqueza

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Dissertação orientada por: Professora Doutora Maria de Lurdes dos
Santos Cristiano

2015

“Quimioterapia da Dengue; Fármacos disponíveis e perspectivas de novas terapêuticas”

Declaração de autoria de trabalho

“Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.”

Pedro Gil Matias Fraqueza

“Copyright” por Pedro Gil Matias Fraqueza

“A universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

Agradecimentos

Terminada mais uma etapa importante na minha vida, em que sem a ajuda de muitos não teria sido possível, aproveito para expressar o meu profundo e sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano, minha orientadora, o meu agradecimento por ter aceite orientar esta dissertação, bem como por todo o seu apoio, disponibilidade, pelos conselhos e instruções que me transmitiu e pela oportunidade de puder trabalhar no seu laboratório. Aos meus colegas de laboratório, o meu grande agradecimento ao Mestre Pedro Horta, por todo o tempo que dispensou a ensinar-me, a ouvir-me e a esclarecer todas as minhas dúvidas fundamentais para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Isabel Ramalhinho agradeço a sua dedicação e orientação ao longo de todo o projeto de estágio e dissertação.

A todo o pessoal quer da Farmácia do Centro Hospitalar do Algarve, Unidade de Faro quer ao pessoal da Farmácia Comunitária da Ria e Mendes Segundo, onde tive a oportunidade de estagiar, o meu obrigada pela forma como fui recebido, pelos ensinamentos e por partilharem comigo os seis meses de estágio onde conheci muitas pessoas fantásticas que me ajudaram.

Por fim, a todos os meus familiares e amigos que me apoiaram ao longo do curso. Um especial agradecimento aos meus pais, Fátima e Gil, e à minha irmã, Carolina, que sempre me apoiaram, me incentivaram e deram forças nos momentos mais difíceis desta caminhada, tendo-me ajudado a ultrapassar todas as barreiras, pela vossa paciência e por tudo, o meu muito obrigado, sem vocês não teria chegado até aqui. Um especial agradecimento aos meus colegas e amigos de curso Alexandre, Richard, Ângela, Adriana, Rita e Andreia por me terem acompanhado ao longo desta caminhada e contribuírem para que eu acreditasse que era possível.

A todos os que contribuíram para a conclusão desta etapa, muito obrigado!

Abreviaturas e Símbolos

A

ADN – Ácido desoxirribonucleico

Ae. – Aedes

ADE – Anticorpos Potenciadores de Infecção

AINES – Fármacos anti-inflamatórios não esteróides

Ag – Antigénio

ALT – Transaminase Glutâmico Pirúvica

APVMA – Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários

ARN – Ácido ribonucleico

ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro

AST – Transaminase Glutâmica Oxalacética

B

Bti – *Bacillus thuringiensis israelensis*

Bt. H-14 – Estirpe de *Bacillus thuringiensis*

BVDV – Vírus da diarreia viral bovina

C

C – Proteína cápside

°C – Graus Celcius

CC₅₀ – Concentração citotóxica a 50 %

CD – Célula dendrítica

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CD209 – Gene 209

cm – Centímetros

CSIRO – Organização de Pesquisa Científica e Industrial da Comunidade das Nações

CYD - Vacina Sanofi Pasteur

D

d – Duplete

d.C – Depois de Cristo

DC – Célula dendrítica

DCM – Diclorometano

DC-SIGN – “Intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin”

dd – Duplete de dupletos

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DENV – Vírus da dengue

DENV-1 – Serotipo 1 do vírus da dengue

DENV-2 – Serotipo 2 do vírus da dengue

DENV-3 – Serotipo 3 do vírus da dengue

DENV-4 – Serotipo 4 do vírus da dengue

DENV-5 – Serotipo 5 do vírus da dengue

DHODH – Proteína dihidroorotato desidrogenase

DMSO – Dimetilsulfóxido

dq – Duplete de quartetos

dt – Duplete de tripletos

E

E – Proteína do envelope

EC₅₀ – 50% da concentração máxima eficaz

ELISA – Teste imunoenzimático (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)

EMCV – Vírus da encefalomiocardite

ENIVD – Rede Europeia de Diagnóstico de doenças virais “importadas”

ER – Retículo endoplasmático

EUA – Estados Unidos da América

F

FD – Febre de dengue

FDA – Food and Drug Administration

FHD – Febre hemorrágica da dengue

G

g – Gramas

g/mol – Gramas por mole

GAGs – Glicosaminoglicanos

GNA – *Galanthus nivalis*

H

HBV – Vírus da hepatite B

HCV – Vírus da hepatite C

HCT – Hematócrito

HCV – Género *Hepacivírus*

HHA – *Hippeastrum híbrido*

HIV-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPCL – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSV-1 – Herpesvírus Humano-1

I

IC – Intervalo de confiança

IC₅₀ – 50% da concentração máxima inibitória

IFA – Anticorpos monoclonais imunofluorescentes

IFN – Interferão

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IH – Inibição da hemaglutinação

IN – Inibidores nucleosídicos

INN – Inibidores não nucleosídicos

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

IV – Intravenosa

K

KDa – QuiloDalton

K_i – Constante de inibição

L

LAMP – Circuito de amplificação isotérmica mediada

M

m – Multiplete

MAC-ELISA – Teste imunoenzimático de captura (“IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay”)

ME – Antígenos de membrana

mg – Miligramas

mg/mL – Miligrama por mililitro

MHz – Megahertz

mL – Mililitro

mm³ – Milímetro cúbico

mmol – Milimoles

MS – Espectrometria de massa

Mtase – Metiltransferase

m/z – Massa/carga iónica

N

°N – Graus Norte

NASBA – Amplificação baseada na sequência de ácido nucleico

NCI – Instituto Nacional do Cancro

N.D. – Não disponível

ng/mL – Nanograma por mililitro

NITD – Instituto Novantis de Doenças Tropicais

nm – Nanómetros

nM – Nanomolar

nmol/mL – Nanomole por mililitro

NMR – Ressonância Magnética Nuclear

NS – Proteína não estrutural

NS1 – Proteína não estrutural 1

NS2A – Proteína não estrutural 2A

NS2B-3 – Complexo proteína não estrutural NS2B-3

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

NTPase – Nucleósido trifosfato hidrolase

O

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – Fase de leitura aberta (“Open Reading Frame”)

P

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial de hidrogénio

ppm – Parte por milhão

prM – Proteína precursora de membrana

PRNT – Teste de neutralização por redução de placas

PS – Células Porcinas

Q

q - Quarteto

R

RCI – Reguladores do crescimento de insetos

RdRP – ARN-polimerase ARN-dependente

RDT – Teste de diagnóstico rápido

RER – Retículo endoplasmático rugoso

RIDL – Libertação de insetos transportando um gene letal dominante

RT/PCR – Reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa

S

S - Singuleto

°S – Graus Sul

SCD – Síndrome de choque de dengue

SNC – Sistema nervoso central

S. pneumoniae – *Staphylococcus pneumoniae*

T

t – Tripleto

TLC – Cromatografia em Camada Fina

TN – Teste de neutralização

U

UDA – *Urtica dioica*

µg/mL – Micrograma por mililitro

U/mL – Unidades por milímetros

µM – Micromolar

µm – Micrómetros

µmol/L – Micromole por litro

V

VACV-WR – Vírus Vaccinia Western Reserve

W

WNV – Vírus do Nilo Ocidental

Y

YF – Febre Amarela

Índice de matérias

Resumo xxi

Abstract xxii

Capítulo 1

1.1. Dengue; evolução Histórica 1

1.2. Epidemiologia 2

1.3. Etiologia 5

1.4. Vírus da dengue 5

1.4.1. Estrutura 5

1.4.2. Vetor 8

1.4.3. Ciclo de vida 10

1.4.3.1. No mosquito 10

1.4.3.2. No hospedeiro vertebrado 10

1.5. Manifestações clínicas 14

1.5.1. Descrição clínica geral da patologia da dengue sintomática 15

1.5.1.1. Fase febril 16

1.5.1.2. Fase crítica 17

1.5.1.3. Fase de recuperação 19

1.5.2. Dengue 20

1.5.2.1. Dengue com sinais de alerta 21

1.5.2.2. Dengue grave 21

1.6. Diagnóstico 23

1.6.1. Diagnóstico da dengue aguda 27

1.6.2. Diagnóstico convalescente precoce e tardio 28

1.6.3. Confirmação laboratorial de dengue 28

1.6.4. Métodos de diagnóstico para deteção da infeção DENV 29

1.6.4.1. Isolamento do vírus 29

1.6.4.2. Deteção de ácidos nucleicos 30

1.6.4.2.1. Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR)..... 30

1.6.4.2.2. “Nested” RT-PCR 31

1.6.4.2.3. “One-step” RT-PCR 31

1.6.4.2.4. RT-PCR em tempo real	31
1.6.4.2.5. Método de amplificação isotérmica	31
1.6.4.3. Detecção de antígeno viral	32
1.6.4.4. Testes sorológicos e de resposta imunológica	32
1.6.4.4.1. IgG-ELISA	34
1.6.4.4.2. Proporção de IgM / IgG	34
1.6.4.4.3. Ensaio de inibição da hemaglutinação	34
1.6.4.4.4. Teste de fixação de complemento	35
1.6.4.4.5. Teste de neutralização	35
1.6.4.5. Teste de diagnóstico rápido (RDT)	35
1.6.4.6. Testes hematológicos	36
1.6.5. Laboratórios	36
1.7. Vigilância, prevenção e controlo da dengue	37
1.7.1. Vigilância da dengue	37
1.7.1.1.A vigilância epidemiológica	38
1.7.1.2. A vigilância entomológica	38
1.7.2. Controlo do vetor	40
1.7.2.1.Gestão ambiental	41
1.7.2.1.1. Modificação do ambiente	41
1.7.2.1.2. Manipulação ambiental	41
1.7.2.1.3. Mudanças nas habitações e comportamentos humanos	42
1.7.2.2. Controlo químico	42
1.7.2.2.1. Controlo de larvas	42
1.7.2.2.2. Controlo de adultos	43
1.7.2.3. Controlo biológico	44
1.7.2.3.1. Copépodos	45
1.7.2.3.2. Fungos entomopatogénicos	45
1.7.2.3.3. Bactérias-Bti	46
1.7.2.3.4. <i>Wolbachia pipientis</i>	46
1.7.2.3.5. Mosquito transgénico	49
1.7.3. Vacinas	51
1.7.3.1. Sanofi Pasteur (CYD)	52
1.7.3.2. DENVax (Invirage/Takeda)	53

1.7.3.3. TV003/TV005 (NIAID)	54
1.7.3.4. TDENV PIV (GSK)	54
1.7.3.5. V180 (Merck)	54
1.7.3.6. D1ME100 (NMRC)	55
1.8. Fármacos no tratamento da dengue	55
1.8.1. Compostos de origem natural com atividade anti-DENV	57
1.8.1.1. Polissacáridos	58
1.8.1.2. Flavonóides	62
1.8.1.3. Alcalóides e compostos afins	67
1.8.1.4. Terpenóides	69
1.8.1.5. Quinonas policíclicas	70
1.8.1.6. Compostos fenólicos	71
1.8.1.7. Outros compostos	72
1.8.2. Fármacos com atividade antiviral na dengue e seus alvos terapêuticos.....	74
1.8.2.1. Inibidores da entrada do vírus e inibidores da cápside	75
1.8.2.2. Inibidores da proteína NS4B do DENV	79
1.8.2.3. Inibidores da protease helicase NS3 do DENV	80
1.8.2.4. Inibidores da Metiltransferase (Mtase) e da ARN-polimerase ARN- dependente (RdRp) NS5 do DENV	83
1.8.2.5. Inibidores de alvos no hospedeiro envolvidos no ciclo de vida do DENV.....	86
1.8.2.6. Outros alvos inibidores	89
1.8.3. Fármacos em ensaios clínicos na dengue	90

Capítulo 2

2. Quinolonas em química medicinal	93
2.1. Introdução	93
2.2. Quinolonas e a atividade antiviral	96
2.3. Objetivo do trabalho laboratorial	98
2.4. Discussão	98
2.4.1. Síntese do primeiro derivado quinolínico (bisquinolona)	100
2.4.1.1. Redução da função nitro de bis(4-fluoro-3-nitrofenil)sulfona a amina	100

2.4.1.2. Acoplamento da bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona com etoximetilenomalonato de dietilo.....	102
2.4.1.3. Síntese da quinolona por ciclização do derivado malonato em presença de oxiclreto de fósforo (POCl ₃), a 97°C.....	103
2.4.1.4. Ciclização através do aquecimento em dowtherm A (250°C)	104
2.4.2. Síntese do segundo derivado quinolínico (quinolona com o resíduo de benzisotiazole em posição 7)	105
2.4.2.1. Acoplamento de 3-aminofenol com etoximetilenomalonato de dietilo.....	105
2.4.2.2. Síntese de cloreto de pseudo-sacarina	106
2.4.2.3. Síntese de 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato de dietilo ou preparação de éter de benzisotiazole	107
2.4.2.4. Ciclização em presença de oxiclreto de fósforo (POCl ₃), a 97°C.....	108
2.4.2.5. Ciclização através do aquecimento em dowtherm A (250°C)	109
2.5. Procedimento experimental	110
2.5.1. Síntese de 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato)	110
2.5.1.1. Síntese de bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona	110
2.5.1.2. Síntese de bis-dietil-2-(((4-fluoro-3-aminofenil)metileno)malonato) sulfona	111
2.5.1.3. Síntese de 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) através de aquecimento com oxiclreto de fósforo (POCl ₃).....	111
2.5.1.4. Síntese de 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) através de aquecimento em dowtherm A	112
2.5.2. Síntese de acetato de 7-((1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il) oxi) -4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato.....	112
2.5.2.1. Síntese de 2-(((3-hidroxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo.....	112
2.5.2.2. Síntese do cloreto de pseudo-sacarina	113

2.5.2.3.Síntese de 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato) de dietilo	113
2.5.2.4.Síntese de acetato de 7-((1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il) oxi) -4-oxo-1,4-di-hidroquinolina-3-carboxilato através de aquecimento com oxiclureto de fósforo (POCl ₃)	114
2.5.2.5.Síntese de acetato de 7-((1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il) oxi) -4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato através de aquecimento em dowtherm A	114

Capítulo 3

3. Conclusão	116
Referências bibliográficas	119
Anexos	148

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Número médio de casos de dengue e dengue grave notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS), em períodos de vários anos, de 1955-2007 e, por ano, de 2008 a 2010. (Adaptado de ⁽¹⁰⁾)	2
Figura 1.2 – Distribuição do risco global da dengue (determinação da condição de risco com base em relatórios combinados da OMS, o Centro Norte-Americano para Controle e Prevenção de Doenças, Gideon on-line, ProMED, DengueMap, Eurosurveillance e literatura publicada. (Adaptado de ⁽¹⁰⁾)	3
Figura 1.3 – (A) Estrutura do vírus na forma imatura. Possui 60 espículas (círculo) na sua superfície, tornando-a menos lisa que a forma madura. (B) Estrutura do vírus maduro. A membrana é lisa e é completamente coberta por uma estrutura proteica. Os diferentes domínios da proteína E são representados por diferentes cores – vermelho: domínio I, amarelo: domínio II e azul: domínio III. (Adaptado de ⁽³⁶⁾)	6
Figura 1.4 – As características estruturais e genômicas do vírus da dengue (DENV). O virião contém uma cadeia simples de ARN positiva, que é encapsulado no interior da nucleocápside e envolvida por uma bicamada lipídica incorporando glicoproteínas. O ARN genômico possui uma única fase de leitura, que codifica 10 proteínas virais: três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Estruturas virais imaturas possuem 60 glicoproteínas pr-M-E dispostas com saliências. Estruturas virais maduras têm uma estrutura lisa glicoproteica constituída por 90 dímeros de proteínas envelope. C, cápside; E, envelope; prM, pré membrana ; NS, não-estrutural; ss-ARN, cadeia simples de ácido ribonucleico. (Adaptado de ⁽⁴³⁾)	6
Figura 1.5 – A - <i>Aedes aegypti</i> ; B - <i>Aedes albopictus</i> . (Adaptado de ⁽⁶¹⁾)	8
Figura 1.6 – Representação da transmissão do DENV. (Adaptado de ⁽³⁸⁾)	9
Figura 1.7 – Representação esquemática do processo de entrada do vírus da dengue na célula. O vírus da dengue utiliza recetores de membrana para entrada na célula. O vírus maduro liga-se a um recetor da membrana celular (a). A entrada na célula ocorre através da endocitose mediada por clatrina (b). Forma-se uma vesícula endocítica (c). A diminuição do pH na vesícula endocítica promove alterações conformacionais na proteína viral envelope (dímeros de proteínas passam a trímeros). Finalmente formam-se poros e o genoma do vírus é libertado no citoplasma da célula (d). (Adaptado de ⁽⁷⁴⁾)	11
Figura 1.8 – Ciclo de replicação viral. A entrada da partícula viral ocorre por endocitose mediada por recetores. A pH ácido, no endossoma, a proteína E sofre mudanças conformacionais que levam a fusão das membranas viral e endossômica (a). O ARN viral é traduzido e inicia-se o processo de replicação (b). A montagem das partículas virais ocorre no RE (c,d), e as novas partículas imaturas recém formadas seguem pela via de secreção e completam a maturação no Complexo de Golgi (e). Posteriormente os vírus são libertados pela célula hospedeira (f). (Adaptado de ⁽⁹⁶⁾)	14
Figura 1.9 – Representação esquemática das manifestações da infecção provocada pelo vírus da dengue. (Adaptado de ⁽⁹⁷⁾)	15
Figura 1.10 – Evolução clínica da doença da dengue. (Adapato de ⁽³⁴⁾)	16

Figura 1.11 – Sugestão de classificação de casos de dengue com diferentes níveis de gravidade. (Adaptado de ⁽³⁴⁾)	22
Figura 1.12 – Teste do laço positivo. (Adaptado de ⁽³¹⁾)	22
Figura 1.13 – Métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da infecção por dengue. (Adaptado de ⁽¹²⁷⁾)	24
Figura 1.14 – Marcadores para o diagnóstico da dengue. (Adaptado de ⁽³¹⁾)	26
Figura 1.15 - Princípio do ensaio de MAC-ELISA. Adaptado de ⁽³⁴⁾)	33
Figura 1.16 – A- recipientes de armazenamento de água tapados. (Adaptado de ⁽¹⁷¹⁾); B - pneus usados servindo de locais de reprodução do vetor. (Adaptado de ⁽¹⁰⁾)	42
Figura 1.17 – Cruzamentos entre <i>Ae. aegypti</i> machos e fêmeas com e sem <i>Wolbachia</i> . (Adaptado de ⁽²⁰⁴⁾)	47
Figura 1.18 – Os ovos resultantes do cruzamento do macho transgênico com uma fêmea normal, não se conseguem desenvolver até a fase adulta. (Adaptado de ⁽²¹⁸⁾)	50
Figura 1.19 – Representação da estrutura molecular do fucoidano	59
Figura 1.20 – Representação das estruturas moleculares de carragenanos	60
Figura 1.21 – Representação de unidades de dissacarídeos presentes na estrutura de C2S-3	60
Figura 1.22 – Representação da estrutura molecular base dos galactomananos	62
Figura 1.23 – Representação das estruturas moleculares de flavonóides de espécies mexicanas de <i>Tephrosia</i>	63
Figura 1.24 – Representação da estrutura molecular do flavonóide hiperóxido	63
Figura 1.25 – Representação das estruturas moleculares de flavonoides	64
Figura 1.26 – Representação da estrutura molecular da quercetina	64
Figura 1.27 – Representação da estrutura molecular da fisetina	65
Figura 1.28 – Representação das estruturas moleculares da pinocembrina e chartaceones	66
Figura 1.29 – Representação das estruturas moleculares de baicaleína, petcolinarina e acacetina-7- <i>O</i> -rutinósido	67
Figura 1.30 – Representação das estruturas moleculares da emetina, palmatina e castanospermina	68
Figura 1.31 – Representação da estrutura molecular da geneticina	68

Figura 1.32 – Representação das estruturas moleculares de terpenos extraídos de <i>Trigonostemon cherrieri</i>	69
Figura 1.33 – Representação da estrutura molecular de triterpeno e derivados fenólicos, extraídos de <i>Arrabidaea pulchra</i>	69
Figura 1.34 – Representação das estruturas moleculares de quinonas cíclicas extraídas de <i>Gymnocrinus richeri</i>	70
Figura 1.35 – Representação das estruturas moleculares de quinonas policíclicas	71
Figura 1.36 – Representação da estrutura molecular de Glicósidos fenólicos extraídos de <i>Flacourtia ramontchi</i>	71
Figura 1.37 – Representação da estrutura molecular do galato de metilo	71
Figura 1.38 – Representação das estruturas moleculares de compostos com atividade antiviral	72
Figura 1.39 – Representação das estruturas moleculares de compostos acetilénicos extraídos de <i>Anacolosa pervilleana</i>	73
Figura 2.1 - Representação da estrutura molecular do ácido nalidíxico	93
Figura 2.2 - Representação da estrutura básica molecular de derivados de ácido 1,4-diidro-4-oxoquinolina carboxílico	93
Figura 2.3 - Representação das estruturas moleculares de norfloxacin e ciprofloxacina (quinolonas de segunda geração)	94
Figura 2.4. - Representação das estruturas moleculares de gatifloxacina e sparfloxacina (quinolonas de terceira geração)	95
Figura 2.5 - Representação das estruturas moleculares de garenoxacin, moxifloxacina e gemifloxacina (quinolonas de quarta geração)	95
Figura 2.6 – Representação da estrutura molecular do composto 16, inibidores não nucleósídicos para a polimerase NS5B de HCV. ⁽⁴⁴⁶⁾	97
Figura 2.7 – Representação da estrutura molecular de 8-hidroquinolina-aminobenzotiazole (composto 1), um inibidor competitivo da protéase NS2B-NS3 da DENV-2. ⁽³⁶⁸⁾	97
Figura 2.8 – Representação das estruturas moleculares de duas 8-hidroquinolinas inibidoras da protéase de WNV	97
Figura 2.9 – Representação das estruturas moleculares da amodiaquina e cloroquina, inibidores da protéase NS2B-NS3 de flavivirus (DENV 2 e WNV)	98

Figura 2.10 – Representação da estrutura dos derivados quinolínicos sintetizados	98
Figura 2.11 – Representação da estratégia proposta para a síntese do primeiro derivado quinolínico (bisquinolona)	99
Figura 2.12 – Representação da estratégia proposta para a síntese do segundo derivado quinolínico (quinolona com o resíduo de benzisotiazole em posição 7)	100
Figura 2.13 – Proposta mecanística para a redução da função nitro de bis(4-fluoro-3-nitrofenil)sulfona (3), a amina	100
Figura 2.14 – Proposta mecanística para a reação do acoplamento da amina com etoximetilenomalonato de dietilo	102
Figura 2.15 – Proposta mecanística para reação de ciclização com formação de quinolona, em presença de oxicloreto de fósforo (POCl ₃)	103
Figura 2.16 – Mecanismo de Gould-Jacobs proposto para a ciclização intramolecular conduzida termicamente em dowtherm A	104
Figura 2.17 – Proposta de mecanismo de reação	105
Figura 2.18 – Mecanismo proposto para a síntese de cloreto de pseudo-sacarina, a partir de sacarina	106
Figura 2.19 – Mecanismo proposto para as etapas envolvidas na síntese de 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato de dietilo (10)	107
Figura 2.20 – Mecanismo de reação proposto para a ciclização com oxicloreto de fósforo, com formação de 4-cloroquinolina, seguida por hidrólise, para formação de 4-oxoquinolina	108
Figura 2.21 – Mecanismo de reação da ciclização intramolecular conduzida termicamente, metodologia de Gould-Jacobs	109

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Sinais de alarme. (Adaptado de ⁽³⁴⁾)	19
Tabela 1.2 – Fases febril, crítica e de recuperação na dengue. (Adaptado de ⁽³⁴⁾)	20
Tabela 1.3 – Avanços no diagnóstico da dengue por década. (Adaptado de ⁽³¹⁾)	25
Tabela 1.4 – Métodos de diagnóstico, técnicas e amostras clínicas para a dengue. (Adaptado de ⁽³¹⁾)	26
Tabela 1.5 – Interpretação dos resultados do diagnóstico da dengue.(Adaptado de ⁽³⁴⁾)	28
Tabela 1.6 – Vacinas da dengue candidatas em desenvolvimento clínico. (Adaptado de ⁽²²⁵⁾)	52
Tabela 1.7 – Plantas com atividade antiviral usadas no tratamento de infecções pela dengue. (Adaptado de ⁽²⁶⁰⁾)	57
Tabela 1.8 – Inibidores da entrada do vírus e inibidores da cápside (Adaptado de ^(74,316))	76
Tabela 1.9 – Inibidores da proteína NS4B do DENV (Adaptado de ⁽³¹⁶⁾)	79
Tabela 1.10 – Inibidores da protease e helicase NS3 do DENV (Adaptado de ^(31,316)) ...	82
Tabela 1.11 – Inibidores da Metiltransferase (Mtase) e da ARN-polimerase ARN-dependente (RdRp) da NS5 do DENV (Adaptado de ^(31,316))	84
Tabela 1.12 – Inibidores de alvos no hospedeiro envolvidos no ciclo de vida do DENV(Adaptado de ^(31,316))	87
Tabela 1.13 – Ensaios clínicos de fármacos com atividade anti dengue (Adaptada de ⁽⁴²³⁾)	91

Resumo

A dengue é uma infecção viral aguda transmitida ao homem através da picada de mosquitos do género *Aedes*, principalmente as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. A dengue tornou-se uma das principais preocupações de saúde pública internacional, sendo considerada actualmente a mais importante arbovirose. Mais de 50% da população afetada por dengue vive em áreas de risco e cerca de 50% vive em países onde a doença é endémica.

O número de focos de dengue aumentou na última década, o que contribuiu para o aumento anual da população em risco. A OMS estima que mais de 3,5 biliões de pessoas estão em risco de infecção pelo vírus da dengue (DENV), surgindo cerca de 390 milhões de novas infeções em cada ano, das quais 96 milhões são sintomáticas.

Ainda não foi encontrada uma terapêutica específica para o tratamento da dengue, sendo usados fármacos aprovados para o tratamento de outras patologias. Os fármacos mais utilizados são agentes antivirais, de entre os quais se destacam os inibidores da protease viral. São também utilizadas tetraciclinas e anti-inflamatórios não esteroides bem como os antimaláricos Cloroquina e Amodiaquina, que são utilizados sobretudo em infeções causadas pelo vírus da dengue tipo II. São ainda usados inibidores da helicase, como o Ivermectin, e compostos da classe das tiazolidinonas, que atuam como inibidores da metiltransferase.

A dissertação apresentará uma revisão da literatura relativamente a vários aspetos da patologia, nomeadamente, da epidemiologia, etiologia, caracterização do vírus e do seu ciclo de vida, diagnóstico e terapêutica da doença, profilaxia, estratégias de controlo do vírus e perspectivas futuras (vacinas, novos fármacos).

A última parte da dissertação descreve o trabalho laboratorial realizado na síntese de alguns derivados quinolónicos. O potencial desta classe para terapia da dengue foi avaliado *in silico* com modelos de proteínas específicas. Os compostos preparados poderão ser submetidos a testes de atividade.

Palavras chave: Dengue, DENV, *Aedes aegypti*, alvos terapêuticos, quinolonas.

Abstract

Dengue is an acute viral infection transmitted to humans through the bite of mosquitoes of the genus *Aedes*, mainly species *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Dengue has become a major concern of international public health, and is considered today the most important arboviral disease. More than 50% of the population affected by dengue live in risk areas and about 50% live in countries where the disease is endemic.

The number of dengue outbreaks increased in the last decade, which contributed to the annual increase in population at risk. The WHO estimates that more than 3.5 billion people are at risk of infection by dengue virus, appearing about 390 million new infections each year, of which 96 million are symptomatic.

A specific treatment has yet been found for the treatment of dengue being used drugs approved for the treatment of other pathologies. The most used agents are antiviral drugs, among which we highlight the viral protease inhibitors. They are also used tetracyclines and nonsteroidal anti-inflammatory drug and the antimalarials Chloroquine and Amodiaquine, which are used in particular in infections caused by dengue virus serotype 2. They are also used helicase inhibitors, such as Ivermectin and compounds from the class of thiazolidinones, which act as inhibitors of methyltransferase.

The dissertation present a review of literature relating to various aspects of pathology, namely, epidemiology, etiology, characterization of the virus and its life cycle, diagnosis and therapy of disease, prevention, control strategies virus and future perspectives (vaccines, new drugs).

The last part of the dissertation describes the work done in the laboratory synthesis of some quinoline derivatives. The potential of this class for dengue therapy was evaluated in silico models with specific proteins. The compounds prepared may be subjected to activity testing.

Keywords: Dengue, DENV, *Aedes aegypti*, therapeutic targets, quinolones.

Capítulo 1

1.1. Dengue; evolução Histórica

Os primeiros sintomas da dengue foram registados numa enciclopédia médica chinesa em 992 d.C. No entanto encontram-se referências a registos anteriores que remontam aos séculos da dinastia de Chin (265-420 d.C.). A doença foi então referida como “veneno da água” e associada a insetos voadores. ^(1,2) As epidemias que se assemelhavam à propagação e percurso da doença de dengue ocorreram em 1635 e 1699 nas Antilhas e América Central, respetivamente. ⁽³⁾ Uma grande epidemia de dengue invadiu Filadélfia em 1780 e epidemias semelhantes tornaram-se comuns nos EUA no início do século XX. A etiologia viral e a transmissão através de mosquitos só foram determinados no século XX. ^(3,4)

Foi debatida a origem do mosquito tido como vetor primário, *Aedes aegypti*, pensando-se ser proveniente de África ou Ásia. Independentemente da sua origem, *Aedes aegypti* espalhou-se para fora de África entre os séculos XV e XIX, devido à utilização de embarcações marítimas para expansão comercial e comércio de escravos. As embarcações de navegação permitiam o transporte de criadouros para o vetor, juntamente com os seres humanos para que o mosquito completasse o seu ciclo de transmissão, permitindo a propagação lenta mas eficaz do vírus e do mosquito em destinos costeiros espalhados por todo o Mundo. ⁽⁵⁾ A disseminação da dengue foi agravada na Segunda Guerra Mundial, quando as tropas começaram a dispersar-se para o interior, utilizando transportes modernos dentro e entre países; ⁽⁴⁾ como consequência, a epidemia da dengue tornou-se mais abrangente. Houve relatos de epidemias no século XVII, mas os mais plausíveis e os primeiros relatos de epidemias de dengue remontam a 1779 e 1780, quando uma epidemia varreu a Ásia, África e América do Norte. ⁽⁶⁾ Desde então, e até 1940, foram raras as epidemias. Em 1906, foi confirmada a transmissão por mosquitos do género *Aedes*, e em 1907, foi demonstrado que a dengue era a segunda doença (depois da febre amarela) causada por vírus. ⁽⁷⁾ A acentuada propagação da dengue durante e após a Segunda Guerra Mundial tem sido atribuída a uma perturbação ecológica, que contribuiu para a propagação dos diferentes serotipos da doença para novas áreas e para o surgimento da febre hemorrágica de dengue (FHD). Esta forma grave da doença foi relatada pela primeira vez, nas Filipinas, em 1953. Na década de 1970, tornou-se uma das principais causas de mortalidade infantil na região do Pacífico e nas Américas. ^(6,8)

No continente americano, durante os anos 50, 60 e 70 do século XX foi circunscrita a epidemia da dengue, nomeadamente na América Central e do Sul, aquando da realização da campanha para erradicação do *Aedes aegypti*, com o objetivo de combater a febre-amarela, o que erradicou efetivamente a doença. No entanto a descontinuação dessa campanha originou nova infestação do mosquito nas zonas (áreas) onde havia ocorrido a erradicação. ⁽⁹⁾

No início do século XXI verificou-se que mais de 100 países tropicais são endêmicos para a dengue. Destes, cerca de 60 países têm relatado casos de FHD, tornando a febre de dengue (FD) / FHD numa das principais arboviroses nos seres humanos. (figura 1.1) Estima-se que ocorram por ano entre 50 a 100 milhões de casos de FD entre os quais centenas de milhares de casos de FHD e, em alguns países, com uma taxa de letalidade de 10 a 15%. ⁽⁵⁾

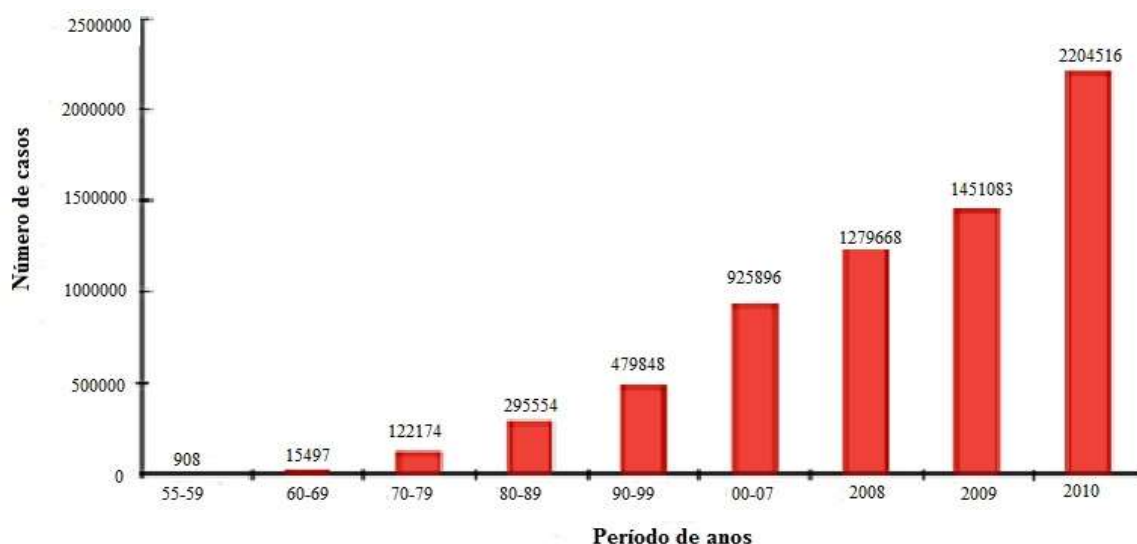


Figura 1.1 – Número médio de casos de dengue e dengue grave notificados à Organização Mundial de Saúde (OMS), em períodos de vários anos, de 1955-2007 e, por ano, de 2008 a 2010. (Adaptado de ⁽¹⁰⁾)

1.2. Epidemiologia

Na atualidade, a dengue é considerada como uma grande preocupação para a Saúde Pública em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo. É a doença viral transmitida por mosquitos com a mais rápida propagação, com um aumento de 30 vezes na incidência global nas últimas 5 décadas. ⁽¹⁰⁾

Estima-se que cerca de 3,6 mil milhões (biliões) de pessoas vivem em áreas tropicais e subtropicais, onde os vírus da dengue têm o potencial para serem transmitidos. (11,12,13)

As estimativas globais variam, mas ocorrem anualmente entre 50 e 200 milhões de infecções por dengue, dos quais 500.000 episódios de dengue grave (FHD / Síndrome de choque da dengue - SCD) e mais de 20.000 mortes relacionadas com a dengue. ^(14,15) A figura 1.2 evidencia a distribuição geográfica das áreas de risco global de dengue.

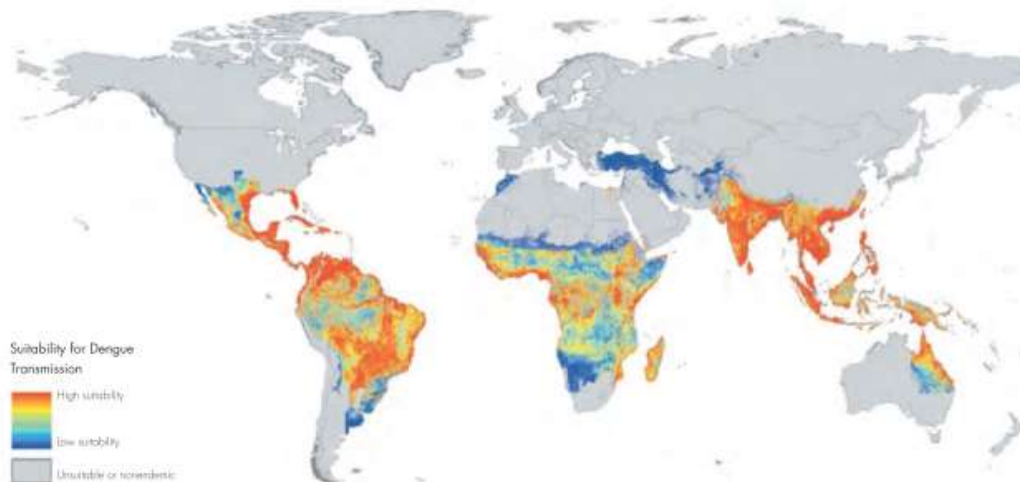


Figura 1.2 – Distribuição do risco global da dengue (determinação da condição de risco com base em relatórios combinados da OMS, o Centro Norte-Americano para Controlo e Prevenção de Doenças, Gideon on-line, ProMED, DengueMap, Eurosurveillance e literatura publicada). (Adaptado de ⁽¹⁰⁾)

A última epidemia de dengue que atingiu a Europa ocorreu entre 1926 e 1928, na Grécia ⁽¹⁰⁾ foi provocada pelo vetor *Ae. aegypti* e resultou num elevado número de casos mortais. Nos nossos dias existe uma ameaça muito real de surtos de dengue na Europa, pois são observados com frequência casos importados em viajantes. Em 2010 foram registados casos de dengue na Croácia e em França. ^(2,10)

No nosso país, na Madeira, um arquipélago no Atlântico situado à mesma latitude da costa norte de África, foi relatada a presença do principal vetor da dengue, *Ae. aegypti*, em 2005. O vetor pôde estabelecer-se devido ao clima sub-tropical e abundante vegetação existentes na ilha. Em 2012, a Madeira registou o seu primeiro grande surto de dengue. Este surto resultou em 2164 casos notificados até fevereiro de 2013, com 78 casos importados de viajantes que partiram da Madeira e que foram detetados em outros 13 países da Europa. ⁽²⁾

Em 2012, a dengue foi novamente classificada pela OMS como a mais importante doença viral transmitida por mosquitos no mundo ⁽¹⁰⁾, devido à significativa expansão geográfica do vírus e seu vetor em áreas anteriormente não atingidas e do pesado encargo

subsequente da doença. ^(10,11,12,16,17) Na maioria dos países atingidos, a morbidade e mortalidade recai sobre as crianças. ^(18,19)

Devido à fraca vigilância da doença, ao baixo nível de elaboração de relatórios, à baixa taxa de letalidade, a dificuldades no diagnóstico e a análises comparativas inconsistentes, a verdadeira incidência e o impacto da dengue são provavelmente significativamente maiores do que aqueles que são atualmente relatados. ^(11,20,21) Assim, a verdadeira incidência global da doença e o impacto económico associado são desconhecidos. ⁽¹⁰⁾ No entanto, Brady et al ⁽²²⁾ iniciaram uma série de etapas consensuais para evidenciar a incidência global da dengue e determinar com maior aproximação a extensão da população em risco. Na publicação de 2012, Brady et al, sugerem que um total de 3.970 milhões de pessoas, vivendo em 128 países, estão em risco de dengue em todo o mundo, dos quais 824 milhões residem em zonas urbanas e 763 milhões em zonas suburbanas. ⁽²²⁾ Os mesmos autores, usando abordagens cartográficas, sugeriram em abril de 2013 o aparecimento de 390 milhões de infeções por dengue anualmente, em todo o mundo, incluindo infeções sintomáticas e assintomáticas, quase o dobro do valor mais elevado reportado até à data. ⁽²³⁾

Este aumento tem sido associado a mudanças sociais, tais como o crescimento da população, aumento da urbanização, particularmente em cidades tropicais com deficiente tratamento de água e resíduos, levando à proliferação das espécies de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* que transmitem o vírus da dengue (DENV). A migração humana, o comércio e as viagens internacionais estão constantemente a introduzir novos vetores e espécies patogénicas em novas áreas geográficas. Tem também sido sugerido que o aumento das temperaturas e as alterações climáticas globais podem promover a disseminação de mosquitos vetores em novas áreas. ^(5,24)

Apesar do nível de incerteza sobre o número total, os dados fornecidos da OMS relativos a regiões onde há transmissão de dengue apontam para mais de 125 países endémicos para a dengue em todo o mundo. ^(13,25)

1.3. Etiologia

A dengue é uma infecção viral aguda transmitida ao homem através da picada de mosquitos do género *Aedes*, principalmente as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.^(10,11)

Existem quatro serotipos distintos do vírus da dengue, os quais pertencem à família *Flaviviridae* e género *Flavivirus*. Qualquer um dos quatro vírus antigenicamente distintos, ou serotipos, designado por vírus da dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, podem causar FD, uma infecção viral aguda caracterizada por febre, erupção cutânea, dor de cabeça, dores musculares e articulares e náuseas, bem como formas mais graves da doença. Ocasionalmente a FD pode progredir para FHD e SCD, doenças potencialmente fatais associadas a extravasamento vascular, hemorragia e choque.^(26,27) Por outro lado, é cada vez mais reconhecido que a maioria das infeções provocadas pelo DENV são assintomáticas, provocando apenas desconforto, sintoma insuficiente para que o afetado procure uma consulta clínica.⁽²⁸⁾ No entanto, 1 a 5% de infeções originam a forma de dengue grave (FHD/SCD), que ameaça a vida.^(29,30)

Foi proposto um novo serotipo do vírus da dengue DENV-5, descrito recentemente na Malásia. Este é um vírus mais estreitamente relacionado com DENV-4 e a sua implicação na saúde pública é ainda incerta.⁽³¹⁾

A infeção com qualquer um dos quatro serotipos do DENV induz proteção e imunidade a esse serotipo, mas não confere proteção a longo prazo contra uma infeção provocada por outros serotipos.⁽³²⁾

As infeções secundárias com o vírus da dengue provocadas por um serotipo diferente são mais graves do que as infeções primárias e constituem um fator de risco para a dengue grave.⁽³³⁾

1.4. Vírus da dengue

1.4.1. Estrutura

Os vírus do género *Flavivirus*, ao qual pertence o DENV, apresentam uma morfologia esférica com diâmetro de aproximadamente 50 nm, na forma madura (figura 1.3, (B)).^(34,35) São vírus em envelope que apresentam superfície relativamente lisa⁽³⁵⁾ e simetria icosaédrica.

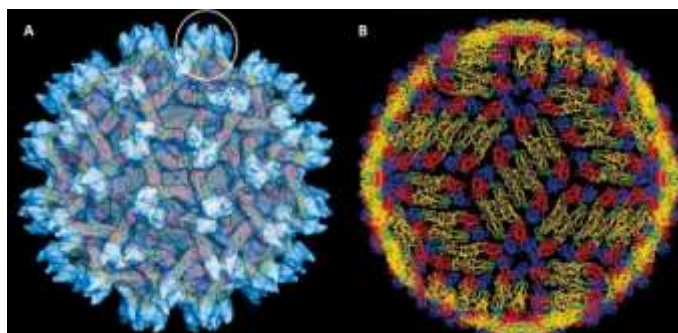


Figura 1.3 – (A) Estrutura do vírus na forma imatura. Possui 60 espículas (círculo) na sua superfície, tornando-a menos lisa que a forma madura. (B) Estrutura do vírus maduro. A membrana é lisa e é completamente coberta por uma estrutura proteica. Os diferentes domínios da proteína E são representados por diferentes cores – vermelho: domínio I, amarelo: domínio II e azul: domínio III. (Adaptado de ⁽³⁶⁾)

O genoma do DENV é constituído por um segmento de ARN de cadeia positiva de aproximadamente 11000 bases. ^(37,38,39,40) O genoma do vírus codifica três proteínas estruturais, a proteína cápside - C, que envolve o ARN viral e duas glicoproteínas transmembranares ligadas: a prM, proteína precursora de membrana e envelope E que constituem o envelope viral e sete proteínas não estruturais NS – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 ^(41,42,43) como representado na figura 1.4.

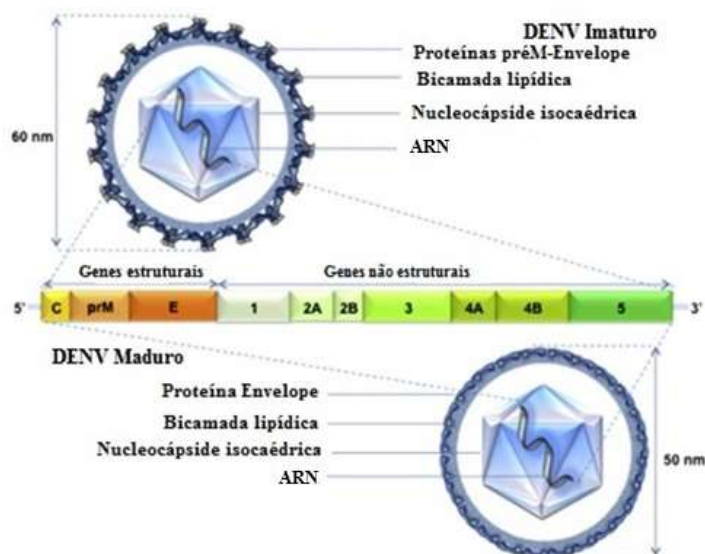


Figura 1.4 – As características estruturais e genómicas do vírus da dengue (DENV). O virião contém uma cadeia simples de ARN positiva, que é encapsulada no interior da nucleocápside e envolvida por uma bicamada lipídica incorporando glicoproteínas. O ARN genómico possui uma única fase de leitura, que codifica 10 proteínas virais: três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Estruturas virais imaturas possuem 60 glicoproteínas pr-M-E dispostas com saliências. Estruturas virais maduras têm uma estrutura lisa glicoproteica constituída por 90 dímeros de proteínas envelope. C, cápside; E, envelope; prM, pré membrana; NS, não-estrutural; ss-ARN, cadeia simples de ácido ribonucleico. (Adaptado de ⁽⁴³⁾).

As extremidades 5' e 3' são sequências não codificantes. A extremidade 5' é uma região com importância na replicação viral. Os elementos conservados na região 3' influenciam as propriedades do vírus, incluindo a replicação do vírus, o tropismo da célula hospedeira, a especificidade do vetor, a patogenicidade e a virulência. ^(37, 44)

O polipéptido processado apresenta várias funções. Múltiplas cópias da proteína cápside – C (11 kDa) encapsulam o ARN genômico viral para formar a nucleocápside viral que é envolvida por uma dupla camada lipídica derivada da célula hospedeira, onde se encontram ancoradas cerca de 180 cópias de proteínas M e E. A proteína estrutural M é a mais pequena (~8kDa), sendo um pequeno fragmento proteolítico do seu precursor prM (21 kDa). ⁽⁴⁵⁾ A proteína de envelope – E (53 kDa) juntamente com a proteína M formam o revestimento externo da partícula viral madura. A glicoproteína E, como se encontra exposta na superfície do vírus é responsável por importantes processos como a ligação ao recetor celular, através de recetores, como o sulfato de heparina, DC-SIGN – (Intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) e fusão da membrana viral com membrana da célula, além de ser o principal determinante antigénico, sendo alvo da resposta imuno-protetora no hospedeiro vertebrado. ^(46,47)

A proteína E possui três subunidades individuais que constituem os três domínios: I, II e III: o domínio I forma o domínio estrutural, o domínio II liga o domínio estrutural ao domínio de ligação e o domínio III constitui o principal domínio de ligação do vírus. ⁽⁴⁸⁾ Este domínio atua na interação vírus-célula, apresentando zonas que se ligam a recetores presentes na superfície das células hospedeiras. Esta interação é responsável pela endocitose da partícula viral. ^(45,49,50)

As proteínas NS são proteínas não estruturais requeridas na replicação e tradução do genoma, exercendo também um papel na montagem e libertação das partículas e na invasão do sistema imune. ^(51,52)

A proteína não estrutural NS1 é uma glicoproteína (46 kDa) que tem um papel importante na replicação do ARN. Foram detetados elevados níveis de secreção da NS1 no soro de pacientes infetados com DENV durante infeções agudas. ⁽⁵³⁾ Assim, a secreção de NS1 pode estar relacionada com a infeção provocada pelo DENV, e tem sido proposta como um parâmetro de prognóstico para a gravidade da doença. ⁽⁵⁴⁾

A proteína NS2A está envolvida na montagem de vírus e na replicação do ARN. Estudos mostraram que uma mutação na NS2A bloqueia a produção de vírus e que a

NS2A atua também como antagonista do interferão (IFN) por inibição da sinalização de IFN. ⁽⁵⁵⁾

A NS2B encontra-se associada a NS3, atuando como cofator do complexo proteolítico viral (serina protease NS2B-NS3). ⁽⁵⁶⁾

A NS3 é uma proteína multifuncional que está envolvida na replicação do ARN. Possui múltiplas atividades enzimáticas, incluindo serina protease com NS2B-NS3 que regula o processamento da poliproteína, e atividade como NTPase (hidrolisa ATP para fornecer energia durante os processos de replicação) e helicase (associada ao processo de replicação). ⁽⁵⁷⁾

A NS4A forma o componente do complexo ligado à membrana na replicação viral. A sua região terminal C serve como uma sequência de sinalização para a translocação de NS4B adjacente para o lúmen do retículo endoplasmático (RE). ^(42,58)

A NS4B regula a replicação de ARN através da sua interação com a proteína NS3. A NS4A e NS4B, também têm sido relacionadas com o bloqueamento da sinalização interferão tipo I. ^(42,55)

A porção C-terminal da NS5 possui uma sequência com atividade de ARN polimerase dependente de ARN que é responsável pela replicação, sintetizando cópias negativas e positivas do ARN viral. As cadeias negativas servem de molde para a transcrição das cadeias positivas de ARN que serão utilizadas para a tradução de novas poliproteínas e/ou seguirão para a montagem da nucleocápside das partículas virais. ⁽⁵⁹⁾

1.4.2. Vetor

Os quatro sorotipos do vírus da dengue apresentam uma história natural semelhante, incluindo os seres humanos como o principal hospedeiro vertebrado e mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti* (figura 1.5A), *Aedes albopictus* (figura 1.5B) e *Aedes polynesiensis*, como vetores. ⁽⁶⁰⁾

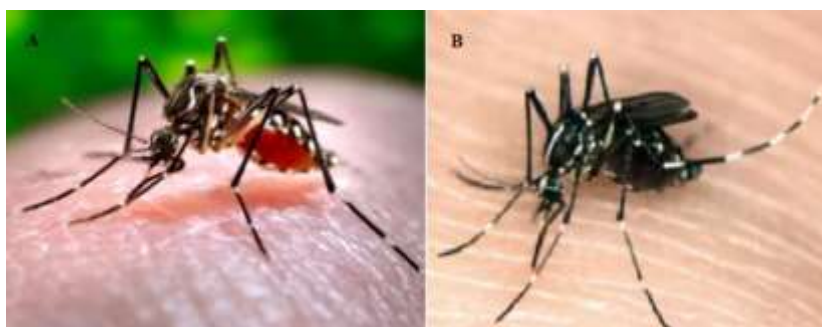


Figura 1.5 – A - *Aedes aegypti*; B - *Aedes albopictus*. (Adaptado de ⁽⁶¹⁾)

Aedes aegypti é o principal vetor da dengue a nível mundial. É uma espécie tropical e subtropical amplamente distribuída em todo o mundo, principalmente entre as latitudes 35° N e 35° S. Estes limites geográficos correspondem aproximadamente a uma isotérmica de inverno de 10°C. Foi também encontrada *Aedes aegypti* a 45° N mas tais invasões ocorreram durante os meses mais quentes e os mosquitos não sobreviveram aos invernos. Além disso, devido às temperaturas mais baixas, *Aedes aegypti* não é encontrado geralmente acima de 1000 metros de altitude. ⁽³⁴⁾

Aedes aegypti prefere colocar os seus ovos em recipientes de água artificiais. Os estágios imaturos são encontrados em habitats cheios de água, principalmente em recipientes artificiais intimamente associados com habitações humanas, muitas vezes dentro de casa. Estudos sugerem que a maior parte das fêmeas de *Aedes aegypti* podem viver toda a vida em torno das casas, onde os insetos emergem como adultos ⁽³⁴⁾ vivendo em estreita proximidade com os seres humanos e alimentando-se preferencialmente destes em detrimento de outros vertebrados. Os seres humanos são os hospedeiros primários do vírus ^(34,62) mas este também circula em primatas não humanos (figura 1.6). ⁽⁶³⁾ Os vetores mordem geralmente durante o dia, particularmente no início da manhã e à noite, ^(10,34) podendo a infeção ser adquirida através de uma única picada. ⁽⁶⁴⁾

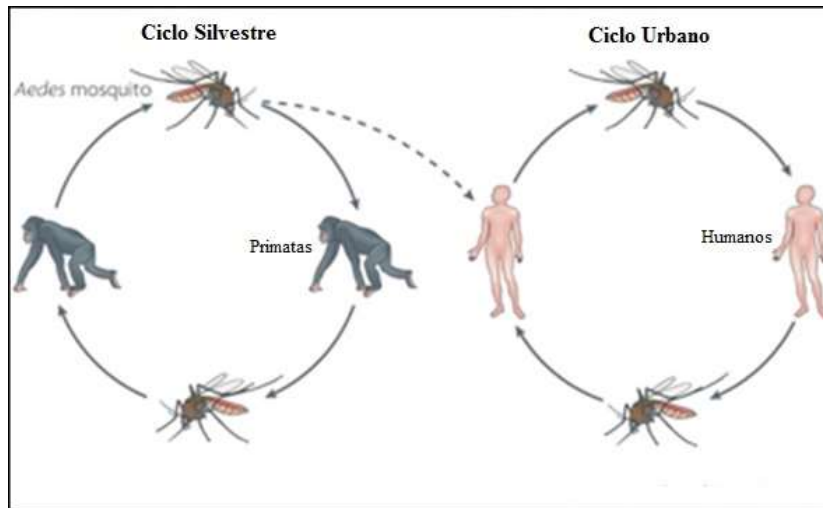


Figura 1.6 – Representação da transmissão do DENV. (Adaptado de ⁽³⁸⁾)

1.4.3. Ciclo de vida

1.4.3.1. No mosquito

A infecção provocada pelo vírus da dengue não tem um efeito patogénico direto sobre o vetor mosquito. ⁽⁶⁰⁾ O vírus da dengue que circula no sangue de seres humanos com virémia (infetados com DENV), é ingerido por mosquitos fêmea *Aedes aegypti* durante a alimentação (picada). Após a ingestão de sangue (contendo vírus), o vírus chega ao intestino médio do mosquito, ligando-se a recetores da superfície celular do epitélio do intestino do mosquito onde o vírus se pode replicar e tornar-se infeccioso, difundindo para o hemocélio (cavidade onde circula a hemolinfa, parte do sistema circulatório aberto de invertebrados) disseminando-se e infetando tecidos secundários, incluindo as glândulas salivares. ^(34,60) Após o período de incubação extrínseco de 8 a 12 dias (dependendo de fatores biológicos tais como a estirpe do mosquito e o genótipo do vírus e de condições ambientais como a temperatura, alimentação das larvas e quantidade de vírus ingeridos) ⁽³¹⁾ o vírus pode ser transmitido a outros seres humanos durante a subsequente picada (alimentação) do mosquito, permanecendo este como vetor infetante para o resto de sua vida. ^(8,34,60,65) Os seres humanos infetados são os principais portadores e transmissores de DENV, servindo como principal fonte do vírus para mosquitos não infetados. Para ocorrer a transmissão, a fêmea *Aedes aegypti* deve morder um humano infetado durante a fase virémica da doença, que dura geralmente 4 a 5 dias ou até 12 dias. ^(9,34,60) Há também evidências de laboratório e de campo de que a DENV pode ser transmitida verticalmente através de ovos infetados, proporcionando uma possível explicação para a capacidade do DENV persistir em áreas endémicas durante as estações secas ou frias. ⁽³¹⁾

1.4.3.2. No hospedeiro vertebrado

O tropismo celular do DENV é amplo e está adaptado para alternar entre dois hospedeiros diferentes: os seres humanos e os mosquitos. O DENV é capaz de infetar *in vitro* uma grande variedade de linhas celulares. No entanto, *in vivo*, somente alguns tipos de células humanas demonstraram suportar a replicação do DENV. O sistema hematopoético e principalmente as células da linhagem mieloide (células dendríticas, monócitos e macrófagos) são os principais locais de replicação do DENV, embora outras células de origem não hematopoiética, tais como as células de Kupffer, hepatócitos, células endoteliais, neurónios e microglia, possam também ser infetadas. ^(66,67)

Quando um mosquito infetado se alimenta de uma pessoa saudável, o vírus é inoculado por via subcutânea. ^(35,68) O vírus da dengue propaga-se principalmente através da pele, epiderme e derme, onde existem células dendríticas, sendo as células de Langerhans DC o primeiro alvo para a infecção. ^(69,70,71) Subsequentemente a proliferação de vírus ocorre em células-alvo, tais como monócitos e macrófagos. ⁽⁷²⁾

O vírus entra nas células hospedeiras por endocitose mediada por recetores, envolvendo a ligação da proteína viral a recetores de superfície existentes na membrana celular das células do hospedeiro. ⁽⁷³⁾

As moléculas-alvo mais importante no processo de entrada do vírus de dengue na célula do hospedeiro são os fatores de ligação e recetores (figura 1.7).

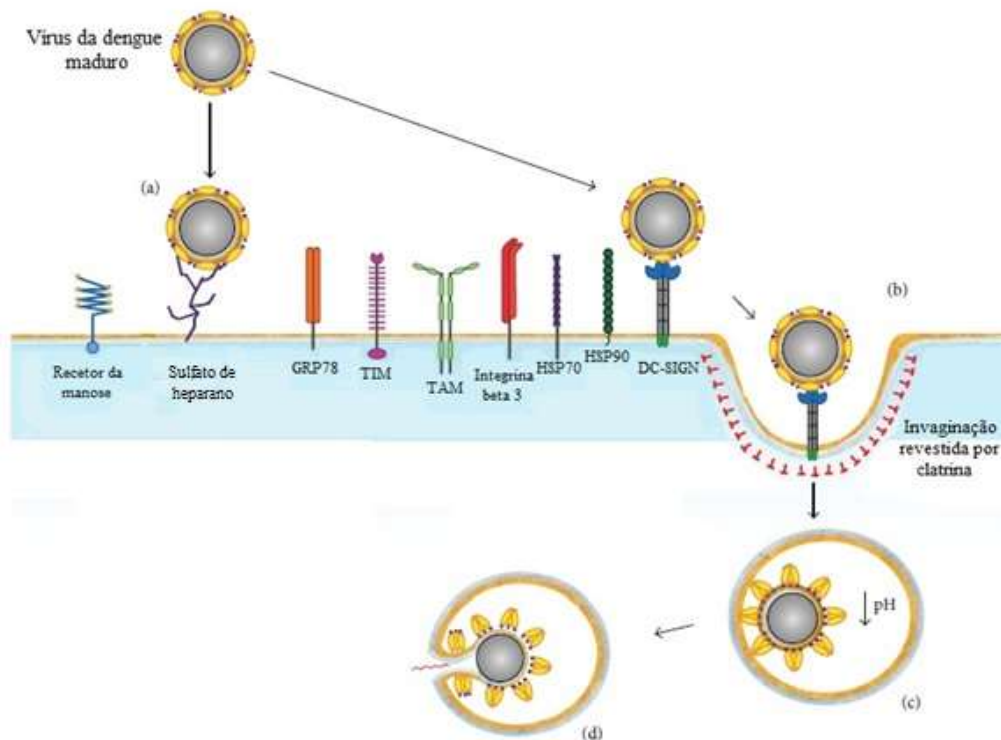


Figura 1.7 – Representação esquemática do processo de entrada do vírus da dengue na célula. O vírus da dengue utiliza recetores de membrana para entrada na célula. O vírus maduro liga-se a um recetor da membrana celular (a). A entrada na célula ocorre através da endocitose mediada por clatrina (b). Forma-se uma vesícula endocítica (c). A diminuição do pH na vesícula endocítica promove alterações conformacionais na proteína viral envelope (dímeros de proteínas passam a trímeros). Finalmente formam-se poros e o genoma do vírus é libertado no citoplasma da célula (d). (Adaptado de ⁽⁷⁴⁾)

Foram identificadas várias moléculas como possíveis recetores para o vírus em células de mamíferos, incluindo moléculas de adesão intercelular específicas de células dendríticas *3-grabbing nonintegrin* (DC-SIGN; CD209),^(75,76) o sulfato de heparano,⁽⁷⁷⁾ o CD14,⁽⁷⁸⁾ o recetor de manose,⁽⁷⁹⁾ as proteínas HSP90 / HSP70 (heat-shock protein),⁽⁸⁰⁾ a proteína 78, reguladora da glucose (GRP78),⁽⁸¹⁾ o recetor da laminina⁽⁸²⁾ e as proteínas TIM e TAM.⁽⁸³⁾ Existem evidências experimentais que sugerem que o vírus da dengue pode também entrar nas células humanas através da interação com outras moléculas, incluindo o recetor de vitronectina,⁽⁸⁴⁾ e a claudina 1.^(85,86) Vários desses recetores têm sido considerados alvos potenciais para o desenvolvimento de medicamentos contra o vírus de dengue. Tem sido sugerido que a ligação do vírus à célula pode necessitar de interações múltiplas e sequenciais com vários tipos de recetores. DC-SIGN e glicosaminoglicanos (GAGs) constituem a primeira linha de fatores de fixação. Uma segunda linha de recetores de afinidade mais elevados podem ser recrutados em seguida para permitir a entrada viral, fornecendo uma possível explicação para o tropismo diversificado de tecidos do vírus.⁽⁸⁷⁾

Até a data as bases moleculares da interação entre os recetores membranares e a proteína E do DENV não são ainda bem conhecidas.

DENV entra nas células humanas (e nas do mosquito) através de endocitose mediada por clatrina, formando-se uma vesícula endocítica.^(88,89,90,91,92) Van der Schaar et al (2008), demonstraram por rastreamento de partículas que as partículas de DENV se difundem ao longo da superfície da célula para uma invaginação pré-existente revestida de clatrina. Esta evolui para uma vesícula que contém o vírus, constituindo endossomas iniciais que subsequentemente amadurecem, formando endossomas finais.^(90,91)

Após a invasão e acidificação do endossoma (vesícula endocítica) ocorre a fusão das membranas virais e vesiculares mediada por alterações conformacionais na proteína E,⁽⁹³⁾ o que permite a libertação da nucleocápside no citoplasma da célula hospedeira. A nucleocápside encontra-se no interior do citoplasma, ocorrendo a libertação do genoma do vírus, que envolve a dissociação da proteína que constitui a cápside do ARN. O ARN viral de sentido positivo é libertado no citoplasma e funciona como um ARNm. A tradução do ARNm de uma única fase de leitura (Open Reading Frame -ORF) ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RER) produzindo uma grande poliproteína. A poliproteína viral é clivada em 10 proteínas maduras. A extremidade N-terminal da poliproteína codifica três proteínas estruturais (cápside, prM e E) e o resto do genoma

codifica sete proteínas não estruturais (NS). A maturação da poliproteína é realizada pelo hospedeiro e por proteases virais. O sinal da peptidase pelo hospedeiro no lúmen do RE é responsável pela clivagem N-terminal das proteínas prM, E, NS1 e NS4B, enquanto que o processamento da maioria das outras proteínas não estruturais, bem como a extremidade C-terminal da proteína da cápside, é efetuado pela protease viral NS2B-3 no citoplasma de células infetadas. ⁽⁵⁶⁾

A clivagem C-terminal da proteína NS1 é efetuada por uma protease não identificada, também localizada no lúmen do RE. Finalmente a protease furina é responsável pelo processamento da proteína prM no complexo de Golgi, durante a maturação da partícula viral. ⁽⁹⁴⁾

A síntese de ARN ocorre em estreita associação com membranas celulares dentro dos pacotes de vesículas, nos chamados complexos de replicação viral. O processo inicia-se com a síntese da cadeia negativa complementar de ARN, que serve como molde para a amplificação da cadeia positiva adicional do ARN genómico. A reação enzimática é catalisada pela proteína NS5, em associação com a NS3 e com outras proteínas virais NS, e presumivelmente com fatores do hospedeiro. Os genomas recém-sintetizados podem ser usados para a tradução de mais proteínas, ou associam-se com a cápside para gerar novas partículas virais. Uma vez formadas, as nucleocápsides passam ao lúmen do RE onde adquirem a bicamada lipídica em conjunto com as proteínas virais E e prM. As partículas recém-produzidas sofrem maturação no complexo de Golgi (através da via secretória). A proteólise da proteína de prM mediada pela furina tem lugar na rede trans-Golgi, provocando um rearranjo, conduzindo a homodimerização da proteína E e a formação de partículas virais maduras. ⁽⁹⁵⁾

Os vírus maduros são libertados da célula hospedeira infetada por exocitose e vão infetar outras células do corpo, continuando assim a infeção. ⁽⁴²⁾ O ciclo de replicação viral encontra-se esquematizado na figura 1.8.

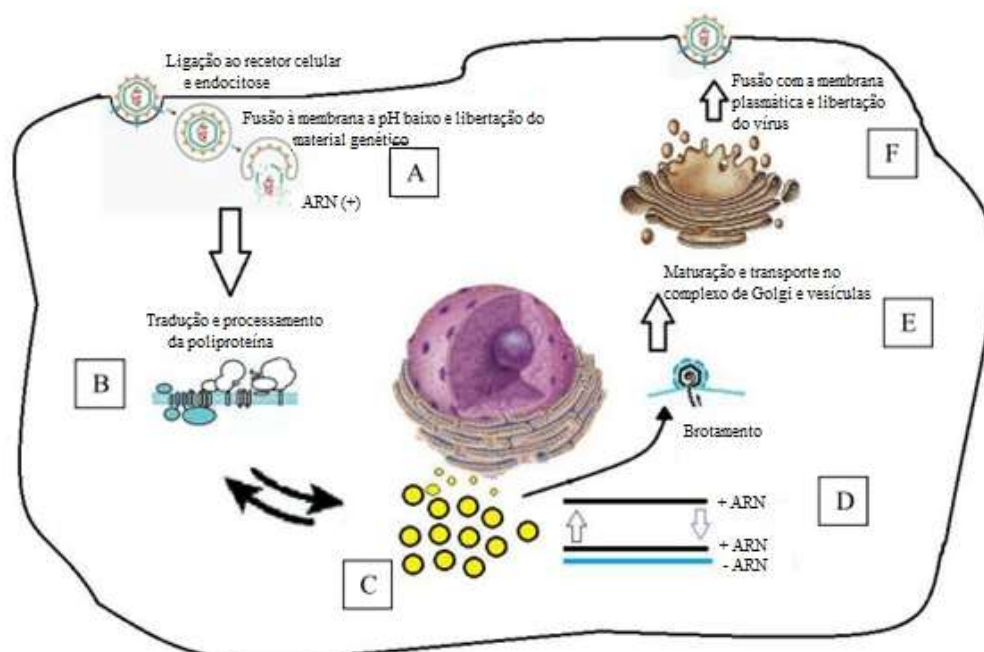


Figura 1.8 – Ciclo de replicação viral. A entrada da partícula viral ocorre por endocitose mediada por recetores. A pH ácido, no endossoma, a proteína E sofre mudanças conformacionais que levam a fusão das membranas viral e endossômica (a). O ARN viral é traduzido e inicia-se o processo de replicação (b). A montagem das partículas virais ocorre no RE (c,d), e as novas partículas imaturas recém formadas seguem pela via de secreção e completam a maturação no Complexo de Golgi (e). Posteriormente os vírus são libertados pela célula hospedeira (f). (Adaptado de ⁽⁹⁶⁾).

1.5. Manifestações clínicas

O número de focos de dengue aumentou na última década, o que contribuiu para o aumento anual da população em risco. A OMS estima que mais de 3,5 bilhões de pessoas estão em risco de infecção pelo DENV, surgindo cerca de 390 milhões de novas infecções em cada ano, das quais 96 milhões são sintomáticas. ⁽²³⁾

A dengue é uma patologia que apresenta um amplo espectro clínico. Embora muitas infecções provocadas pelo vírus da dengue (DENV) em crianças mais jovens pareçam ser assintomáticas, as crianças mais velhas e os adultos costumam apresentar sintomas. A razão entre casos assintomáticos/sintomáticos é influenciada por uma variedade de fatores, incluindo o estado imunológico do indivíduo e a estirpe do vírus infetante. A infecção com qualquer um dos quatro serotipos de DENV tem potencial para envolver todos os órgãos humanos e pode causar uma grande variedade de manifestações clínicas que variam de doença febril leve a doença grave e mortal. ^(29,34) A figura 1.9 ilustra as manifestações clínicas da infecção provocada pelo vírus da dengue.

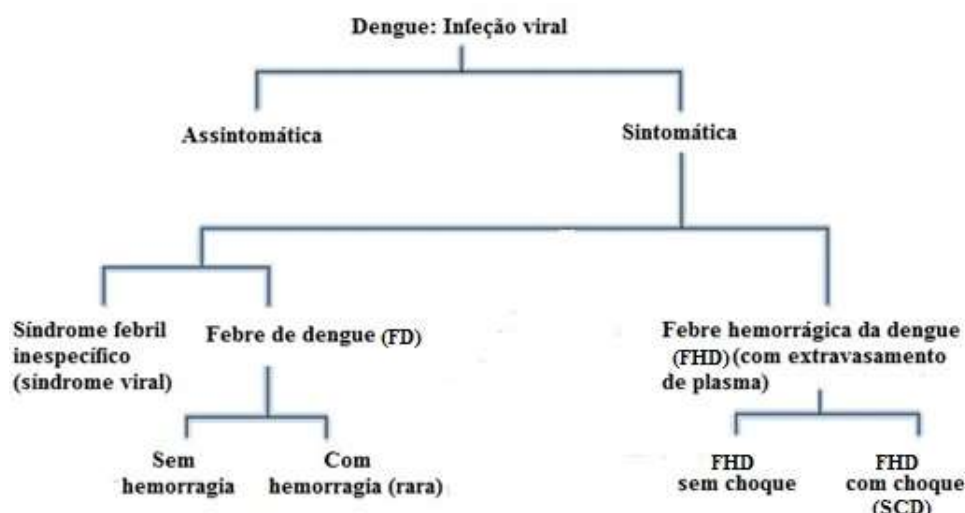


Figura 1.9 – Representação esquemática das manifestações da infecção provocada pelo vírus da dengue. (Adaptado de ⁽⁹⁷⁾).

Surgiu na década de 1960 uma visão clássica que defendeu que a doença sintomática da dengue poderia ser separada em duas categorias, conforme os diferentes síndromes clínicos: febre de dengue (FD) e febre hemorrágica mais severa de dengue (FHD). A FD foi descrita como uma doença febril não específica, com sintomas proeminentes, enquanto a FHD foi definida como um síndrome distinto caracterizado por aumento da permeabilidade vascular, alterações de hemostasia e hemorragias ^(98,99,100). Porém, ao longo dos últimos 50 anos tornou-se claro que existe um espectro contínuo de doença e que estas características particulares, embora muitas vezes apresentadas em conjunto, não são requisitos absolutos de doença grave, pois podem também ser observadas em casos menos complicados. ^(101,102,103,104,105) Por conseguinte o sistema de classificação foi revisto, tendo contudo sido adotado pela Organização Mundial de Saúde em 2009, separando a doença clínica de dengue em duas categorias principais, dengue e dengue grave (severa), de acordo com várias outras doenças de importância global que, segundo a OMS vão de doença febril a doença severa, podendo em alguns casos ser fatal.

1.5.1. Descrição clínica geral da patologia da dengue sintomática

Na sequência de uma picada de mosquito infetado há um período de incubação que dura até 2 semanas (geralmente 5-7 dias) após o qual o indivíduo desenvolve sintomas repentinos. A doença, segue geralmente três fases: uma fase febril inicial, uma fase crítica que começa 4-5 dias após o início da febre, quando as complicações podem desenvolver-se, seguindo-se a fase de recuperação espontânea, ^(31,34) figura 1.10.

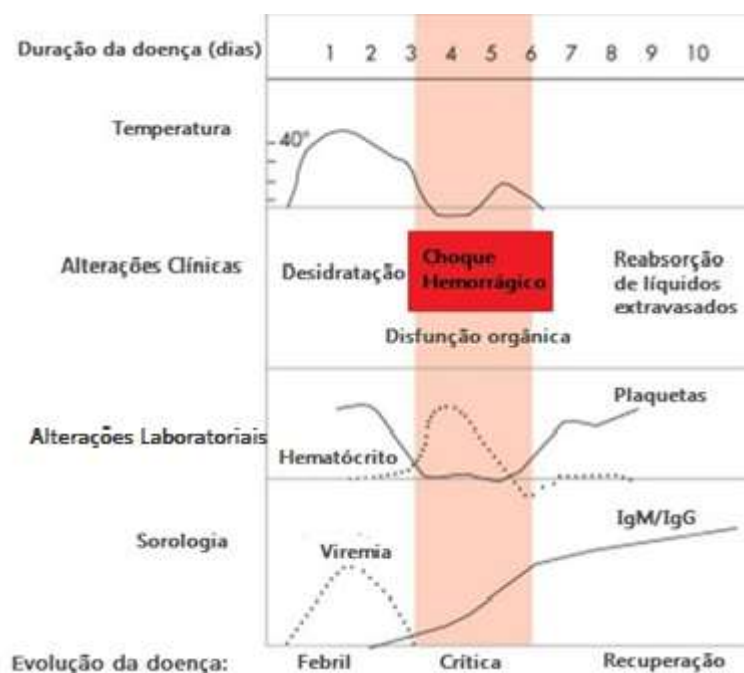


Figura 1.10 – Evolução clínica da doença da dengue. (Adaptado de ⁽³⁴⁾).

A fim de garantir um bom resultado para esta doença dinâmica e multifacetada é importante que os médicos estejam cientes da gama de problemas clínicos que podem surgir durante as diferentes fases da doença. A chave é o reconhecimento precoce e a compreensão dos problemas clínicos durante as diferentes fases da doença, levando a uma abordagem racional para a gestão de casos e um bom resultado clínico. Uma resposta da linha de frente, bem gerida não só reduz o número de internamentos hospitalares desnecessárias, mas também salva a vida de pacientes com dengue. ⁽³⁴⁾

1.5.1.1. Fase febril

A fase febril tem geralmente a duração de 3 a 7 dias. O paciente tem um início súbito de febre alta 39-40° C, acompanhado por sintomas inespecíficos, incluindo dor de cabeça, mal-estar geral, náuseas, vômitos, mialgia e dor nas articulações. ^(106,107,108,109) A dor de cabeça pode ser grave e é frequentemente associada a uma sensação de pressão atrás dos olhos, juntamente com dor no movimento dos olhos. Outros sintomas comuns incluem sensação de alteração do paladar, dor abdominal tipo cólica, constipação ou diarreia e, ocasionalmente, disúria. Tosse, dor de garganta e rinorreia estão por vezes também presentes, mas são observados com menos frequência do que é habitual em outras doenças virais. ^(110,111) Ocasionalmente, a temperatura pode subir para 40-41°C durante estes primeiros dias, podendo ocorrer convulsões febris em crianças mais suscetíveis.

No exame efetuado observa-se rubor facial, derrame conjuntival e eritema generalizado do tronco. É comum um discreto aumento generalizado dos nódulos linfáticos. O fígado é muitas vezes palpável e macio embora raramente marcadamente aumentado, não sendo comum a icterícia. A esplenomegalia é ocasionalmente observada em crianças pequenas. Manifestações hemorrágicas leves, como petéquias na pele e / ou hematomas nos locais de punção venosa, são por vezes observados, embora a maioria dos pacientes não sintam nenhum sangramento no momento da punção. Ocorre por vezes sangramento da mucosa, a partir do nariz, gengivas, ou dos tratos gastrointestinal ou geniturinários, mas geralmente não é clinicamente significativo. O exame de urina revela frequentemente hematúria microscópica e, em pacientes do sexo feminino pós-púberes, pode ocorrer sangramento menstrual anormalmente elevado. ⁽³¹⁾

Os dados laboratoriais incluem trombocitopenia e leucopenia leve a moderada, muitas vezes com elevação discreta das transaminases hepáticas. ^(112,113) A febre alta persiste por 3-7 dias e, normalmente, termina abruptamente. Ocasionalmente, um padrão de Saddleback pode ser observado com uma queda inicial na temperatura seguido por um breve recrudescimento da febre moderada. Com a progressão da doença o paciente torna-se anoréxico e pode mostrar marcada letargia e prostração. Quando a temperatura baixa, a maioria dos pacientes recupera sem complicações. No entanto, um pequeno número de indivíduos pode vir a desenvolver complicações em todo o tempo febril; a rápida identificação desses indivíduos, bem como a sua transição para a fase crítica, é essencial para facilitar a gestão eficaz dos processos, ⁽³¹⁾ uma vez que as manifestações clínicas são indistinguíveis entre os casos de dengue e dengue grave. Portanto a monitorização do aparecimento dos sinais de gravidade e outros parâmetros clínicos (tabela 1.1) são cruciais para reconhecimento do início da fase crítica. ⁽³⁴⁾

1.5.1.2. Fase crítica

A fase crítica tem início entre os 3º a 6º dia da doença, tendo geralmente uma duração de 48-72 horas. Pode desenvolver-se um conjunto de problemas sistémicos nesta fase da doença. A complicação mais temida é uma vasculopatia inexplicável pela qual um aumento da permeabilidade vascular resulta num síndrome de vazamento capilar. As elevadas perdas de plasma podem levar a choque hipovolémico, uma complicação potencialmente fatal mas que ocorre num pequeno número de casos. A permeabilidade capilar alterada é muitas vezes acompanhada de manifestações hemorrágicas e alterações

hematológicas. Estas três características estão muitas vezes presentes em conjunto, sendo contudo aceite que a infeção por dengue altera diferentes sistemas fisiológicos em diferentes graus em cada paciente e que a relativa importância das anormalidades resultantes determina o quadro clínico geral. ^(102,110)

Não existe um acontecimento específico que determine o início desta fase, mas muitas vezes o derrame vascular torna-se aparente cerca de 3-4 dias desde o início da doença, com choque (caso ocorra), que tipicamente se desenvolve dentro de 24 horas a partir do período defervescente. O envolvimento de órgãos específicos pode ser observado em alguns indivíduos, geralmente como consequência secundária dos desarranjos sistémicos citados acima (os efeitos são suficientemente graves para comprometer a perfusão tecidual e a oxigenação), mas a infeção por dengue também pode afetar diretamente órgãos específicos. ⁽³¹⁾

A leucopenia progressiva, ⁽¹¹⁴⁾ seguida por uma rápida diminuição do número de plaquetas, precede geralmente a perda de plasma. Neste ponto, os pacientes que não sofreram aumento na permeabilidade capilar irão melhorar mas aqueles que sofreram aumento da permeabilidade capilar podem piorar devido ao volume de plasma perdido. O grau de perda de plasma é variável. O derrame pleural e ascítico pode ser clinicamente detetável, dependendo do grau de fuga de plasma e do volume de terapia de fluido (a radiografia ao tórax e a ultrassonografia abdominal podem ser ferramentas úteis para o diagnóstico). O aumento, acima do hematócrito basal, reflete muitas vezes a severidade da perda de plasma.

O choque ocorre quando um volume crítico de plasma é perdido por extravasamento. Muitas vezes é precedido por sinais de alerta. A temperatura do corpo pode ser mais baixa que a normal quando ocorre o choque. Com choque prolongado ocorre a hipoperfusão dos órgãos, resultando em insuficiência progressiva dos mesmos, acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada. Este quadro conduz a hemorragia grave, causando a diminuição do hematócrito nos casos de choque severo. Em vez da leucopenia geralmente observada durante esta fase da dengue, a contagem de glóbulos brancos total pode aumentar em pacientes com hemorragia grave. ⁽¹¹⁵⁾

Pacientes que melhorem após o período defervescente são considerados casos de dengue não grave. Alguns pacientes evoluem para casos mais graves e irão manifestar sinais de alerta (tabela 1.1). Os casos de dengue que apresentem estes sinais

provavelmente irão recuperar com re-hidratação venosa precoce, no entanto alguns casos poderão evoluir para dengue grave.

Tabela 1.1 – Sinais de alarme. (Adaptado de ⁽³⁴⁾).

Clínicos	Dor abdominal ou sensibilidade Vômitos persistentes Acumulação de fluidos Sangramento das mucosas Letargia, agitação Aumento do fígado (> 2 cm)
Laboratoriais	Aumento do hematócrito (HCT) e rápida diminuição na contagem de plaquetas

1.5.1.3. Fase de recuperação

A fase de recuperação inicia-se geralmente entre o 6º e o 8º dia de doença. Sintomas como o aumento da permeabilidade vascular e hemostasia anormal são transitórios e normalmente desaparecem ao fim de 48 -72 horas. A reabsorção espontânea de fluido corporal inicia-se entre do 6º e o 8º dia da doença e progride rapidamente, sendo geralmente concomitante com a melhoria dos sintomas nos pacientes. Com uma gestão cuidadosa durante a fase crítica, o resultado é geralmente bom, com convalescença curta e sem incidentes, especialmente em crianças. No entanto a convalescença pode ser prolongada em adultos, que por vezes apresentam cansaço profundo, astenia e depressão durante a recuperação. ⁽¹¹⁶⁾ A perda de cabelo também foi observada durante a convalescença. ⁽¹¹⁷⁾

A disfunção de órgãos específicos (por exemplo insuficiência hepática ou miocardite) podem persistir por várias semanas após a resolução da vasculopatia. Muito raramente, complicações como *linfo-histiocitose hemofagocítica* podem ser identificadas em pacientes com febre persistente durante a fase de recuperação. ^(118,119,120,121)

Aparece por vezes uma nova erupção cutânea durante a transição da fase crítica para a fase de recuperação, particularmente em crianças mais velhas e adultos, variando de uma erupção maculopapular leve a uma aparência intensa com eritema e petéquias densas intercaladas com ilhas de pele pálida. O hematócrito estabiliza ou pode ser inferior,

devido ao efeito de diluição do fluido reabsorvido. As manifestações clínicas observadas nas diferentes fases de dengue encontram-se resumidas na tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Fases febril, crítica e de recuperação na dengue. (Adaptado de ⁽³⁴⁾)

Fases	Sintomas
Febril	Desidratação. Febre alta pode causar alterações neurológicas e crises convulsivas em crianças. Dificil diferenciação com outras doenças febris.
Crítica	Choque por extravasamento plasmático. Hemorragia grave. Comprometimento orgânico.
Recuperação	Hipervolemia em pacientes que receberam reposição volêmica excessiva ou que se prolongou a este período.

1.5.2. Dengue

Pacientes que apresentem a sintomatologia de caso de base (indicada na figura 1.11) são diagnosticados como tendo dengue e o quadro pode evoluir para dengue grave se o paciente desenvolver qualquer uma das três grandes classes de complicações descritas. Pretende-se que o sistema seja simples e intuitivo, tornando-se de preferência rotineiramente incorporado em cada avaliação clínica, de modo a facilitar a abertura imediata do algoritmo de tratamento relevante se qualquer uma das complicações se desenvolver. No final do episódio de doença deve ser reportada a classificação final para fins epidemiológicos, possibilitando assim a recolha de dados de vigilância normalizados. ⁽³¹⁾

Dada a heterogeneidade acentuada da doença da dengue foram levantadas preocupações sobre o potencial excesso de diagnóstico usando este sistema. ⁽¹²²⁾ No entanto, como a figura indica, quando não há sinais de vazamento de plasma (o indicador patognomónico de envolvimento vascular), a confirmação laboratorial da dengue é desejável. Estão em curso investigações para tentar identificar os melhores marcadores clínicos da doença da dengue, por forma a desenvolver um diagnóstico laboratorial confiável e acessível para uso em áreas endémicas.

1.5.2.1. Dengue com sinais de alerta

Durante a transição do estado febril para as fases críticas é crucial para os clínicos terem em atenção os sinais de alerta de que o paciente possa estar a desenvolver um derrame vascular significativo. Estes sinais de deterioração iminente incluem vômito persistente, dor abdominal cada vez mais intensa, tendência para hepatomegalia, uma subida alta do hematócrito com uma rápida diminuição na contagem de plaquetas, efusões serosas, sangramento das mucosas e letargia ou agitação. No entanto, também é importante lembrar que alguns pacientes podem evoluir para dengue grave sem apresentarem sinais de alerta. Em princípio, o desenvolvimento de qualquer sinal de alerta deveria sinalizar a necessidade de internamento hospitalar, para observação e consideração de intervenção precoce.⁽³¹⁾

1.5.2.2. Dengue grave

São classificados como tendo dengue grave os doentes que apresentem, em qualquer momento do decurso da doença, um ou vários dos problemas que seguidamente se listam: perda de plasma resultando em choque e / ou acumulação de líquido suficiente para causar desconforto respiratório; hemorragia grave; grave disfunção de órgãos (como miocardite grave ou comprometimento hepático). Um sistema em que qualquer manifestação grave classifica os pacientes com dengue grave é considerado preferível para a vigilância e deve facilitar a comunicação mais padronizada. A SCD permanece proeminente na lista de complicações e concentra a atenção na permeabilidade capilar alterada, extravasamento de plasma e choque como as primeiras manifestações de doença grave. A hemorragia severa também está incluída, embora seja reconhecida como uma complicação menos comum, enquanto a incorporação de envolvimento grave em órgãos como uma entidade específica dá aos clínicos a oportunidade de relatar casos que foram previamente ignorados. As definições finais quanto ao que deve qualificar para o envolvimento grave de órgãos específicos (por exemplo, envolvimento hepático) são suscetíveis de exigir refinamento adicional ao longo do tempo,⁽¹¹³⁾ mas o atual sistema é concebido para permitir a extensão de síndromas graves associados com a infeção por dengue.

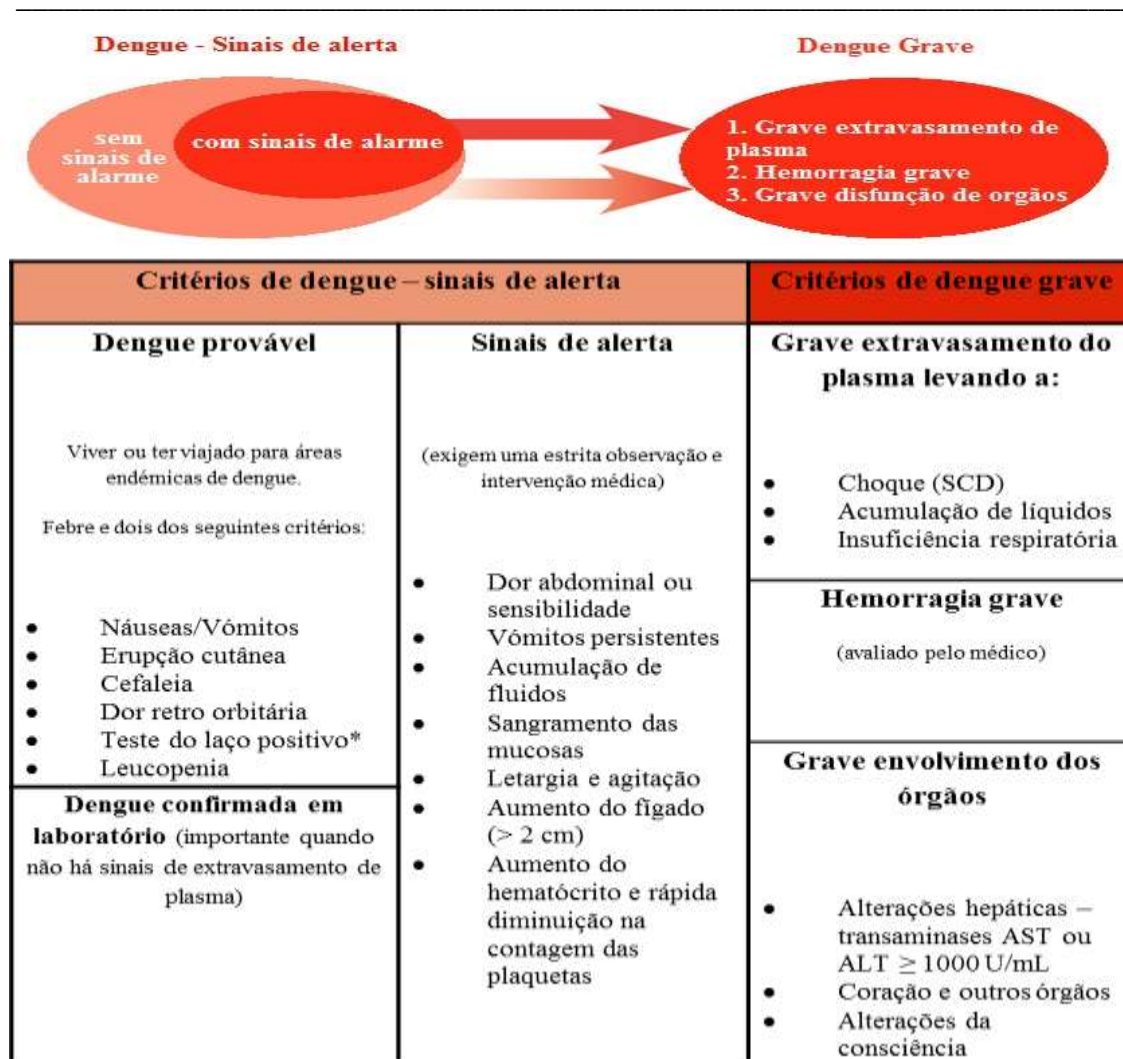


Figura 1.11 – Sugestão de classificação de casos de dengue com diferentes níveis de gravidade. (Adaptado de ⁽³⁴⁾)

*Teste do laço - A pressão arterial é medida utilizando um esfigmomanómetro (aparelho normal de medir pressão arterial). A pressão da braçadeira é aumentada para metade do valor entre a pressão sistólica e diastólica durante 5 minutos, em seguida é retirada. Depois de 1 minuto, ou após a circulação normal da pele, é observado o resultado. O teste é considerado como sendo positivo se existir um valor \geq a 10 petéquias/mm³, como observado na figura 1.12. ⁽¹²³⁾



Figura 1.12 – Teste do laço positivo. (Adaptado de ⁽³¹⁾)

1.6. Diagnóstico

O diagnóstico eficiente e preciso da dengue é de primordial importância para os cuidados clínicos (ou seja, a detecção precoce de casos graves, a confirmação de casos e o diagnóstico diferencial com outras doenças infecciosas) bem como as atividades de vigilância, o controlo de surtos, a patogénese, a pesquisa académica, o desenvolvimento de vacinas e os ensaios clínicos. ^(124,125,126,127)

A febre da dengue pode ser facilmente confundida com outras doenças, especialmente em países não epidémicos. Considerando que possui um amplo espectro clínico, há a necessidade de pensar em possíveis diagnósticos diferenciais. Dependendo da origem geográfica do paciente, outras etiologias - incluindo infeções por flavivírus não-dengue devem ser descartadas. Estas incluem febre amarela, encefalite japonesa, encefalite de ST. Louis e do Nilo Ocidental, outras causas de febre, como a rubéola, mononucleose infecciosa, malária, leptospirose, febre tifoide, riquetsiose, sarampo, enterovirose, influenza, síndromes gripais e febres hemorrágicas (ébola). ⁽³⁴⁾

A infeção pelo DENV produz um largo espectro de sintomas, muitos dos quais não são específicos. Assim, um diagnóstico baseado apenas em sintomas clínicos não é confiável. A rápida confirmação laboratorial do diagnóstico clínico pode ser valiosa, porque em alguns pacientes ocorre um progresso muito rápido da doença, num curto período de tempo, podendo evoluir para dengue grave e por vezes conduzir à morte. Uma intervenção rápida pode salvar vidas. ⁽³¹⁾

Foi desenvolvida uma variedade de métodos de diagnóstico laboratorial para apoiar a gestão do paciente e controlo da doença. A escolha do método de diagnóstico depende da finalidade para a qual o teste é efetuado (por exemplo, diagnóstico clínico, vigilância epidemiológica, desenvolvimento de vacinas), do tipo de instalações laboratoriais e conhecimentos técnicos disponíveis, dos custos e do tempo da colheita da amostra. ⁽³⁴⁾

Existem métodos diretos e indiretos para diagnóstico do DENV. Os métodos diretos incluem o isolamento do vírus, o isolamento do ARN viral e a detecção de antígenos. Nos métodos indiretos incluem-se as investigações sorológicas. No seu conjunto, estes testes constituem as ferramentas de diagnóstico de dengue. ^(126,127)

Em geral, os testes com alta sensibilidade e especificidade exigem tecnologias mais complexas e experiência técnica, enquanto os testes rápidos podem comprometer a sensibilidade e especificidade devido à rapidez e facilidade de execução. O isolamento

do vírus e detecção de ácido nucleico são mais trabalhosos e caros, mas também são técnicas mais específicas do que a detecção de anticorpos usando métodos sorológicos. ⁽³⁴⁾ Enquanto os métodos diretos mostram ser de maior confiança, os métodos indiretos mostram uma maior oportunidade para o diagnóstico, sendo os mais amplamente aplicados à prática de rotina. Como representado na figura 1.13 existe uma relação inversa entre a facilidade de utilização e acessibilidade de um método de diagnóstico e a confiança nos resultados do teste.

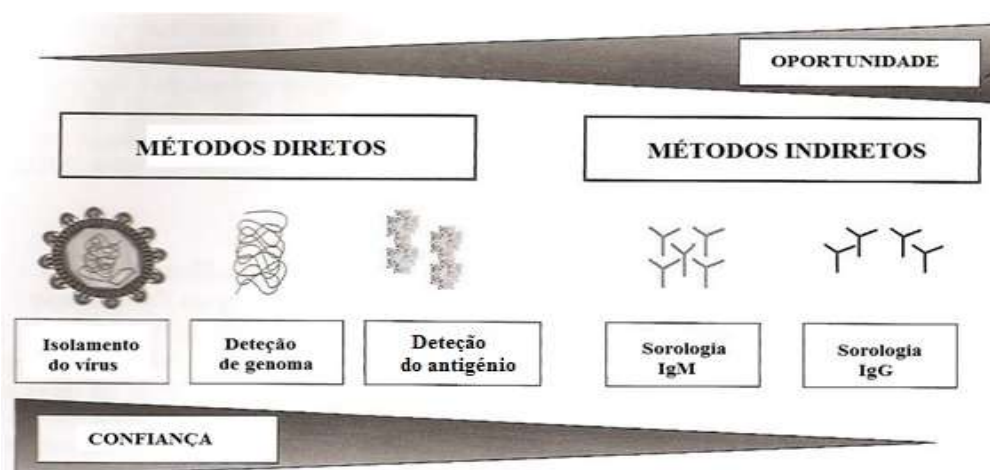


Figura 1.13 – Métodos laboratoriais utilizados para o diagnóstico da infecção por dengue. (Adaptado de ⁽¹²⁷⁾).

Os principais avanços no diagnóstico da dengue incluem inoculação do mosquito, linhas de células de mosquito e anticorpos monoclonais específicos para o isolamento e identificação do DENV, diagnóstico serológico para IgM por ELISA, a aplicação da cadeia de reação da transcriptase-polimerase inversa, (RT-PCR) e RT-PCR em tempo real, para detecção e quantificação do genoma e, mais recentemente, a detecção da proteína NS1. ⁽³¹⁾ A tabela 1.3 mostra os principais avanços no diagnóstico da dengue, por década.

Tabela 1.3 – Avanços no diagnóstico da dengue por década. (Adaptado de ⁽³¹⁾)

Década	Isolamento viral	Sorologia	Deteção do gene	Deteção do Ag
1950-1960	Ratos recém-nascidos	IH + CF		
1970-1980	Linhas celulares de mamíferos Inoculação de mosquito			
1980-1990	Linhas celulares de mosquitos + IFA (anticorpos monoclonais imunofluorescentes)			Imunohistoquímica para deteção de antígeno
1990-2000		IgG ELISA	RT/PCR	
2000-2011	Frascos específicos para isolamento do vírus	Kits comerciais (ELISA e testes rápidos)	Tempo real RT/PCR	Deteção de antígeno NS1

Os marcadores de diagnóstico a serem estudadas durante uma infeção por dengue dependem do tempo de infeção, da resposta imune e dos métodos e técnicas a serem utilizadas. Durante as fases iniciais da doença, o isolamento do vírus e a deteção de antígenos e de ácido nucleico podem ser usados para diagnosticar a infeção. A Sorologia é o método de escolha para o diagnóstico no final da fase aguda da doença. Uma vez que um indivíduo é mordido por um mosquito infetado, o período de incubação é de 4 a 10 dias. A Virémia é observada 2-3 dias antes do início da febre e 5-6 dias após esta. ⁽⁶⁸⁾ Durante o período de virémia, o vírus pode ser isolado e podem ser detetados o ARN e a proteína NS1.

Um indivíduo pode desenvolver até quatro casos de dengue, um por cada um dos serotipos da dengue. Dependendo do número de infeções, o indivíduo desenvolve uma resposta primária, secundária, terciária ou quaternária à infeção. Os anticorpos anti dengue IgM são detetados na maior parte dos casos 5 a 6 dias após o início da febre e, geralmente, durante 60-90 dias, mas, por vezes, até 6 meses. ^(125,128) Na infeção primária, os anticorpos IgG começam a aparecer alguns dias após o anticorpo IgM, geralmente entre os 7-9 dias de febre. A concentração de anticorpos continua a subir lentamente durante um período de semanas e os anticorpos permanecem detetáveis provavelmente por toda a vida. Em infeções secundárias, os anticorpos IgG sobem rapidamente quase

imediatamente após o início da febre, atingindo níveis elevados na maioria dos pacientes, como ilustra a figura 1.14.

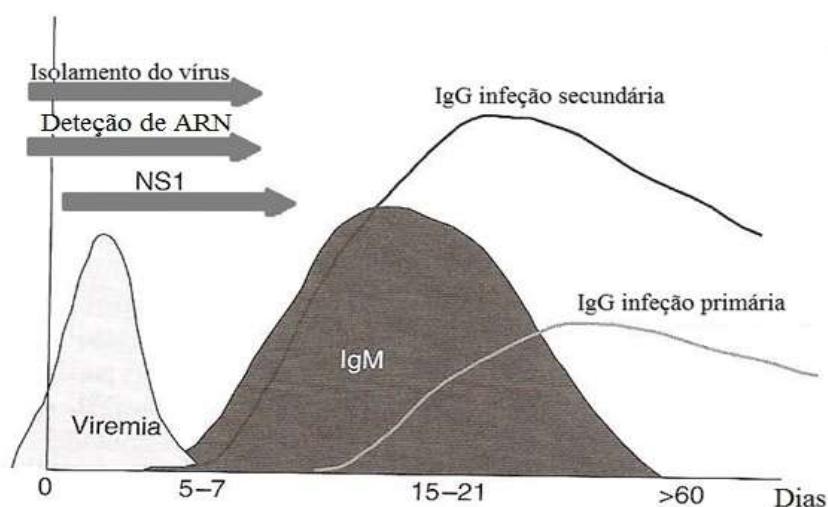


Figura 1.14 – Marcadores para o diagnóstico da dengue. (Adaptado de ⁽³¹⁾)

Anticorpos IgM, bem como um elevado título de anticorpos IgG no soro, são utilizados como marcadores de uma infecção recente da dengue. A detecção de um aumento de quatro vezes de IgG ou IgM para seroconversão de anticorpos em soros emparelhados é considerado como confirmativo de infecção. Os estudos de diagnóstico de dengue permitem a confirmação de doença aguda, inicial ou tardia, bem como a convalescência da infecção por dengue. A tabela 1.4 apresenta os métodos de diagnóstico, as técnicas e as amostras clínicas para a dengue.

Tabela 1.4 - Métodos de diagnóstico, técnicas e amostras clínicas para a dengue. (Adaptado de ⁽³¹⁾).

Métodos de diagnóstico	Técnica	Amostra clínica	Tempo de recolha de amostra	Condições de refrigeração
Isolamento do vírus	Inoculação de cultura de células de mosquito	Soro, plasma, tecidos	Recolha na fase aguda	2-8°C para 1 dia -80°C para longos períodos
Deteção de antígeno	Deteção de NS1 Deteção de antígeno por imunohistoquímica	Soro, plasma, tecidos	Recolha na fase aguda	2-8°C para 1 dia -80°C para longos períodos

Deteção de genoma	RT-PCR Tempo real RT-PCR	Soro, plasma, tecidos, tecidos em parafina	Recolha na fase aguda	
Sorologia	Deteção de IgM Deteção de IgG	Soro, plasma, sangue recolhido em papel de filtro Soros ou plasma emparelhados, sangue recolhido em papel de filtro	Recolha após 5-6 dias de febre Recolha de soros na fase aguda nos primeiros 5 dias de febre; Soros convalescentes 15-21 dias após a recolha da amostra na fase aguda	2-8°C para 1 ou 2 dias -20°C para longos períodos

Sendo a dengue uma doença aguda, o diagnóstico precoce pode ser importante para a gestão de casos. O soro e o plasma são as amostras de escolha para a maioria dos diagnósticos da dengue. Dependendo do tempo de colheita, eles podem ser testados para o vírus / ARN / deteção de antígenos ou para estudos sorológicos. Nos casos fatais, soro, plasma, tecidos e coágulos são úteis para a deteção de vírus.

Sendo o DENV é termolábil, as condições de armazenamento devem ser cuidadosamente consideradas, tal como referido na tabela 1.4. Os dados mínimos de acompanhamento da amostra incluem: informação geral do paciente, antecedentes de vacinação a Flavivírus, data de início da doença, data da colheita da amostra, tipo de amostra e diagnóstico clínico presuntivo.

1.6.1. Diagnóstico da dengue aguda

A deteção durante a fase aguda da doença permite o diagnóstico precoce do caso, o que pode ser importante para a gestão dos casos clínicos. Sendo a duração da doença curta, a amostra clínica deve ser recolhida tão cedo quanto possível, de preferência nos primeiros três dias do início da febre. As ferramentas disponíveis para o diagnóstico precoce incluem diagnósticos moleculares, tais como RT-PCR RT-PCR em tempo real (permitindo a confirmação da infeção e identificação serotipo) e a deteção da proteína NS1. A amostra na fase aguda é também útil para o isolamento do vírus.⁽³¹⁾

1.6.2. Diagnóstico convalescente precoce e tardio

A virémia da dengue correlaciona-se com o início da febre, atingindo o pico da febre entre 2-3 dias. ⁽¹²⁹⁾ Após este período, a virémia, bem como a NS1, diminui, coincidindo com o desenvolvimento de anticorpos, apesar de ter sido isolado o DENV nos 12 dias após o início da doença. ⁽¹³⁰⁾ A serologia é o método de escolha para o diagnóstico convalescente tardio e agudo. A detecção específica de IgM, bem como níveis altos específicos de IgG em único soro permitem a confirmação de uma provável infecção recente e, enquanto a seroconversão IgM e / ou IgG ou aumento de quatro vezes dos títulos de IgG em soros emparelhados permitem a confirmação da infecção.

1.6.3. Confirmação laboratorial de dengue

A detecção de vírus / ARN viral / antígeno e a detecção de uma resposta de anticorpos específica, são os métodos preferíveis para o diagnóstico da dengue. O diagnóstico laboratorial é considerado como altamente sugestivo de uma infecção por dengue quando a IgM anti-DENV é detetada numa amostra de soro ou quando o título de IgG medido por teste ELISA ou IH mostra uma resposta serológica secundária numa única amostra de soro. O diagnóstico só é confirmado quando o RT-PCR é positivo, o vírus pode ser isolado, um antígeno específico é detetado em tecidos ou soro ou quando a serologia demonstra uma seroconversão de IgM ou de IgG ou um aumento de quatro vezes no título de IgG em soros emparelhados, ^(34,126,127) tabela 1.5.

Tabela 1.5 – Interpretação dos resultados do diagnóstico da dengue. (Adaptado de ⁽³⁴⁾).

Altamente sugestivo/dengue provável	Confirmação de dengue
IgM positivo (amostra única) ou alta quantidade de IgG por teste IH, ELISA ou teste de neutralização	Qualquer um dos seguintes: -Isolamento do vírus -Detecção do genoma -Detecção de antígeno (NS1 no sangue, antígenos específicos nos tecidos) IgM ou IgG seroconversão para soros emparelhados -Aumento de quatro vezes a quantidade de anticorpos em soros emparelhados

1.6.4. Métodos de diagnóstico para detecção da infecção por DENV

1.6.4.1. Isolamento de vírus

O vírus da dengue está entre os arbovírus mais difíceis de isolar. O primeiro isolamento foi conseguido na década de 1940 por inoculação intracerebral de soro do paciente no cérebro de ratos de amamentação. ^(131,132) O isolamento do vírus em linhas de células de mamíferos foi introduzido nos anos 1960, seguido pelo isolamento direto no mosquito e em inoculações de células de mosquito. ^(133,134)

As infecções de dengue podem ser diagnosticadas por isolamento do vírus durante o período febril, de 1 a 2 dias, e até 12 dias após o início da doença. ^(129,130) O isolamento do vírus é considerada o padrão ouro para o diagnóstico da dengue, mas só é realizado em laboratórios com uma infra-estrutura adequada e conhecimentos técnicos.

As amostras adequadas para o isolamento do vírus são: soro da fase aguda da doença, plasma, células mononucleares periféricas e tecidos recolhidos em autópsia em casos fatais (especialmente fígado, baço, nódulos linfáticos e timo), e mosquitos recolhidos a partir das áreas afetadas. ^(31,97)

Todas as recolhas de amostras devem ser feitas em condições estéreis. Como o DENV é termolábil, as amostras devem ser enviadas para os laboratórios refrigeradas ou em gelo seco, o mais rapidamente possível. Em curtos períodos de armazenamento (até 48 horas) as amostras para o isolamento do vírus podem ser mantidas entre 4 e 8 ° C. Para um armazenamento mais longo, o soro deve ser separado e congelado a -70 ° C, mantendo-o a uma temperatura que garanta a congelação da amostra. Se o isolamento for efetuado a partir de leucócitos, as amostras de sangue heparinizado devem ser entregues no laboratório dentro de algumas horas. Sempre que possível, o material original (soro virémico ou pools de mosquitos infetados) e as amostras devem ser preservadas para estudo futuro.

Os tecidos e mosquitos são triturados antes da inoculação. A escolha dos métodos de isolamento e identificação do vírus da dengue dependerá da disponibilidade local de mosquitos, cultura de células e capacidade dos laboratórios. A inoculação de soro ou plasma em mosquitos é o método mais sensível para o isolamento do vírus, mas a cultura de células de mosquito é o método mais barato para a vigilância virológica de rotina. É essencial para os profissionais de saúde interessados em fazer um diagnóstico por meio de isolamento do vírus contactar o laboratório de virologia apropriado antes da recolha das

amostras. A aquisição, armazenagem e expedição das amostras podem então ser organizadas para que isolamento seja bem sucedido. ⁽³¹⁾

A fim de identificar os diferentes sorotipos do vírus da dengue, porções de cabeça mosquito e slides de culturas de células infetadas são examinados por imunofluorescência indireta usando anticorpos monoclonais específicos do serotipo.

Atualmente, a cultura celular é o método mais amplamente utilizado para o isolamento do vírus do dengue. As linhas de células de mosquito C6 / 36 ou AP61 são as células hospedeiras preferidas para o isolamento de vírus de dengue. A inoculação em ratinhos lactentes ou mosquitos pode ser tentada quando nenhum outro método está disponível. ⁽⁹⁷⁾

1.6.4.2. Detecção de ácidos nucleicos virais

O genoma viral de dengue, o ácido ribonucleico (ARN), pode ser detetado por reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR). O ARN é lábil ao calor, devendo as amostras para a detecção de ácido nucleico ser manuseadas e armazenadas de acordo com os procedimentos descritos para o isolamento do vírus. Estes procedimentos são elencados em seguida.

1.6.4.2.1. Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR)

Nos últimos anos foram reportados ensaios de RT-PCR para a detecção de vírus de dengue. Estes ensaios oferecem melhor especificidade e sensibilidade em comparação com o isolamento do vírus e facultam um tempo de resposta inferior. A realização destes testes requer condições laboratoriais específicas na área da biologia molecular e a intervenção de profissionais qualificados para realizar os testes. ⁽⁹⁷⁾

O ARN do DENV pode ser extraído a partir de soro ou de plasma, do sangue total, de leucócitos, de tecidos frescos ou embebidos em parafina de mosquitos, etc. ^(135,136,137,138)

Todos os ensaios de detecção de ácidos nucleicos envolvem três passos básicos: extração de ácidos nucleicos e purificação, amplificação do ácido nucleico e detecção do produto amplificado. Os resultados falsos positivos podem ocorrer, e isto pode ser evitado através de um isolamento adequado em diferentes etapas do ensaio e observando os procedimentos rigorosos de descontaminação. ^(34,97)

1.6.4.2.2. “Nested” RT-PCR

O ensaio “Nested” RT-PCR envolve o uso de primers universais de dengue tendo como alvo a região C/prM do genoma viral para o passo inicial da transcrição reversa e amplificação, seguida de um PCR “Nested” para a amplificação específica do serotipo. (97,139)

1.6.4.2.3. “One-step” RT-PCR

Este teste constitui uma alternativa para o “Nested” RT-PCR e baseia-se na utilização de uma combinação dos quatro primers oligonucleótidos específicos para os quatro serotipos num único passo de reação, a fim de identificar o serotipo. Os produtos destas reações são separados por eletroforese num gel de agarose e os produtos de amplificação são visualizados como bandas de diferentes pesos moleculares após coloração do gel com brometo de etídio, e em comparação com marcadores de peso molecular padrão. Neste ensaio, os serotipos de dengue são identificados pelo tamanho das correspondentes bandas. (140,141)

1.6.4.2.4. RT-PCR em tempo real

O ensaio de RT-PCR em tempo real é também um sistema de ensaio de um só passo, utilizando os pares de primers e sondas que sejam específicos para cada serotipo de dengue. O uso de uma sonda fluorescente permite a deteção dos produtos de reação em tempo real numa máquina de PCR, sem a necessidade de eletroforese. (97,142,143,144)

Os ensaios de RT-PCR podem ser do tipo "singleplex" (deteção de apenas um serotipo de cada vez) ou do tipo "multiplex" (capacidade de identificação dos quatro serotipos numa única amostra). Estes testes oferecem alto rendimento, sendo portanto muito úteis para a monitorização em larga escala. (97,145)

1.6.4.2.5. Método de amplificação isotérmica

A NASBA (amplificação baseada na sequência de ácido nucleico) é um ensaio isotérmico específico de amplificação de ARN que não requer ciclos térmicos de instrumentação. A fase inicial é uma transcrição reversa, em que o alvo de ARN de cadeia simples é copiada para uma cadeia dupla de ADN que serve como molde para a transcrição do ARN. O ARN amplificado é detetado, pela electroquimioluminescência ou em tempo real, usando sondas moleculares ligadas a marcadores de fluorescência. (146,147)

Comparado com o isolamento do vírus, a sensibilidade dos métodos de RT-PCR varia de 80% a 100%, dependendo da região do genoma visado pelos primers, da abordagem utilizada para amplificar ou detetar produtos de PCR e dos métodos utilizados para subtipos. As vantagens desta tecnologia incluem elevada sensibilidade e especificidade, facilidade de identificação e ainda deteção precoce de serotipos da infeção. Trata-se no entanto de uma tecnologia dispendiosa, pois requer instrumentos sofisticados e mão obra qualificada. ^(97,142,143,144)

Recentemente foi desenvolvido o método de PCR, “Loop Mediated Amplification” (LAMP). Trata-se de um método de fácil execução e menos dispendioso, podendo constituir uma alternativa para o RT-PCR e PCR em tempo real. ⁽¹⁴⁸⁾

1.6.4.3. Deteção de antígeno viral

O produto do gene NS1 é uma glicoproteína produzida por todos os flavivírus que é essencial para a replicação e a viabilidade do vírus. A proteína é segregada por células de mamífero, mas não por células de insetos. O antígeno NS1 é detetável logo no primeiro dia após o início da febre e diminui para níveis não detetáveis após 5-6 dias. Assim, os testes com base neste antígeno podem ser utilizados para o diagnóstico precoce, na fase de virémia. ⁽¹⁴⁹⁾ Em ELISA e ensaios de transferência dirigidos contra o envelope, antígenos de membrana (ME) e a proteína 1 não estrutural (NS1) demonstraram que este antígeno está presente em concentrações elevadas no soro de pacientes infetados pelo vírus do dengue durante a fase clínica precoce da doença e pode ser detetado em pacientes com infeções de dengue primárias e secundárias até seis dias após o início da doença. Encontram-se disponíveis kits comerciais para a deteção de antígenos de NS1 já se encontram disponíveis mas estes kits não diferenciam os diferentes serotipos. Porém, além de fornecerem um marcador de diagnóstico precoce para a gestão clínica, podem também facilitar a melhoria dos inquéritos epidemiológicos da infeção por dengue. ⁽⁹⁷⁾

1.6.4.4. Testes sorológicos e de resposta imunológica

São utilizados cinco testes sorológicos para o diagnóstico de infeção por dengue: inibição da hemaglutinação (IH), fixação do complemento (CF), teste de neutralização (TN), teste imunoenzimático de captura (“IgM antibody-capture enzyme-linked

immunosorbent assay”- MAC-ELISA), ELISA indireto e IgG ensaio de captura de IgM com enzima ligada com imunoabsorvente (MAC-ELISA).^(150,151)

O ensaio MAC-ELISA, esquematizado na figura 1.15, tem sido amplamente utilizado nos últimos anos. É um teste simples e rápido, que exige muito pouco equipamentos sofisticado. Este ensaio é baseado na detecção específica dos anticorpos IgM da dengue no soro, usando IgM anti-humano que foi anteriormente ligado à fase sólida.⁽¹⁵²⁾ Se o soro do paciente tem anticorpos de IgM ele liga-se ao antígeno da dengue que é adicionada no passo seguinte e pode ser detetado por adição subsequente de uma enzima marcada com um anticorpo anti-dengue, que pode ser um anticorpo monoclonal humano ou um substrato da enzima. O conjugado formado provoca uma alteração de cor que é detetável.⁽⁹⁷⁾

O anticorpo IgM anti-dengue desenvolve-se um pouco mais cedo do que a IgG, e é geralmente detetável pelo dia 5 da doença, ou seja, este anticorpo não é geralmente detetável durante os primeiros cinco dias de doença. Verifica-se no entanto que o tempo do aparecimento de anticorpos IgM varia consideravelmente entre os pacientes. Os títulos de anticorpos IgM em infeções primárias são significativamente mais elevados do que em infeções secundárias. Em algumas infeções primárias a IgM detetável pode persistir por mais de 90 dias, mas na maioria dos pacientes diminui para um nível indetetável em 60 dias.⁽⁹⁷⁾

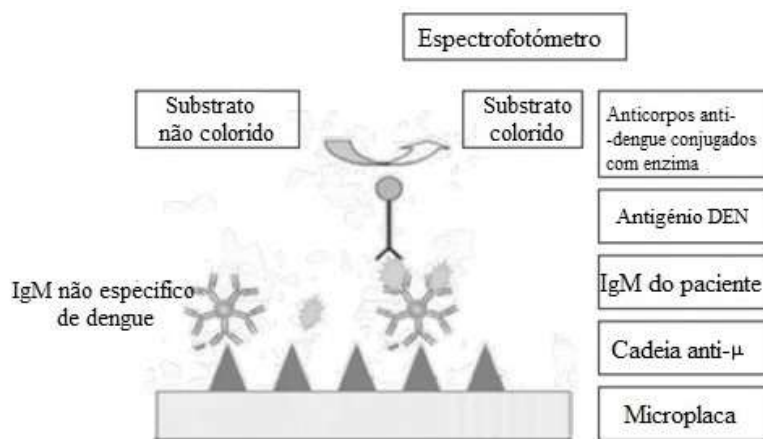


Figura 1.15 – Princípio do ensaio de MAC-ELISA. (Adaptado de⁽³⁴⁾)

O teste MAC-ELISA é ligeiramente menos sensível do que o teste IH para o diagnóstico de infeção por dengue, apresentando a vantagem de requerer frequentemente uma única amostra de sangue, devidamente programada. Considerando a dificuldade na obtenção de amostras de sangue e o atraso na obtenção de resultados conclusivos do teste

IH, a baixa taxa de erro inerente ao teste MAC-ELISA é aceitável na maioria dos sistemas de vigilância. ^(97,153,154)

O teste MAC-ELISA tornou-se uma ferramenta inestimável para vigilância das FD, FHD e SCD. Em áreas onde a dengue não é endêmica, este teste pode ser usado em vigilância clínica para a doença viral ou de modo aleatório em inquéritos sorológicos de base populacional, considerando-se que nenhum dos positivos detetados são infecções recentes. ⁽¹⁵⁰⁾ É um teste especialmente útil para os pacientes hospitalizados que geralmente são internados numa fase tardia da doença após a IgM detetável já estar presente no sangue. ⁽⁹⁷⁾

1.6.4.4.1. IgG-ELISA

Foi desenvolvido um teste IgG-ELISA indireto, comparável com o teste de IH. ⁽¹⁵¹⁾ Este teste também pode ser utilizado para diferenciar infecções da dengue primárias e secundárias. ^(155,156) O teste é simples e fácil de executar, e, assim, é útil para grandes volumes de testes. Este teste e o IH podem ser utilizados independentemente ou em combinação, dependendo do tipo de amostra e testes disponíveis, a fim de confirmar o diagnóstico. ⁽⁹⁷⁾

1.6.4.4.2. Proporção de IgM / IgG

A proporção de IgM / IgG é utilizada para distinguir a infecção primária da infecção secundária por dengue. A infecção pelo vírus do dengue é definida como primária se a proporção de IgM / IgG é superior a 1,2 e como secundária se a proporção é inferior a 1,2. Este sistema de teste de relação tem sido adotado por fornecedores comerciais de kits. ⁽¹⁵⁵⁾

1.6.4.4.3. Ensaio de inibição da hemaglutinação

Dos testes acima mencionados, a inibição da hemaglutinação ou o teste IH foi o teste mais frequentemente utilizado no passado para o diagnóstico sorológico de rotina das infecções por dengue. Este teste é sensível, fácil de executar, exige muito pouco equipamento e, se executado corretamente, é muito confiável. Como os anticorpos persistem por longos períodos (até 50 anos ou mais), o teste é ideal para estudos sero-epidemiológicos.

A principal desvantagem do teste IH é a falta de especificidade, o que o torna não fiável para identificar o serotipo do vírus infetante. No entanto, algumas infeções primárias podem mostrar uma resposta ao IH relativamente monotípica que é geralmente correlacionada com o vírus isolado. Nos últimos tempos, muitos laboratórios abandonaram a realização de ensaios com este teste. ⁽¹⁵⁰⁾

1.6.4.4.4. Teste de fixação de complemento

O teste de fixação de complemento ou CF não é amplamente utilizado para diagnóstico sorológico de rotina para dengue por ser mais difícil de executar e requerer pessoal altamente treinado. O teste CF baseia-se no princípio de que o complemento é consumido durante as reações antígeno-anticorpo. Estão envolvidas duas reações, um sistema de teste e um sistema indicador, e os antígenos para o teste CF são preparados da mesma maneira que para o teste IH. O teste CF é útil para pacientes com infeções atuais, sendo de valor limitado para estudos soro-epidemiológicos em que a deteção de anticorpos persistentes é importante. Apenas alguns laboratórios realizam este ensaio. ⁽⁹⁷⁾

1.6.4.4.5. Teste de neutralização

O teste de neutralização ou TN é o teste sorológico mais específico e sensível para o vírus da dengue, sendo usado para determinar a proteção imunológica. O protocolo comum utilizado na maioria dos laboratórios de dengue é a diluição do soro pelo teste de neutralização por redução de placas (PRNT). As desvantagens principais desta técnica são os custos, o tempo necessário para realizar o teste e a dificuldade técnica, uma vez que requer um acesso fácil a cultura de células e, por conseguinte, não é rotineiramente utilizado na maioria dos laboratórios. Contudo, é de grande utilidade para o desenvolvimento de vacinas e dos seus ensaios de eficácia. ⁽⁹⁷⁾

1.6.4.5. Teste de diagnóstico rápido (RDT)

Alguns kits comerciais de testes serológicos rápidos para deteção de anticorpos anti-dengue IgM e IgG tornaram-se disponíveis nos últimos anos, alguns destes produzindo resultados em cerca de 15 minutos. ⁽¹⁵¹⁾ Infelizmente a precisão da maioria destes testes é incerta, uma vez que ainda não foram devidamente validados. Os testes rápidos podem produzir resultados falsos positivos devido à reação cruzada com outros flavivírus, parasita da malária, leptospiras e patologias auto imunes, como artrite e lupus. Prevê-se que estes kits de teste possam ser reformulados para torná-los mais específicos,

tornando assim a vigilância laboratorial global para FD / FHD um objetivo atingível num futuro próximo. ⁽⁹⁷⁾

1.6.4.6. Testes hematológicos

Os parâmetros hematológicos padrão, tais como contagem de plaquetas e hematócrito são importantes e fazem parte do diagnóstico biológico da infecção por dengue. Estes testes devem ser cuidadosamente monitorizados.

A Trombocitopenia, uma queda na contagem de plaquetas abaixo de 100 000 por μL , pode ser observada ocasionalmente nos casos de dengue, mas constitui uma característica constante na FHD. A Trombocitopenia é geralmente encontrada entre o terceiro e o oitavo dia de doença, muitas vezes antes ou simultaneamente com as mudanças no hematócrito.

A Hemoconcentração com um aumento no hematócrito de 20% ou mais (para o mesmo paciente ou para um paciente da mesma idade e sexo) é considerado como sendo uma evidência definitiva de aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de plasma. ^(34,97)

1.6.5. Laboratórios

Cada país deve esforçar-se por estabelecer uma rede de laboratórios de diagnóstico de dengue, com uma função específica para cada nível de laboratório de saúde. Enquanto os laboratórios periféricos podem realizar RDT e ter competência para recolher, armazenar e enviar o material para o próximo laboratório de nível mais elevado, os laboratórios nacionais devem realizar a caracterização genética do vírus, organizar esquemas de avaliação externa de qualidade, dar formação e desenvolver diretrizes nacionais. Os laboratórios nacionais também são incentivados a participar em redes internacionais, como a Rede Europeia de Diagnósticos de doenças virais "importadas" (ENIVD) para desenhar o apoio da comunidade global. ⁽⁹⁷⁾

Em Portugal, o diagnóstico etiológico e procedimentos segundo a Direção Geral de Saúde realiza-se no INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge que é o laboratório de referência para realizar o diagnóstico laboratorial da dengue. ⁽¹⁵⁷⁾

O diagnóstico etiológico é feito a partir de demonstração laboratorial de infecção viral pelos seguintes métodos:

Sorologia – Os métodos utilizados são os de imunofluorescência no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e os de imunocromatografia (Instituto de Medicina Tropical);

PCR – Detecção do ARN viral (testes - Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR), “Nested”- PCR, “convencional multiplex” RT-PCR e RT-PCR em tempo real, efetuam-se no INSA.⁽¹⁵⁸⁾ PCR – Detecção do vírus no sangue (e no líquido cefalorraquidiano se houver sinais e sintomas de infeção do SNC) efetua-se no INSA, mas não é um exame de 1ª linha.⁽¹⁵⁷⁾

1.7. Vigilância, prevenção e controlo da dengue

Até à data, ainda não se encontra disponível nenhuma vacina para a dengue. Muitos países apoiam programas de controlo de *Ae. aegypti*, porém a crescente incidência da doença mostra que a transmissão da dengue continua inabalável, o que prova o fracasso dos programas de prevenção e controlo. Diversos fatores, tais como o crescimento explosivo das áreas urbanas, a globalização, os recursos limitados do governo, a má gestão, a formação inadequada de pessoal de campo, a dependência excessiva e resistência aos inseticidas, a sua aplicação incorreta e a educação insuficiente do público, têm sido considerados como causas para a ineficácia dos programas de prevenção e controlo.^(5,9,11,34,159,160,161,162)

De acordo com a OMS, a estratégia para contrariar esta tendência deve promover a coordenação e a colaboração entre parceiros multissetoriais e uma abordagem integrada de gestão de vetores e medidas de controlo sustentadas em todos os níveis. O princípio orientador deve consistir em harmonizar a prevenção, a vigilância (entomológica e epidemiológica) e a gestão de casos com os sistemas de saúde existentes, de modo que estes sejam sustentáveis e ecologicamente corretos. Esta estratégia deverá contribuir para a redução da morbidade e mortalidade no mundo causada pela dengue.⁽¹⁰⁾

1.7.1. Vigilância da dengue

A vigilância representa uma componente crítica de qualquer programa de prevenção e controlo da dengue, pois fornece as informações necessárias para a avaliação do risco e orientação do programa, incluindo a resposta às epidemias. Os objetivos gerais da vigilância em saúde pública que se aplicam à dengue visam: a deteção de epidemias para uma intervenção precoce; a avaliação da incidência da doença e dos seus impactos

sociais e económicos nas comunidades afetadas; o acompanhamento nas tendências na distribuição e disseminação da dengue geograficamente e ao longo do tempo; a monitorização de fatores de risco ambientais, em colaboração, sempre que possível, com o controlo da qualidade da água e das condições higieno-sanitárias; a avaliação e eficácia dos programas de prevenção e controlo e, com base na avaliação da evolução de programas já realizados, facilitar a planificação e distribuição de recursos. ⁽¹⁰⁾

1.7.1.1. A vigilância epidemiológica

A vigilância epidemiológica de uma patologia é um processo contínuo e sistemático de recolha, registo, análise, interpretação e divulgação de dados para iniciar intervenções de saúde pública adequadas de prevenção e controlo. ⁽⁹⁷⁾ O principal objetivo da vigilância epidemiológica é a deteção precoce de casos para indicar medidas de controlo capazes de impedir novas ocorrências. A vigilância tem como meta detetar e prever uma possível epidemia. Deste modo procede-se a uma recolha contínua e sistemática de dados, como a notificação de casos confirmados de dengue, o acompanhamento das tendências na distribuição da doença e a disseminação e gravidade dos casos, através da confirmação laboratorial. ^(34,163,164) O acompanhamento da incidência da dengue ao longo do tempo fornece uma base de dados com o número de casos diagnosticados, de modo que um aumento inesperado no número ou na gravidade dos mesmos consistirá um sinal de alerta e serão desencadeadas medidas de intervenção e prevenção, possibilitando assim o uso de recursos humanos e logísticos de forma eficaz para o diagnóstico e tratamento, bem como atividades de educação comunitária, fundamentais para a redução da transmissão da doença. ^(34,163)

1.7.1.2. A vigilância entomológica

A vigilância entomológica de *Ae. aegypti* é utilizada para determinar mudanças na distribuição geográfica e densidade populacional, identificando as áreas de alta infestação, os principais habitats das larvas e as áreas de preferência do mosquito para a oviposição. ⁽¹⁰⁰⁾

Estes dados permitem selecionar e utilizar as ferramentas de controlo de vetores mais apropriadas e podem ser usados para monitorizar a sua eficácia. Existem vários métodos disponíveis para a deteção e monitorização das populações larvares e adultas. A seleção de métodos adequados depende dos objetivos de vigilância, dos níveis de infestação e da disponibilidade de recursos. ⁽⁹⁷⁾

Existem vários métodos para monitorizar o vetor, sendo os mais usados, os relativos à recolha de dados sobre as fases larvares de *Ae. aegypti*. Para o efeito, são recolhidos dados em residências, nomeadamente moradias infestadas com larvas e pupas, e em contentores (recipientes de água que contêm larvas e pupas).^(34,97,100,163) É realizada uma recolha de amostras para análise em laboratório, necessária à confirmação das espécies presentes.^(165,166) Estes índices são importantes para conhecimento e posterior eliminação do habitat do vetor. A recolha de informações é importante para a formulação de ações educativas dirigidas à comunidade, visando a diminuição da quantidade de habitats que possam albergar as larvas e pupas.^(34,100)

Outro método usado é referente à abundância dos mosquitos adultos, a qual fornece dados acerca das tendências sazonais da população, quantidade de mosquitos, risco de transmissão, assim como a avaliação do uso de inseticidas. Estes resultados são menos reprodutíveis do que os obtidos a partir de amostras de estádios imaturos (larvas e pupas) pois os processos de recolha de dados são muito trabalhosos e dependem da destreza do coletor (da pessoa que recolhe os exemplares). Geralmente são expressos pela contagem de picadas por pessoa, por hora sendo a densidade definida como o número de mosquitos por casa ou a quantidade de mosquitos recolhida (através de aspiradores ou rede de mão) por intervalo de tempo.^(34,97,100)

A recolha de mosquitos adultos também pode ser efetuada através do uso do inseticida que é impregnado no tecido da armadilha. Os mosquitos que descansam sobre o tecido que existe dentro da armadilha são mortos por contacto com o inseticida e são recolhidas no fundo da bandeja da armadilha. Estes podem então ser classificadas de acordo com a espécie e é verificada a presença de *Aedes*.^(167,168)

As armadilhas de oviposição são dispositivos utilizados para detetar a presença de ovos do vetor. Este método também é usado em locais onde a densidade populacional é baixa e a pesquisa das fases larvares são em grande parte improdutivas. Estas são particularmente úteis para a deteção precoce de novas infestações em áreas onde os mosquitos foram previamente eliminados. Por esta razão, são utilizados para vigilância em portos internacionais de entrada, especialmente aeroportos que, em conformidade com o Regulamento Sanitário Internacional (2005) devem ser mantidos livres da reprodução do vetor.

Foi demonstrado que as armadilhas com infusão de feno constituem um meio reprodutível, e portanto um método eficiente para vigilância de *Ae. aegypti* em áreas

urbanas, sendo também muito úteis para a avaliação de programas de controlo.⁽¹⁶⁹⁾ As armadilhas são colocadas em residências suspeitas ou, geralmente, em redor das habitações. As recolhas de ovos são efetuadas periodicamente e as amostras recolhidas são contadas em microscópio e incubadas, sendo as larvas ou adultos identificados. A percentagem de armadilhas positivas fornece um índice simples de níveis de infestação, possibilitando uma estimativa da população feminina adulta.⁽⁹⁷⁾

Além da avaliação de aspetos como a densidade do vetor e a sua distribuição, também outros parâmetros relacionados com a comunidade devem ser monitorizados periodicamente. Estes incluem a distribuição e densidade da população humana, as condições das residências, as condições socioeconómicas e a educação, sendo a monitorização destes parâmetros relevante para fins de planeamento e avaliação do risco da dengue. O conhecimento de alterações ao longo do tempo na distribuição dos serviços de abastecimento de água, na sua qualidade/confiabilidade, bem como as condições de armazenamento de água doméstica e práticas de eliminação de resíduos sólidos fornecem dados de importância crucial para a planificação de atividades/campanhas de sensibilização para a população, que visem a redução da infestação, a organização de medidas de intervenção em caso de uma possível epidemia e, sobretudo, a melhoria da qualidade de vida das populações.^(34,50,97)

1.7.2. Controlo do vetor

Não existem terapêuticas profiláticas ou fármacos específicos para o tratamento da dengue. Desta forma, a única abordagem possível para o controlo da dengue é a prevenção do contacto com mosquitos infetados.⁽³¹⁾ Os programas de controlo de vetores têm, de uma forma geral, registado pouco sucesso. Para a implementação de um projeto sustentável de controlo de vetores da dengue é necessário estabelecer parcerias entre organismos governamentais do setor de saúde e a comunidade, de forma a existir uma maior compreensão e envolvimento na execução dos programas de controlo de vetores.⁽⁹⁷⁾ Dada a natureza doméstica do vetor, que se distribui por uma vasta gama de habitats, existe a necessidade de adotar uma abordagem integrada que englobe a gestão ambiental, o controlo químico e o controlo biológico, incluindo todos os métodos adequados que sejam seguros e ambientalmente aceitáveis. Essas medidas passam pela gestão ambiental e focam a eliminação das larvas e dos locais de oviposição, com a aplicação de larvicidas, uso de agentes biológicos e, ao nível pessoal, o uso de protetores contra o mosquito.^(34,100,170)

1.7.2.1. Gestão ambiental

A gestão ambiental tem como principal objetivo promover a planificação, a organização, a execução, o acompanhamento e a avaliação das atividades para a modificação e / ou manipulação de fatores ambientais, com vista a evitar ou minimizar a propagação do vetor, evitando o contacto entre o humano-vetor-vírus. ^(97,50,100)

Os métodos ambientais de controlo do vetor e de redução do contato com o vetor incluem a redução na fonte, a gestão de resíduos sólidos, a modificação dos locais de reprodução criadas pelo homem e melhoramentos nas habitações.

A OMS definiu três métodos de gestão ambiental, utilizados para controlar estádios imaturos do vetor, que são descritos em seguida. ⁽⁹⁷⁾

1.7.2.1.1. Modificação do ambiente

Esta abordagem inclui transformações físicas da terra, água e vegetação, através da criação de infra-estruturas de longa duração, com o objetivo de reduzir o habitat do vetor sem causar efeitos negativos no ambiente. É essencial que o abastecimento de água potável possa ocorrer em quantidade suficiente, com qualidade e consistência para reduzir a necessidade de utilização de recipientes de armazenamento de água que constituem habitats privilegiados para produção de larvas. ⁽⁹⁷⁾ Por exemplo, a instalação de uma fonte confiável de água potável, canalizada para a comunidade, fornecida em quantidade suficiente, deverá evitar a captação de água em poços ou a utilização de água da chuva e outros sistemas tradicionais de armazenamento de água, que servirão para oviposição. ^(34,50,163)

1.7.2.1.2. Manipulação ambiental

Esta abordagem inclui mudanças no habitat do vetor, a fim de evitar a oviposição. Envolve cuidados na manipulação dos recipientes que possam guardar e manter a água parada (vasos de flores, refrigeradores e sargetas), bem como na frequência de limpeza e no seu esvaziamento. Devem utilizar-se capas ou tampas removíveis, para cobrir recipientes de armazenamento de água para uso doméstico, como ilustra a figura 1.16A e proceder-se à remoção e reciclagem de resíduos não biodegradáveis, como baldes, garrafas, pneus, etc, que podem armazenar água da chuva e constituir potentes criadouros para o vetor, como mostra a figura 1.16 B. ^(34,50,164)



Figura 1.16 – A- recipientes de armazenamento de água tapados. (Adaptado de ⁽¹⁷¹⁾); B- pneus usados, servindo de locais de reprodução do vetor. (Adaptado de ⁽¹⁰⁾).

1.7.2.1.3. Mudanças nas habitações e comportamentos humanos

Esta estratégia implica esforços para reduzir o contacto homem-vetor-vírus. Por exemplo: a instalação de redes mosquiteiras normais ou tratadas com inseticida, nas janelas, portas e em possíveis entradas para o mosquito; utilização de roupa de manga comprida, calças e meias que limitem a exposição da pele, reduzindo o risco da picada; uso de repelentes e a aplicação de inseticida em sprays dentro das habitações, principalmente nas horas de maior exposição ao vetor. ^(34,50,100)

1.7.2.2. Controlo químico

Têm sido utilizados agentes químicos para controlar *Ae. aegypti* desde o início do século XX. Nas primeiras campanhas contra o vetor os habitats de larvas de Aedes eram tratadas com óleo e as casas eram fumigadas com piretrinas. Quando as propriedades inseticidas do diclorodifeniltricloroetano (DDT) foram descobertas, na década de 1940, este composto tornou-se o método principal de controlo de *Ae. aegypti* em programas de erradicação, nas Américas. No início dos anos sessenta surgiu a resistência ao DDT, que se tornou um grave problema. ⁽¹⁷²⁾ A partir daí, foram utilizados os inseticidas organofosforados, incluindo o fentião, o malatião e a fenitrotiona, para o controlo de adultos de *Ae. aegypti* e também o temefos, como larvicida. Atualmente os métodos de aplicação de inseticidas incluem a aplicação larvicida e a pulverização. ⁽¹⁷³⁾

1.7.2.2.1. Controlo de larvas

A aplicação de larvicidas de *Ae. aegypti* é geralmente limitada a recipientes de uso doméstico que não podem ser destruídos ou eliminados. Sendo um processo difícil e

dispendioso, os larvicidas químicos são mais utilizados em situações em que a doença e vigilância de vetores indicam a existência de determinados períodos de alto risco, ou em zonas onde possam ocorrer surtos. Existem três inseticidas que podem ser usados para o tratamento de recipientes que contêm água potável. As orientações da OMS sobre a qualidade da água potável⁽¹⁷⁴⁾ fornece orientações sobre a utilização de pesticidas na água potável.

O temefos foi o inseticida de escolha durante quase meio século, principalmente devido à sua relativamente baixa toxicidade para mamíferos. Apesar do desenvolvimento de resistência a este larvicida, que se tem alastrado a muitas partes do mundo, ainda é amplamente utilizado. O regulador do crescimento de insetos (RCI) piriproxifeno interfere com o desenvolvimento dos estádios imaturos do mosquito, por interferência na síntese de quitina, durante o processo de muda em larvas, ou por rutura dos processos de transformação em pupas e adultos. É um análogo da hormona juvenil de insetos e tem demonstrado ser extremamente eficaz contra *Ae. aegypti* em concentrações muito baixas,⁽¹⁷⁵⁾ podendo também afetar adultos através da diminuição da fecundidade.⁽¹⁷⁶⁾

O *Bacillus thuringiensis* H-14 (Bt.H-14) é um larvicida que contém uma proteína toxina derivada de *Bacillus thuringiensis*. A vantagem de Bt.H-14 é ser uma aplicação que destrói larvas de mosquitos, poupando outras espécies que possam estar presentes.⁽¹⁷⁷⁾

Foram identificados em laboratório numerosos extratos de plantas com atividade larvicida^(178,179,180) mas até à data ainda não foram testados em ensaios de campo.

1.7.2.2.2. Controlo de adultos

Os métodos de controlo químico que visam vetores adultos destinam-se a ter impacto na densidade da população de mosquitos e na sua longevidade. Os agentes adulticidas são aplicados no tratamento de superfície ou residuais e em tratamentos de espaços.⁽³⁴⁾

A pulverização envolve a aplicação de pequenas gotas de inseticida para o ar, numa tentativa de matar mosquitos adultos. Tem sido o principal método de controlo de FD / FHD e foi usado na maioria dos países da região do sudeste asiático, durante 25 anos. Infelizmente, não foi eficaz, tal como se constata pelo aumento dramático da incidência da dengue nestes países durante o mesmo período. Estudos recentes têm demonstrado que o método tem pouco efeito sobre a população de mosquitos e, deste modo, sobre a transmissão da dengue.^(181,182,183) A pulverização de espaços com inseticida

utilizada para o controlo *Ae. aegypti* pode ser dispensada por recipientes pressurizados, portáteis ou por máquinas montadas em veículos rodoviários ou manuais, embarcações e aeronaves. São aplicadas pulverizações em todos os tipos de imóveis (residências, casas comerciais, escolas e serviços de saúde), praças, jardins e terrenos abandonados. Essa técnica é utilizada para o controlo do vetor apenas em situações de emergência, para suprimir uma epidemia, pois subsistem controvérsias sobre a sua eficácia e não se conhece o impacto a longo prazo para o ecossistema. ^(34,100,184)

A pulverização também é realizada no espaço interior das habitações. Equipas de duas pessoas podem tratar 50-100 casas por dia. Antes do tratamento, os alimentos e utensílios de cozinha devem ser cobertos, as janelas e portas devem ser fechadas, e os moradores e animais domésticos devem deslocar-se para o exterior das habitações. Os pátios e outras áreas ao ar livre devem também ser tratados. ⁽³¹⁾

Os inseticidas organofosforados, tais como malatião, fenitrotião e perimifosmetilo, são utilizados para o controlo de vetores de *Aedes* adultos. Várias empresas produzem formulações contendo permetrina, deltametrina, lambda-cialotrina ou outros compostos que podem ser usados para aplicações em pulverização espacial. São geralmente utilizadas baixas doses de inseticidas piretróides dentro das habitações, sendo mais eficazes do que ao ar livre. Além disso, as doses baixas são geralmente mais eficazes quando aplicadas com equipamento portátil (perto ou dentro das casas) do que com equipamento montado nos veículos, mesmo quando as condições de vento e climáticas são favoráveis para aplicações no exterior. As aplicações de permetrina no exterior devem ser aplicadas em concentrações que variam de 0,5% a 1,0%. Independentemente do tipo de equipamento de pulverização das formulações e das concentrações utilizadas, deve ser feita uma avaliação periódica para verificar se o controlo efetivo do vetor está sendo eficaz. ^(34,97) Este método é impraticável para uso em larga escala.

1.7.2.3. Controlo biológico

O controlo biológico consiste na libertação de um agente biológico (normalmente, um inimigo natural) num ambiente específico para controlar uma praga através de mecanismos como a predação, parasitismo ou a doença. ⁽³⁴⁾ A utilização do controlo biológico na área da saúde pública é uma abordagem relativamente recente e constitui uma área de pesquisa para o desenvolvimento de estratégias para combater doenças transmitidas por mosquitos.

Embora o controlo biológico evite a contaminação química do ambiente, este método pode apresentar limitações operacionais, tais como os custos, a tarefa de criar organismos em larga escala, a dificuldade na sua aplicação e a sua limitada utilidade em ambientes aquáticos onde a temperatura, o pH e a poluição biológica podem exceder os requisitos requeridos pelo organismo. ^(50,97,170)

Atualmente encontram-se em desenvolvimento, uma série de métodos de controlo biológico destinados ao combate de *Ae. aegypti*, incluindo agentes biológicos que são predadores naturais de larvas do mosquito, tais como copépodes, fungos e bactérias patogénicas. Recentemente, surgiram novos métodos destinados a reduzir a transmissão do vírus da dengue minimizando danos sociais e ambientais, o de transfeção de *Ae. aegypti* com a bactéria *Wolbachia pipientis* e o mosquito transgénico.

1.7.2.3.1. Copépodes

Os copépodes são pequenos crustáceos de água doce que se alimentam de larvas de mosquito. As espécies de copépodes que se revelaram úteis para o biocontrolo exibiram capacidade para matar larvas de mosquitos entre os 95 a 100%. ⁽¹⁸⁵⁾ Os copépodes foram introduzidos numa aldeia do Vietnam em 1993, resultando na erradicação de *Ae. aegypti* a partir de duas grandes áreas rurais e uma área urbana. ⁽¹⁸⁶⁾ Este método de erradicação constitui uma estratégia de baixo custo e ambientalmente amigável, com grande sucesso em áreas rurais onde os principais habitats de larvas de *Ae. aegypti* são grandes recipientes de água. ⁽¹⁸⁷⁾

1.7.2.3.2. Fungos entomopatogénicos

Conhecem-se mais de 700 espécies de fungos entomopatogénicos, ⁽¹⁸⁸⁾ sendo estes conhecidos por uma longa tradição de uso bem sucedido no controlo de pragas agrícolas. ⁽¹⁸⁹⁾ Embora a patogenicidade de alguns fungos para o *Ae. aegypti* e *Ae. Albopictus* seja conhecida há várias décadas, a sua utilização para o controlo das populações dos vetores da dengue ainda está muito incipiente. Contudo, os fungos entomopatogénicos são inimigos naturais de mosquitos e têm sido propostos para uso em biocontrolo. Produzem esporos infecciosos, conhecidos como conídios, que se fixam e penetram na cutícula do inseto. Uma vez dentro do corpo do inseto, proliferam, explorando os recursos nutricionais do hospedeiro e libertando uma variedade de toxinas capazes de matar o inseto. Além de matar larvas e adultos, a infeção fúngica também

reduz significativamente a fecundidade de *Ae. aegypti* em condições de laboratório,⁽¹⁹⁰⁾ podendo matar os ovos.⁽¹⁹¹⁾ Os mosquitos resistentes a inseticidas infetados com fungos entomopatogênicos também são mais suscetíveis ao inseticida. Estes efeitos sobre a fecundidade, viabilidade dos ovos e potencial de sinergia com inseticidas parecem fornecer um atraente meio de controlo de vetores. Ao contrário de *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) e copépodes, os fungos são direcionados principalmente para mosquitos adultos, representado deste modo uma boa alternativa aos inseticidas. Também existem evidências que indicam que estes fungos não causam infeções nos seres humanos⁽¹⁹²⁾ nem poluição ambiental.⁽¹⁹³⁾

1.7.2.3.3. Bactérias - Bti

Bacillus thuringiensis israelensis é uma bactéria entomopatogénica, que representa uma alternativa segura para o controlo do mosquito.⁽¹⁹⁴⁾ São bactérias Gram-positivas que formam esporos e que são quase exclusivamente ativas contra os estádios larvares de insetos. Atuam através da libertação de toxinas inseticidas e de fatores de virulência.

Existe uma gama de produtos formulados Bti, que são produzidos por várias empresas para o controlo de mosquitos. Estes produtos incluem vários pós molháveis e de libertação lenta e outras formulações, incluindo comprimidos e pastilhas. Apresentam baixa toxicidade para mamíferos e foram licenciados para o controlo de mosquitos em recipientes de armazenamento de água para uso doméstico.⁽⁹⁷⁾ O uso de Bti aplicada contra mosquitos *Ae. aegypti* para controlo da dengue tem sido limitada mas os comprimidos têm sido usados para reduzir a população de larvas em recipientes de armazenamento de água para várias semanas.⁽¹⁹⁵⁾ O uso de Bti revelou-se eficaz no controlo de larvas de *Ae. aegypti*, em pneus⁽¹⁹⁶⁾ e em pequenos recipientes de terra.⁽¹⁹⁷⁾

O período de tempo decorrido entre a implementação do controlo larval e o consequente impacto sobre os mosquitos adultos pode contribuir para que este método de controlo possa ainda ser considerado inadequado para controlar rápidos surtos de dengue.⁽¹⁹⁸⁾

1.7.2.3.4. *Wolbachia pipientis*

Wolbachia pipientis é uma bactéria intracelular endossimbiótica que vive em mais de 60% de todas as espécies de insetos em todo o mundo.⁽¹⁹⁹⁾ O facto de *Wolbachia* viver intracelularmente, impõe-lhe limitações significativas na sua capacidade de

dispersão, uma vez que ela só pode ser transmitida verticalmente, por meio do ovo da fêmea de mosquito. Como resultado, o sucesso da *Wolbachia* está diretamente ligado à capacidade de reprodução do inseto. ⁽²⁰⁰⁾ A saliva de mosquitos com *Wolbachia* foi examinada pela equipa do Programa ‘Eliminar a Dengue’, na Austrália, e verificou-se que não contém a *Wolbachia*. Além disso, como vive no meio intracelular, a *Wolbachia* não atravessa o estreito ducto salivar do mosquito.

Uma manipulação reprodutiva induzida por *Wolbachia*, designada por incompatibilidade citoplasmática, tem recebido considerável atenção no controlo biológico de insetos vetores e de doenças. ^(201,202) A *Wolbachia* confere vantagem reprodutiva ao hospedeiro devido à incompatibilidade citoplasmática. Assim, as fêmeas com *Wolbachia* originam sempre mosquitos com *Wolbachia* no processo de reprodução, quer acasalem com machos sem a bactéria ou com machos com a bactéria. Quando as fêmeas sem *Wolbachia* acasalam com machos com a bactéria, os óvulos fertilizados morrem, sendo a descendência inviável. ⁽²⁰³⁾ Os cruzamentos descritos podem ser visualizados esquematicamente na figura 1.17.

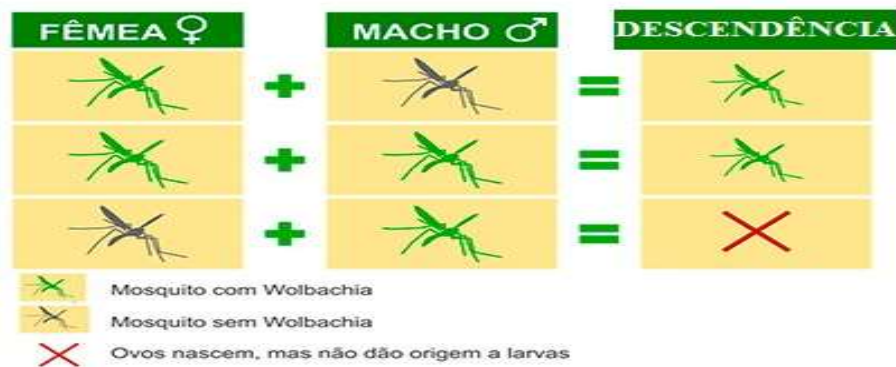


Figura 1.17 – Cruzamentos entre *Ae. aegypti* machos e fêmeas, com e sem *Wolbachia*. (Adaptado de ⁽²⁰⁴⁾).

Inicialmente, com poucos *Ae. aegypti* com *Wolbachia* na população de mosquitos, a vantagem reprodutiva será pequena. Porém, com as sucessivas gerações, o número de mosquitos machos e fêmeas com *Wolbachia* tende a aumentar, até que a população inteira de mosquitos possua esta característica. Por isso, uma vez estabelecido o método em campo, em determinada local, os mosquitos continuam a transmitir a *Wolbachia* naturalmente para a descendência, dispensando a necessidade de intervenções adicionais.

⁽²⁰⁴⁾

Antes de se iniciarem os testes de campo realizados na Austrália, com a libertação de mosquitos com *Wolbachia*, foi realizada uma análise independente dos riscos. As conclusões mostraram ser seguro a introdução da *Wolbachia* na população local de mosquitos. A Organização de Pesquisa Científica e Industrial da Comunidade das Nações (CSIRO, principal Agência de Ciência da Austrália) concluiu que este método apresenta riscos insignificantes, tanto para o meio ambiente quanto para a segurança humana. Foi concedida pelo Governo Australiano uma aprovação regulamentar para libertação do *Aedes* com *Wolbachia*, através da Autoridade Australiana de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (APVMA).⁽²⁰⁵⁾

A dispersão natural do *Ae. aegypti* com *Wolbachia* ocorreu em testes de campo realizados na Austrália, em janeiro de 2011. O programa ‘Eliminar a Dengue’ iniciou os estudos experimentais em campo usando um método de controlo baseado na *Wolbachia*, mediante aprovação dos órgãos regulatórios competentes e também dos moradores, que foram previamente informados e consultados. Os testes foram conduzidos nas localidades de Yorkeys Knob e Gordonvale, em Cairns, na Austrália. Decorridas cinco semanas depois da libertação, a presença de mosquitos com *Wolbachia* alcançou 100% em Yorkeys Knob e 90% em Gordonvale. Atualmente, a monitorização registou que o nível de mosquitos com *Wolbachia* se mantém acima de 90%, em ambas as comunidades.⁽²⁰⁴⁾

Os trabalhos de pesquisa sobre *Wolbachia* relacionados com as interações de *Wolbachia* com os seus hospedeiros e o seu impacto na transmissão do parasita têm vindo a aumentar. Estudos realizados com a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* mostraram que algumas estirpes de *Wolbachia* (por exemplo a estirpe wMelPop) podem invadir e sustentar-se em populações de mosquitos, reduzindo o tempo de vida adulta do mosquito, afetando a sua reprodução e interferindo com a replicação do agente patogénico. Estas estirpes bacterianas endossimbióticas foram introduzidas em *Ae. aegypti* para reduzir populações de mosquitos por diminuição do tempo de vida útil, reduzindo assim também o período de incubação extrínseca.⁽²⁰⁶⁾ DENV requer um período de incubação extrínseco significativo no mosquito fêmea antes que possa migrar para as glândulas salivares de insetos e seja transmitida aos seres humanos. Como resultado, a longevidade do mosquito é uma determinante crítica da intensidade de transmissão no DENV humano.⁽²⁰⁷⁾ Outra possibilidade de explorar *Wolbachia* está a utilizar a sua capacidade para interferir com os vírus e parasitas. *Wolbachia* é conhecida por interagir com uma vasta gama de agentes patogénicos em mosquitos transfetados com

o DENV e o vírus chikungunya. ⁽²⁰⁶⁾ A infecção da estirpe wMelPop de *Wolbachia* em mosquito *Ae. aegypti* induz a sobre-regulação de várias moléculas efetoras imunes. ⁽²⁰⁸⁾ Este parasita reprodutivo é conhecido por suportar indiretamente e sobre-regular o sistema imunitário do hospedeiro do inseto, suprimindo o agente patogénico, DENV. ⁽²⁰⁹⁾

A *Wolbachia* é introduzida nos ovos do mosquito por meio de uma técnica de microinjeção, realizada com uma agulha extremamente fina. As bactérias são transferidas de linhas celulares do mosquito hospedeiro nativo *Drosophila melanogaster* para os ovos de *Ae. aegypti*. ^(210,211)

O controlo biológico à base de *Wolbachia* diminui a capacidade de replicação do DENV no interior do mosquito, além de diminuir o seu tempo de vida adulta. A *Wolbachia* pode ainda invadir populações de vetores naturais, mostrando-se como uma alternativa segura e ambientalmente benigna face ao uso de inseticidas. A invasão e manutenção de *Wolbachia* em populações naturais do mosquito também fornece um meio de reduzir a transmissão do DENV que apresenta baixos custos, uma vez que as populações invadidas são auto sustentáveis. ⁽²¹²⁾

1.7.2.3.5. Mosquito transgénico

O objetivo de criar um vetor transgénico é tornar os mosquitos resistentes à infecção por agentes patogénicos, através da introdução do gene pretendido no mosquito, o qual, quando expresso, inibe o desenvolvimento do agente patogénico.

A tecnologia do mosquito transgénico mostra-se cada vez mais viável e de fácil acesso. ⁽²¹³⁾ As transformações na linha germinativa são conseguidas por microinjeção de um plasmídeo dador (transgene) que transporta o gene ou genes pretendidos para embriões de mosquito. O transgene deve também ser portador de um gene marcador, que pode ser utilizado para o controlo e monitorização de descendência transformada, geralmente nos estádios larvares. Os marcadores vulgarmente utilizados são proteínas fluorescentes.

A implementação desta estratégia leva a que haja uma reposição da população, em que populações de mosquitos naturalmente sensíveis seriam substituídas por populações de mosquitos transgénicos incapazes de transmitir DENV. ⁽³¹⁾

No final da última década, o método de RIDL – “Libertação de insetos transportando um gene letal dominante ” (do inglês – Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene – RIDL) foi adaptado para mosquitos e foram obtidas linhagens transgênicas baseadas neste sistema para a espécie *Ae. aegypti*.⁽²¹⁴⁾ Funcionalmente, o método RIDL permite que os mosquitos da linhagem transformada sejam criados na presença de tetraciclina, que inibe a expressão do gene letal e proporciona a sobrevivência até a fase adulta. Os descendentes gerados pelo cruzamento dos insetos transformados com os insetos selvagens são inviáveis, caso não haja tetraciclina no meio de desenvolvimento das fases larvares para inibição da ativação do gene letal.⁽²¹⁵⁾ (figura 1.18) Esta estratégia genética de supressão de populações de mosquito utilizando o método RIDL pode ser aplicada através da criação e libertação em massa de machos transgênicos que transportam um gene letal dominante.⁽²¹⁶⁾ Os machos transgênicos libertados cruzam-se com fêmeas selvagens e a descendência é inviável, reduzindo a capacidade reprodutiva da população alvo.^(216,217)

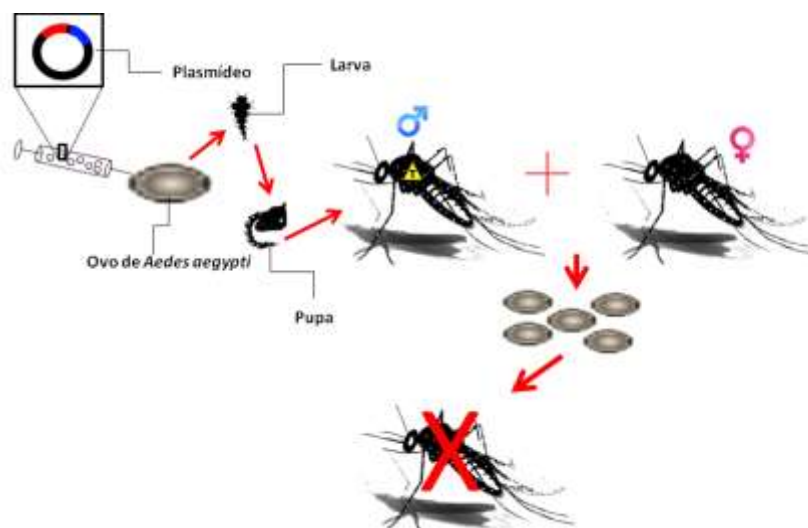


Figura 1.18 – Os ovos resultantes do cruzamento do macho transgênico com uma fêmea normal não se conseguem desenvolver até a fase adulta. (Adaptado de⁽²¹⁸⁾)

Através deste método RIDL foram criados mosquitos transgênicos que ao acasalar produzem uma descendência em que as fêmeas não conseguem voar, não sendo viáveis no meio natural, e em que os machos podem acasalar e transmitir o gene.

Atualmente, as linhagens transgênicas de *Ae. aegypti* voltadas para a estratégia de supressão de populações constituem a alternativa genética mais concreta para o controle deste mosquito.⁽²¹⁴⁾

1.7.3. Vacinas

A dengue é atualmente um problema de saúde pública em expansão, nos trópicos e áreas subtropicais. Milhões de pessoas, a maioria em países com recursos limitados, procuram tratamento para a doença. Apesar de mais de 70 anos de investigações e esforços para produzir uma vacina segura e eficaz, esta permanece indisponível. ⁽²¹⁹⁾ Durante décadas, os cientistas tentaram desenvolver uma vacina capaz de proporcionar proteção imunitária contra os quatro serotipos, ou seja, uma vacina tetravalente segura e eficaz para reduzir a incidência global da dengue. ⁽¹⁰⁾ Porém, existem vários aspetos que dificultam a sua produção, nomeadamente a necessidade de imunização contra os quatro serotipos e de alta eficiência para evitar o mecanismo que desencadeia a dengue grave. Acresce a falta de modelos animais para testar a efetividade das vacinas pois, apesar de poderem ser infetados, a manifestação clínica é diferente das dos seres humanos, e existem lacunas sobre o conhecimento da estrutura viral e sobre a indução de resposta imune. ^(50,220)

Uma vacina ideal para a dengue deve cumprir os seguintes requisitos: proporcionar uma imunização duradoura contra os quatro serotipos, não causar o fenómeno dos anticorpos potenciadores da infeção (ADE, do inglês antibody dependent enhancement), apresentar baixa toxicidade e também baixo custo. ⁽⁵⁰⁾

A pesquisa pela indução de uma resposta imunológica robusta para os quatro serotipos em simultâneo deve-se à tentativa de evitar o possível aumento do risco de desenvolver formas graves da doença, pois os pacientes que sofrem uma segunda infeção por um vírus de serotipos heterólogos apresentam uma probabilidade maior de desenvolver FHD/SCD. ⁽²²¹⁾ Segundo esta hipótese, ADE, os anticorpos heterólogos pré-existentes reconhecem o vírus infetante, formando-se complexos antigénio-anticorpo, os quais acabam sendo reconhecidos e entram por células mononucleares, especialmente macrófagos, através dos seus recetores para a porção constante dos anticorpos, sem neutralizar o vírus. Uma vez que os anticorpos heterólogos não são neutralizados, as partículas virais acabam por replicar dentro do macrófago, o que permite um aumento do número de células infetadas, podendo levar a uma grande carga viral, particularmente no início da infeção e que conseqüentemente exacerba a infeção. ^(222,223,224)

Atualmente existem diversas vacinas em teste, em diferentes estádios de desenvolvimento pré-clínico e clínico com ensaios em fases I, II e III. A tabela 1.6, resume propriedades de candidatos a vacina contra a dengue.

Tabela 1.6 – Vacinas da dengue candidatas em desenvolvimento clínico. (Adaptado de (225))

Vacina Candidata	Empresa	Tipo de vacina	Mecanismo de atenuação ou inativação	Fase Clínica	Referências
CYD	Sanofi Pasteur	Viva atenuada	Vacina do vírus da febre amarela como estrutura com proteínas prM e E DENV selvagem	III	(226,227)
DENVax	Takeda	Viva atenuada	Vírus DENV-2 atenuado em células de rim de cão e por mutação no gene NS3	II	(228,229)
TV003/ TV005	NIAID and Butantn Institute	Viva atenuada	Estirpes tipo selvagem com mutações genéticas	II	(230,231)
TDENV PIV	GSK and WRAIR	Inativada purificada	Inativada com formalina	I	(232,233)
V180	Merck	Subunidades recombinantes	Proteínas E e prM de vírus selvagem expressas usando sistema e expressão de <i>Drosophila</i>	I	(234,235)
D1ME100	NMRC	ADN	Proteínas prM e E de DENV-1 expressos sob controlo do plasmídeo vetor VR1012 do promotor citomegalovírus humano	I	(236,237)

1.7.3.1. Sanofi Pasteur (CYD)

CYD (Sanofi Pasteur) é uma vacina viva atenuada quimérica e tetravalente. Para cada um dos quatro serotipos da dengue os genes que codificam as proteínas de membrana prM e E do vírus da dengue tipo selvagem são substituídos na vacina do vírus da febre amarela (YF) 17D. (226)

Vários estudos de fase II foram realizados em todo o mundo em adultos e crianças. Na população de Singapura, testaram a imunogenicidade de 600 participantes crianças e adultos e, após a administração de três doses de CYD aos 0, 6 e 12 meses, 66,5% dos vacinados eram seropositivos para os quatro serotipos, embora as taxas de soro-conversão fosse mais elevada nas crianças. (238) Outro estudo de fase IIb foi realizado em 4002 crianças tailandesas com idades compreendidas entre 4 e os 11 anos. As crianças foram vacinadas com três doses a 0,6 e 12 meses. Neste estudo, a eficácia da vacina CYD contra todos os serotipos foi de 30,2% (95% intervalo de confiança (IC): -13.4-56.6). (239) A eficácia após a primeira dose da vacina contra os serotipos, DENV-1, DENV-3, e DENV-4 foi estatisticamente significativa, 61,2%, 81,9%, 90,0%, respetivamente, mas não contra

DENV-2. Num estudo de fase III realizado em 5 países na Ásia em que participaram 10,278 crianças com idades entre 2-14 anos, a eficácia da vacina foi de 56,5% (IC 95%: 43,8-66,4).

A eficácia da vacina também foi testada após 3 doses em doentes com febre hemorrágica da dengue, dengue grave e casos de dengue em doentes internados, tendo sido estatisticamente significante (88,5% (IC 95%: 58,2-97,9), 80,8% (IC 95%: 42,7-94,7), 67,2% (95% IC: 50,3-78,6), respetivamente). Num estudo semelhante ao de fase IIb na Tailândia, a imunogenicidade foi alta para os serotipos 1,3 e 4, mas para o serotipo 2 não foi estatisticamente significativa. ⁽²⁴⁰⁾

No estudo latino-americano em que participaram 20.869 crianças com idades entre os 9-16 anos foram administradas 3 doses de vacina aos, 0, 6 e 12 meses. A eficácia da vacina foi de 60,8% (IC 95%: 52,0-68,0). Todos os serotipos mostraram uma eficácia significativa, variando entre 42,3% para DENV-2 e 77,7% para DENV-4. ⁽²⁴¹⁾

1.7.3.2. DENVax (Invirage/Takeda)

A vacina candidata DENVax é uma vacina viva atenuada constituída com a base no DENV-2, atenuada por passagens em cultura de células e por uma mutação no gene NS3, e quimérica DENV-1, DENV-3, e DENV-4, constituída pela transferência de genes prM e E desses vírus para o DENV-2 atenuado.

Esta vacina tem vindo a ser testada pré-clinicamente e clinicamente desde o final dos anos 1980. ⁽²²¹⁾ Atualmente a fase I está concluída e encontram-se em curso os ensaios de fase II em populações endémicas e não endémicas de dengue. Em dois estudos de fase I, um nos EUA e outro numa região não endémica de dengue na Colômbia, foram avaliadas diferentes doses de DENVax por diferentes vias de administração (subcutânea ou intradérmica) em adultos saudáveis, aos 0 e 3 meses. ^(242,243) Na Colômbia, ambas as formulações e vias de administração se revelaram seguras e induziram anticorpos neutralizantes para todos os serotipos. ⁽²⁴⁴⁾ Iniciou-se em 2011, um estudo que se encontra na fase II, com 344 crianças e adultos que avaliam a segurança e a imunogenicidade da vacina na Colômbia, Porto Rico, Singapura e Tailândia. ⁽²⁴⁵⁾

No final de 2014, iniciou-se um estudo de fase II com 1800 crianças na Ásia e na América Latina que pretende examinar a imunogenicidade de 3 esquemas de dosagem (dia 0 somente, 0 e 3 meses, do dia 0 e 1 ano). ⁽²²⁹⁾

1.7.3.3. TV003/TV005 (NIAID)

O Instituto Nacional de alergias e doenças infecciosas (NIAID) fabrica uma vacina contra a dengue, tetravalente, incluindo os quatro grupos de antígenos através de várias combinações desses antígenos. Diferentes vacinas monovalentes candidatas foram combinadas em cinco diferentes misturas tetravalentes (TV001-TV005) para avaliar a imunogenicidade e a segurança de uma dose única tetravalente. Os voluntários adultos submetidos ao teste apresentaram taxas de seroconversão elevadas para DENV-1, DENV-3, e DENV-4 (de 85 a 100%) mas de 50% para DENV-2. ⁽²⁴⁶⁾ Teve início neste ano de 2015 um estudo de fase II na Tailândia, para testar a segurança e a resposta imune de duas doses de TV003 aos 0 e 6 meses, em adultos e crianças. ⁽²⁴⁷⁾ Em colaboração com o Instituto Butantan, teve início em Outubro de 2013 um estudo de TV003 fase II no Brasil. A segurança e imunogenicidade de uma dose (líquida ou liofilizada) de TV003 esta a ser testada em indivíduos saudáveis e com dengue e será alvo de avaliação com resultados concluídos, previstos para dezembro de 2018. ⁽²³¹⁾

1.7.3.4. TDENV PIV (GSK)

TDENV PIV é uma vacina inativada purificada e tetravalente. Atualmente encontra-se em avaliação em conjunto pela Glaxo SmithKline (GSK) e pelo Instituto Walter Reed de Pesquisas do Exército (WRAIR). Foi realizado nos Estados Unidos um estudo de fase I utilizando doses baixas e altas desta vacina. ⁽²³²⁾ Num estudo, programado para acabar em dezembro de 2016, está a ser avaliada a vacina em adultos, em Porto Rico. ⁽²⁴⁸⁾ Uma estratégia inovadora utilizando TDENV PIV e uma vacina de vírus vivo atenuado da dengue também está sob avaliação num estudo de fase II. ⁽²³³⁾

1.7.3.5. V180 (Merck)

V180 é uma vacina de subunidades recombinante, formada pela proteína E (subunidade 80E) e prM do vírus dengue recombinante que é eficientemente expressa utilizando sistema de expressão de *Drosophila*. A formulação consiste em subunidades 80% E de cada um dos quatro serotipos de dengue. ⁽²³⁴⁾ Proteína recombinante de envelope com a configuração da proteína dos vírus selvagens. O ensaio clínico de fase I terminou em janeiro de 2015 e examinou a eficácia de V180 a várias doses, em adultos saudáveis, aos 0, 1 e 2 meses. ⁽²³⁵⁾

1.7.3.6. D1ME100 (NMRC)

D1ME100 é uma vacina monovalente de plasmídeo de ADN e encontra-se, atualmente a ser examinada no Centro de Pesquisa Médica Naval (NMRC). Esta vacina consiste num plasmídeo de ADN contendo genes que codificam as proteínas prM e E de DENV-1, reproduzindo um elevado número de cópias em bactérias, tais como *Escherichia coli*.⁽²⁴⁹⁾ O primeiro ensaio de fase I avaliou a vacina aos 0, 1 e 5 meses, em doses baixas e altas.⁽²³⁷⁾ A vacina, embora segura, não conduziu a uma resposta de anticorpos neutralizantes para a dose baixa e apenas 42% dos participantes com a dose alta produziram uma resposta de anticorpos que não foi sustentada a longo prazo.

Devido à magnitude do problema da dengue em todo o mundo, mais do que um destes candidatos a vacina serão necessários para assegurar um fornecimento adequado de vacina, a longo prazo. Neste momento, somente a vacina CYD Sanofi se encontra em ensaios de fase III. Esta vacina demonstrou ser segura, apresentando diferentes níveis de eficácia contra os quatro serotipos, sendo a eficácia mais efetiva contra os serotipos 3 e 4. Além disso, demonstrou ter alta eficácia contra a dengue grave em casos de hospitalização.^(240,250)

Serão necessários mais trabalhos de investigação, ensaios pré clínicos, avaliação clínica e controlo de qualidade até que uma vacina contra a dengue segura e eficaz possa ser aprovada para uso clínico. Torna-se, urgente que estes trabalhos se desenvolvam para que, muito em breve, as vacinas se aliem ao controlo da doença no combate eficaz de dengue.

1.8. Fármacos no tratamento da dengue

Atualmente não existe nenhuma medicação antiviral específica ou vacina para o tratamento da dengue. O tratamento da dengue é sintomático e inclui a terapia analgésica, antipirética e repouso que são úteis no alívio da letargia, mal-estar e febre associada com a doença. O acetaminofeno (paracetamol) é recomendado para o tratamento de dor e febre. A aspirina e outros salicilatos e os fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) devem ser evitados porque aumentam o risco de hemorragia. Em pacientes com FHD ou SCD pode ser necessária a reposição de líquidos.⁽³¹⁾ Nestes casos os tratamentos podem incluir:

- A transfusão de sangue ou plaquetas para corrigir problemas de sangramento;

- A hidratação intravenosa (IV) de líquidos e eletrólitos para corrigir o desequilíbrio eletrolítico e desidratação;
- Os expansores de plasma para tratar pacientes que não respondem aos fluidos isotônicos;
- A terapia com oxigênio para tratar o baixo nível de oxigênio no sangue.

A dengue não tem sido suficientemente reconhecida como uma doença viral grave em termos de saúde pública e econômica, apesar de ser responsável por 22.000 mortes por ano em áreas onde é endêmica. Uma das causas deve-se a argumentos frequentes sobre viabilidade da terapia antiviral. Um dos argumentos mais comuns de oposição à terapia antiviral é que ela iria ocorrer muito tarde, isto é, quando a virémia já está em declínio. Assim, um fármaco deve promover a redução da carga viral na fase inicial da doença para, potencialmente, evitar a FD e FHD / SCD. O período de virémia da dengue é curto, sendo detetável apenas um pouco antes ou no início da febre, e dura quatro a cinco dias. A capacidade de diagnosticar rapidamente a doença da dengue é portanto a chave para o sucesso da aplicação de quimioterapia antiviral. Até à data, não existe nenhuma vacina contra a dengue ou fármaco antiviral clinicamente aprovado para seres humanos, mesmo tendo havido grandes esforços para atingir esses objetivos. ⁽⁹⁷⁾

Durante as últimas décadas, de entre as várias abordagens que têm sido utilizadas na busca de compostos antivirais para a dengue, os investigadores tentaram identificar compostos de origem natural que podem ser utilizados potencialmente como medicamentos antivirais na dengue, uma vez que na natureza existe um vasto reservatório de substâncias que podem ser exploradas com o objetivo de descobrir novos compostos que possam ser utilizados como medicamentos ou possam servir como estruturas de base para ser otimizados, com o objetivo do desenvolvimento de novos agentes antivirais contra a dengue. ^(251,252,253,254,255,256,257,258) A descoberta de que o HCV (género *Hepacivírus*) e o DENV (género *Flavivírus*) pertencem à mesma família viral, *Flaviviridae*, e partilham a organização do genoma, tendo estratégias de replicação semelhantes constituiu o ponto de partida e inspiração real para a pesquisa de fármacos anti-DENV. Muitas investigações têm sido efetuadas com diversas substâncias com atividade anti-DENV. O primeiro esforço em grande escala para descobrir fármacos anti-DENV deve-se ao Instituto Novartis de Doenças Tropicais (Singapura), que realizou um

exame completo da sua biblioteca química contra o domínio da protease NS3, uma proteína não estrutural de DENV.

Contudo, prossegue uma série de avaliações baseadas na semelhança dos genomas dos vírus da família *Flaviviridae*, cuja caracterização permitiu a identificação de um número crescente de substâncias anti-DENV contra proteínas ou enzimas virais, incluindo proteínas do envelope e da cápside, polimerases, helicases e proteases. Além disso, também foram identificados alvos potenciais de ação de substâncias com atividade antiviral, nomeadamente os processos envolvidos na entrada do DENV em células, entre os quais a ligação do receptor do vírus, mudanças de conformação na proteína E, a internalização do vírus e fusão da membrana. Neste trabalho resumem-se, seguidamente, os compostos de origem natural e sintética que têm sido rastreados relativamente à atividade anti-DENV (e os alvos correspondentes), que podem ter potencial farmacológico e constituir uma nova via na terapêutica da dengue.

1.8.1. Compostos de origem natural com atividade anti-DENV

As plantas medicinais tradicionais têm sido referidas como tendo compostos com atividade antiviral ⁽²⁵⁹⁾ e alguns destes têm sido utilizados para tratamento de infeções virais em animais e seres humanos. Até à data, foram identificadas algumas espécies diferentes contendo compostos com potencial para o tratamento de dengue e algumas delas ainda não foram objeto de investigação científica pormenorizada (Tabela 1.7). Algumas destas espécies são usadas para o tratamento sintomático da dengue, enquanto outras contêm compostos em que se verificou a sua atividade para inibir a formação do vírus, embora em muitos casos não existam estudos científicos comprovando a sua eficácia.

Tabela 1.7 – Plantas com atividade antiviral usadas no tratamento de infeções pela dengue. (Adaptado de ⁽²⁶⁰⁾)

Espécie	Partes utilizadas	Compostos isolados	Referências
<i>Alternanthera philoxeroides</i>	Planta inteira		(261)
<i>Andrographis paniculata</i>	Folhas		(262)
<i>Azidarachta indica</i>	Folhas		(263)
<i>Boesenbergia rotunda</i>	Rizomas	4-hidroxipanduratina, panduratina A	(264)
<i>Carica papaya</i>	Folhas		(265)

<i>Cladogynos orientalis</i>	Planta inteira		(266)
<i>Cladosiphon okamuranus</i>	Planta inteira	Fucoídano	(267)
<i>Cryptonemia crenulata</i>	Planta inteira	Galactano	(268)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Planta inteira		(262)
<i>Flagellaria indica</i>	Planta inteira		(266)
<i>Gymnogongrus griffithsiae</i>	Planta inteira	Kapa carragenano	(268)
<i>Gymnogongrus torulosus</i>	Planta inteira	Galactano	(269)
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Folhas		(270)
<i>Houttuynia cordata</i>	Panta inteira, folhas ou caule	Hiperósido	(266,271)
<i>Leucaena leucocephala</i>	Sementes	Galactomanano	(272,273)
<i>Lippia alba</i>	Planta inteira		(274,275)
<i>Lippia citriodora</i>	Planta inteira		(274)
<i>Meristiella gelidium</i>	Planta inteira	Kapa carragenano	(276)
<i>Mimosa scabrella</i>	Sementes	Galactomanano	(272)
<i>Momordica charanthia</i>	Fruto		(262)
<i>Ocimum sanctum</i>	Folhas		(262,277)
<i>Piper retrofractum</i>	Planta inteira		(266,278)
<i>Quercus lusitanica</i>	Sementes		(279)
<i>Rhizophora apiculata</i>	Planta inteira		(266)
<i>Tephrosia crassifolia</i>	Folhas e flores		(280)
<i>Tephrosia madrensis</i>	Folhas e flores	Glabranina, 7-O- metilglabranina	(280)
<i>Tephrosia viridiflora</i>	Folhas e flores		(280)
<i>Uncaria tomentosa</i>	Cascas do caule		(281,282)
<i>Zostera marina</i>	Planta inteira	Ácido zoostérico	(283)

O uso de ervas e plantas medicinais para tratar muitas patologias está crescendo em todo o mundo. Várias plantas têm mostrado possuir atividade antiviral contra dengue, quer através de testes de atividade com extratos quer através testes com compostos isolados e identificados.

1.8.1.1. Polissacáridos

Os fucoidanos representam um grupo de polissacáridos que ocorrem naturalmente e que podem ter aplicações terapêuticas interessantes em várias situações clínicas. Os fucoidanos contêm percentagens consideráveis de L-fucose e grupos éster sulfato e estão presentes na matriz extracelular de algas castanhas. Têm propriedades biológicas, incluindo as atividades anti-trombótica, anti-inflamatória, anti-viral, anti-adesiva e anti-

tumoral. Têm também um papel relevante na modulação do sistema imunitário do hospedeiro, parando o ciclo celular e induzindo a apoptose. ^(284,285,286) O fucoidano (figura 1.19) é um polissacarídeo isolado da alga marinha *Cladosiphon okamuranus*. A sua estrutura é composta por unidades de fucose sulfatadas e resíduos de ácido glucurónico. Investigações realizadas com fucoidano extraído de *Cladosiphon okamuranus* demonstraram que este polissacarídeo inibe a infeção pelo vírus dengue serotipo 2 (DENV-2), enquanto para os serotipos do vírus da dengue 3 e 4 apresentam uma atividade moderada e para o serotipo 1 não apresenta efeito sobre a infeção. ⁽²⁶⁷⁾ A dessulfonação do fucoidano origina derivados que mostraram uma notável supressão de actividade inibidora, o que indica que a sulfatação é necessária para a atividade antiviral dos glicosaminoglicanos. ⁽⁴⁶⁾ Também foi relatado que o fucoidano parece afetar criticamente a interação do DENV-2 com receptores celulares, mas o mecanismo molecular preciso do efeito inibidor deste composto não está completamente elucidado. ⁽²⁶⁷⁾

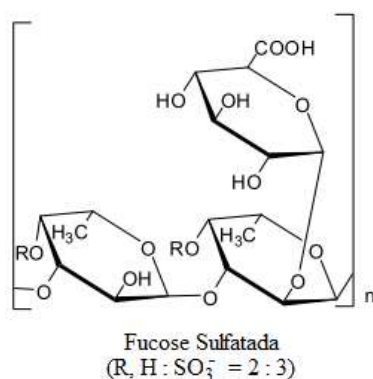


Figura 1.19 – Representação da estrutura molecular do fucoidano.

Vários polissacáridos conhecidos como galactanos foram isolados a partir de algas vermelhas. Entre estes, as carrageninas ou carragenanos correspondem a polissacáridos sulfatados com resíduos de α -D-4-galactose ligados aos seus derivados 3,6-anidro (figura 1.20). As carrageninas normalmente são classificadas de acordo com suas características estruturais, incluindo os seus padrões de sulfatação e a presença ou ausência de 3,6-anidro- α -D-galactopiranosose. Existem pelo menos 15 estruturas diferentes de carragenano, sendo as mais relevantes as indicadas na figura 21. ⁽²⁸⁷⁾ Estudos realizados com carragenanos iota, kappa e lambda comercialmente disponíveis (figura 1.20) foram avaliados em relação aos serotipos DENV 1-4. ⁽²⁸⁸⁾ Os ensaios foram realizados *in vitro*, utilizando células Vero e HepG2. Os polissacarídeos foram mais eficazes nos serotipos DENV-2 e DENV-3, sendo que os carragenanos lambda e iota mostraram ser inibidores

potentes de DENV-2 e DENV-3 com EC_{50} (concentração eficaz de 50%) variando entre 0,14-4,1 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

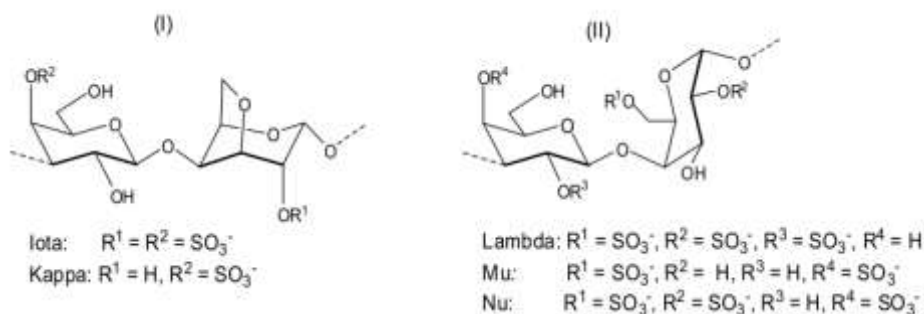


Figura 1.20 – Representação das estruturas moleculares de carragenanos.

Este estudo demonstrou que o sulfato de heparina, composto que imita o carragenano lambda, tem capacidade para interferir com a replicação do DENV-2 quando adicionado após a adsorção do vírus e, mesmo nestas condições, o potencial antiviral do carragenano lambda foi maior do que a sua capacidade de afetar a adsorção do vírus.

Talarico e colaboradores ⁽²⁶⁸⁾ investigaram a atividade antiviral na dengue de dois polissacáridos sulfatados obtidos a partir das algas marinhas vermelhas *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata*. ⁽²⁶⁸⁾ O composto G3d, obtido a partir de *Gymnogongrus griffithsiae*, inclui unidades de carragenano kapa/iota/nu (ver figura 1.21). O composto C2S-3, um DL-galactano obtido a partir de *Cryptonemia crenulata*, é feito de unidades unidades de dissacarídeo (a), (b), e (c), representadas na figura 1.21.

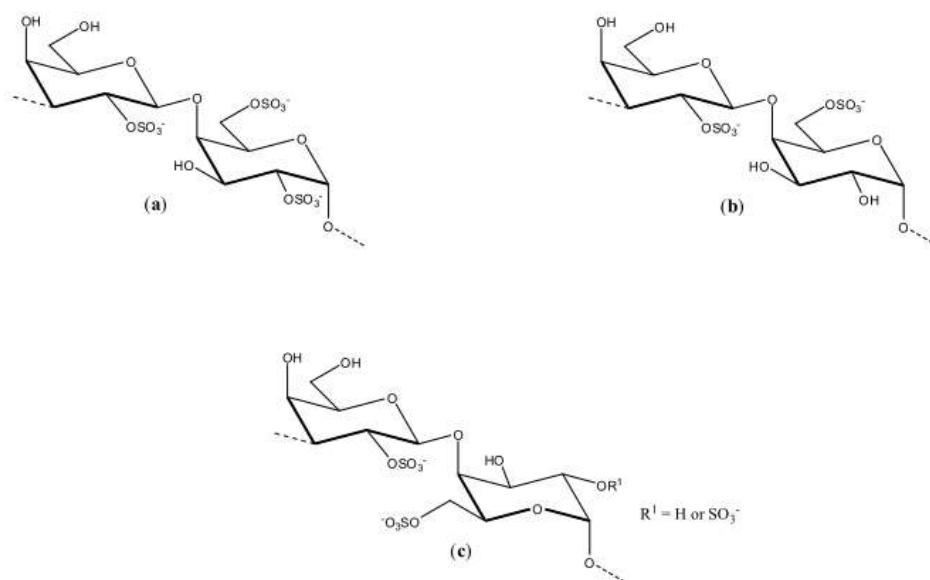


Figura 1.21 – Representação de unidades de dissacarídeos presentes na estrutura de C2S-3.

A avaliação da atividade antiviral de G3d e C2S-3 foi realizada *in vitro* e verificou-se que a atividade antiviral na dengue dos polissacáridos sulfatados G3d e C2S-3 depende tanto do serótipo do vírus como da célula hospedeira. Ambos os compostos foram capazes de inibir a DENV-2 em células Vero, com valores de IC₅₀ de 1 µg/mL e índices de seletividade superiores a 1000. Os compostos foram completamente ineficazes contra DENV-1, DENV-3 e DENV-4 (valores de IC₅₀ significativamente maiores). Do ponto de vista de mecanismo de acção, determinou-se que G3D e C2S-3 apresentam efeitos inibitórios sobre o serotipo DENV-2 apenas quando são adicionados em conjunto com o vírus ou logo após a infeção. Portanto, os processos de adsorção do vírus e internalização parecem ser os principais alvos destes compostos. Os resultados sugerem que estes compostos podem agir sobre a ligação do vírus.

Estes polissacarídeos podem ser ferramentas úteis para elucidar os mecanismos de ligação e internalização dos sorotipos DENV e também para estabelecer relações estrutura-atividade. ⁽²⁶⁸⁾ Outro estudo envolvendo polissacarídeos sulfatados mostrou que os extratos de carragenanos de *Meristiella gelidium* eram inibidores mais eficazes de DENV-2 do que os derivados de *Gymnogongrus griffithsiae*, contudo nenhuma descrição sobre o mecanismo de acção para a inibição de DENV foi reportado. ⁽²⁷⁶⁾

Uma série de DL-galactanos isolados a partir da alga vermelha *Gymnogongrus torulosus* também foram avaliados *in vitro* contra o serotipo DENV-2 em células Vero. ⁽²⁶⁹⁾ Os polissacarídeos avaliados revelaram-se muito ativos contra o serotipo DENV-2, com valores de IC₅₀ variando de 0,19-1,7 µg/mL. Em adição à sua atividade inibitória, os compostos não apresentaram efeitos citotóxicos nas células, mas apresentaram propriedades anticoagulantes. Foi sugerido que o mecanismo de acção destes compostos envolve uma interferência na ligação da glicoproteína de superfície com o recetor de células. ⁽²⁶⁹⁾

Foram também realizados estudos de atividade anti-DENV com polissacáridos de armazenamento de plantas, conhecidos como galactomananos. Estes compostos são caracterizados por uma cadeia principal de resíduos β-D-manopiranosilo ligados nas posições 1 e 4 com uma unidade única de resíduos de α-D-galactopiranosilo na cadeia lateral (figura 1.22).

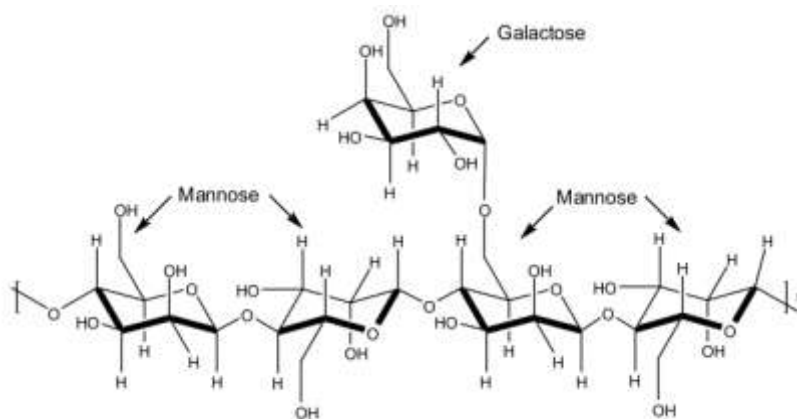


Figura 1.22 – Representação da estrutura molecular base dos galactomananos.

Foram efetuados estudos com dois galactomananos sulfatados, ⁽²⁷²⁾ isolados a partir das sementes *Mimosa scabrella*, com uma relação manose/galactose de 1:1, e a partir de sementes de *Leucaena leucocephala* (proporção manose/galactose de 1:4). Os polissacarídeos sulfatados, designados pelos autores como BRS (a partir de *Mimosa scabrella*) e LLS (a partir de *Leucaena leucocephala*) foram submetidos a ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliar os seus efeitos sobre o DENV-1 (estirpe Hawaii). O ensaio *in vivo* foi levado a cabo com ratos fêmea para determinar a atividade antiviral e não se verificou a morte de ratos infetados com o DENV-1. A avaliação *in vitro* foi conduzida com células C6/36 e verificou-se que as concentrações que produzem uma diminuição em 100 vezes no título de vírus eram 347 mg/L e 37 mg/L para BRS e LLS respetivamente. ⁽²⁷²⁾

1.8.1.2. Flavonóides

Existem vários estudos que demonstraram que alguns flavonóides possuem atividade antiviral na dengue.

Os compostos glabranina e 7-*O*-metilglabranina (figura 1.23), isolados a partir de espécies de *Tephrosia* de origem mexicana, mostraram uma significativa atividade antiviral no serotipo DENV-2, apresentando cerca de 70% de inibição da infeção pelo vírus a concentrações da ordem de 25 $\mu\text{mol/L}$.

Considerando-se as estruturas dos compostos estudados, é evidente que existe uma relação entre a estrutura e atividade antiviral da glabranina e 7-*O*-metilglabranina, uma vez que estes flavonóides contêm uma cadeia lateral com o grupo prenilo no carbono 8 enquanto outros flavonóides da *Tephrosia*, que não tinham este grupo, não se relevaram ativos como inibidores da replicação do vírus. ⁽²⁸⁰⁾

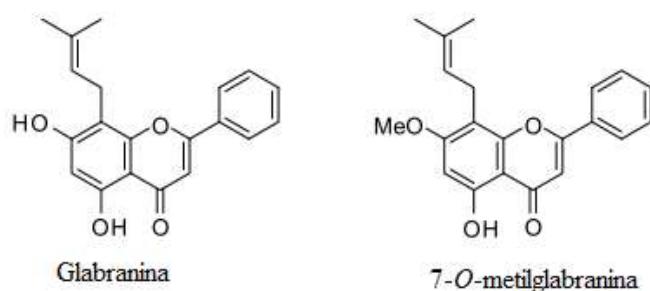


Figura 1.23 – Representação das estruturas moleculares de flavonóides de espécies mexicanas de *Tephrosia*.

O extrato aquoso de *Houttuynia cordata*, uma planta que faz parte de um prato de vegetais consumido nas regiões norte e oriental da Tailândia, foi testado contra DENV-2. ⁽²⁷¹⁾ Os ensaios para avaliar a atividade antiviral dos extratos de *Houttuynia cordata* exibiram um efeito inibitório na produção de ARN de DENV-2 em todos os protocolos experimentais. As experiências foram conduzidas a 10 µg/mL e 100 µg/mL. A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) permitiu identificar o flavonóide hiperósido como o principal componente do extrato (figura 1.24).

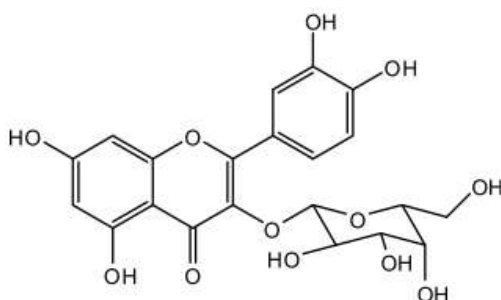


Figura 1.24 – Representação da estrutura molecular do flavonóide hiperósido.

Pensa-se que a atividade antiviral observada na dengue está associada com a presença deste flavonóide como componente principal no extrato aquoso, embora não tenham sido efetuados testes com o composto isolado. O extrato também protege a entrada do vírus nas células e inibe a atividade do vírus após a adsorção e o hiperósido no extrato provavelmente inibiu a síntese de ARN intracelular através da interação com enzimas ou proteínas na replicação viral. ⁽²⁷¹⁾

Os flavonóides, pinostrobrina, pinocembrina, alpinetina, cardamonina, panduratina e 4-hidroxipanduratina (figura 1.25), foram isolados a partir *Boesenbergia rotunda* (L.) uma espécie pertencente à família do gengibre (*Zingiberaceae*).⁽²⁶⁴⁾

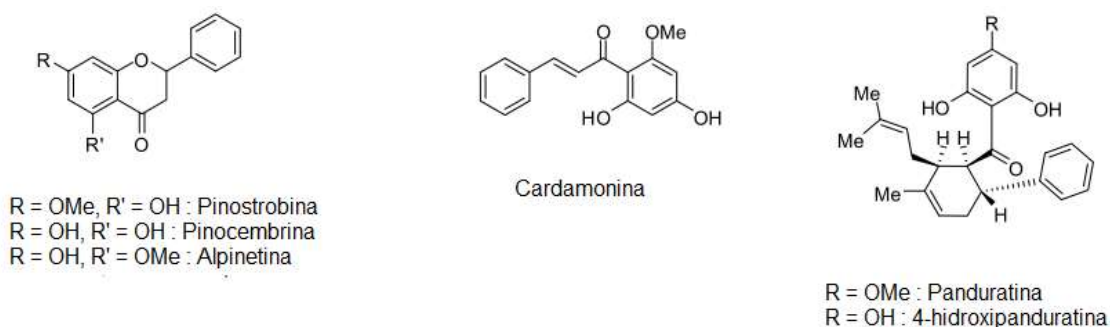


Figura 1.25 – Representação das estruturas moleculares de flavonóides.

Estes compostos naturais foram rastreados contra a protease NS2B-NS3 do DENV-2 por ensaio enzimático utilizando a protease purificada.⁽²⁶⁴⁾ O aumento de concentração dos compostos nos ensaios levou a um aumento da inibição da atividade da enzima. Entre estes flavonoides, a pinocembrina foi o menos ativo, com inibição da atividade da protease por cerca de 60% a 400 ppm de concentração. As substâncias mais ativas foram a panduratina e a 4-hidroxipanduratina, tendo sido determinado que ambos são inibidores competitivos da atividade da protease NS2B-NS3 com constantes de inibição (K_i) de 21 e 25 $\mu\text{mol/L}$.⁽²⁶⁴⁾

Os flavonóides quercetina (figura 1.26), naringenina, daidzeína, e hesperitina foram avaliados *in vitro* contra o serotipo DENV-2, utilizando células Vero. Destes compostos apenas a quercetina apresentou uma atividade inibitória significativa (IC_{50} foi de 35,7 $\mu\text{g/mL}$) contra a infecção por DENV-2 em células Vero. O mecanismo pelo qual a quercetina exerce o seu efeito antiviral permanece desconhecido. No entanto, acredita-se que a atividade antiviral da quercetina na dengue pode ser semelhante à exibida por outros flavonóides que inibem ARN-polimerases celulares e a formação do complexo com o ARN.⁽²⁸⁹⁾

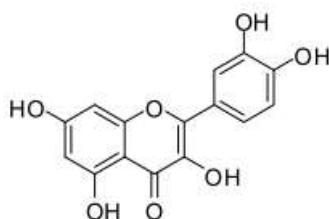


Figura 1.26 – Representação da estrutura molecular da quercetina.

Foram realizados estudos *in vitro* para avaliação dos efeitos antivirais da naringenina, rutina e fisetina (figura 1.27) contra DENV-2, nas diferentes fases de infecção por DENV-2. Os estudos revelaram que entre os flavonóides estudados apenas a fisetina apresentou atividade significativa *in vitro* relativamente à atividade de replicação do vírus da dengue, ⁽²⁹⁰⁾ com inibição da replicação do vírus (IC₅₀ de 55 µg/mL) após a absorção do vírus em células Vero. O modo de ação da fisetina e seu efeito na replicação do vírus DENV não é claro, no entanto pensa-se que a fisetina não é suscetível de atuar diretamente sobre o vírus, uma vez que não afeta a ligação do DENV-2 às células. Porém, pensa-se que poderia afetar a cópia do genoma do DENV por interferência na replicação do DENV-2, devido a ligação ao ARN do vírus ou formando um complexo ARN-flavonóide, ou afetando ARN-polimerases, com conseqüente inibição da replicação do vírus. ⁽²⁹⁰⁾

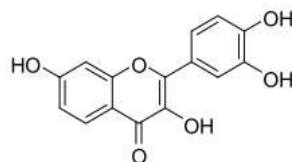


Figura 1.27 – Representação da estrutura molecular da fisetina.

Foi realizado um estudo com 1.350 extratos, preparados a partir de várias partes de cerca de 650 plantas da Nova Caledónia, de modo a verificar o efeito na atividade da polimerase NS5 do DENV-2. Entre os vários extratos ativos, destaca-se o extrato da casca de *Cryptocarya chartacea*, uma espécie que pertence à família *Lauraceae*, ⁽²⁹¹⁾ a partir do qual foram isolados flavonóides não alquilados, como a pinocembrina, bem como uma série novos mono e dialquilados designados por chartaceones A-F (figura 1.28).

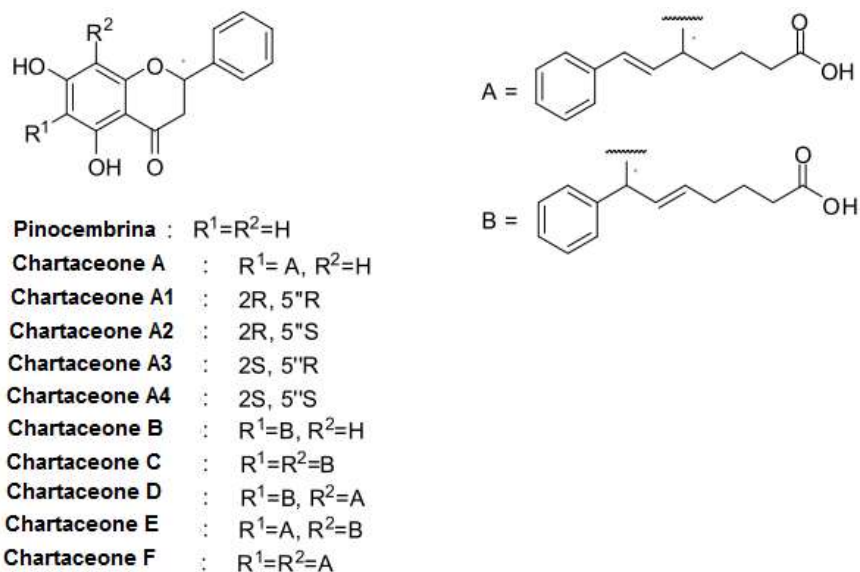


Figura 1.28 – Representação das estruturas moleculares da pinocembrina e chartaceones.

O estudo revelou que os chartaceones C-F foram os mais ativos na inibição da atividade da polimerase (IC_{50} variando de 1.8 para 4.2 $\mu\text{mol/L}$) enquanto os outros chartaceones foram menos eficazes e a pinocembrina se mostrou inativa. Estes resultados sugerem que a presença de cadeias alquiladas nas estruturas dos chartaceones C-F desempenham um papel importante em termos de atividade inibidora sobre a polimerase NS5 do DENV-2 e concluiu-se que as cadeias laterais A e B (figura 1.28) desempenham um papel equivalente em termos de atividade biológica. ⁽²⁹¹⁾

A baicaleína (figura 1.29) é extraída das raízes da *Scutellaria baicalensis*, uma erva usada na medicina chinesa tradicional pertencente à família *Lamiaceae*. ⁽²⁹²⁾ Estudos *in vitro* utilizando células Vero para avaliar a atividade antiviral da baicaleína contra DENV-2 mostraram uma inibição da replicação do serotipo DENV-2 com um valor de IC_{50} de 6,46 $\mu\text{g/mL}$. Revelaram ainda efeito virucida direto (IC_{50} de 1,55 $\mu\text{g/mL}$) bem como anti-adsorção (IC_{50} de 7,14 $\mu\text{g/mL}$) contra o DENV-2. Os resultados sugerem que um possível mecanismo para as atividades extracelulares e intracelulares da baicaleína contra o DENV-2 possa ser atribuído à sua capacidade para se ligar e/ou para inativar proteínas estruturais e outras proteínas importantes do DENV-2. ⁽²⁹²⁾

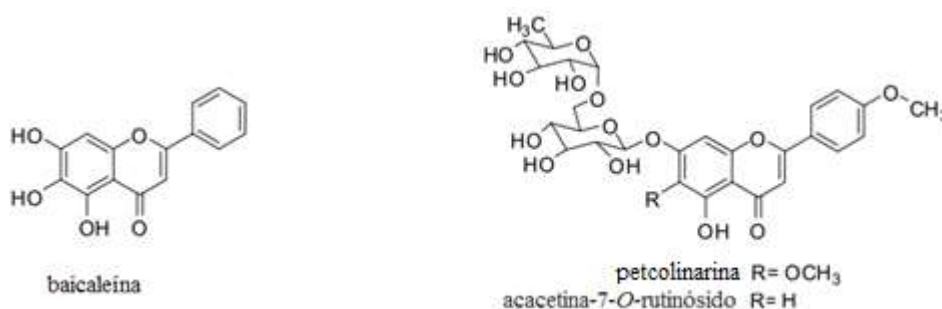


Figura 1.29 – Representação das estruturas moleculares de baicaleína, petcolinarina e acacetina-7-O-rutinósido.

A petcolinarina (figura 1.29), foi isolada a partir de extratos de folhas de *Distictella elongate*. Foi também isolada uma mistura de petcolinarina e acacetina-7-O-rutinósido (figura 1.29) a partir de frutos, tendo-se avaliado a atividade antiviral contra DENV-2 utilizando células Vero e LLCMK2. A mistura de petcolinarina e acacetina-7-O-rutinósido apresentou maior atividade antiviral (EC_{50} de $11,1 \pm 1,6 \mu\text{g/mL}$) do que a petcolinarina pura (EC_{50} $86,4 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$). O mecanismo de inibição dos compostos não é claro, mas sugere-se que possa corresponder a um dos mecanismos já descritos para flavonoides. ⁽²⁹³⁾

1.8.1.3 Alcalóides e compostos afins

Entre estes compostos verificou-se que a emetina (figura 1.30), um dos alcalóides da ipecacuanha, na forma de diclorohidrato, exibe uma potente atividade antiviral na DENV na concentração de $0,5 \mu\text{mol/L}$ (277 ng/mL). ⁽²⁹⁴⁾ Estudos *in vitro* utilizando células Huh-7 e BHK21 mostraram que o diclorohidrato de emetina inibe a infecção por DENV nas fases iniciais do ciclo de replicação viral, afetando a via de síntese do ARN viral ou a via de tradução da proteína viral.

A *Coptis chinensis*, uma planta medicinal usada na China para tratamentos bacterianos, inflamatórios, fúngicos e outras doenças, não apresentando efeitos colaterais significativos ou toxicidade para o ser humano em doses clínicas, ⁽²⁹⁵⁾ apresenta uma elevada concentração de palmatina (figura 1.30). A actividade deste composto contra DENV-2 foi avaliada *in vitro* utilizando células Vero, apresentando uma EC_{50} de $26,4 \mu\text{mol/L}$.

Foi demonstrado através de ensaios enzimáticos que a palmatina pode inibir a protease NS2B-NS3 do vírus do Nilo ocidental. O mecanismo pelo qual a palmatina inibe o vírus ainda não está esclarecido.

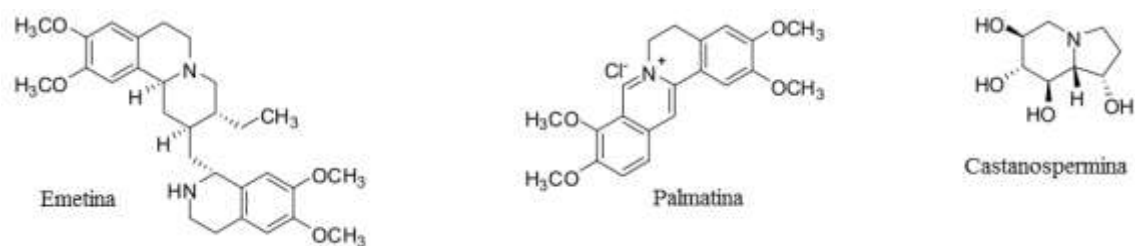


Figura 1.30 – Representação das estruturas moleculares da emetina, palmatina e castanospermina.

A castanospermina (figura 1.30), é um alcaloide extraído de *Castanospermum australe*. Foi avaliada *in vitro* e *in vivo* contra todos os serotipos do vírus da dengue. Nos estudos *in vitro* para investigar a atividade antiviral foram usadas células BHK-21 e o estudo *in vivo* foi realizado com ratinhos A/J de 28 a 31 dias de idade. Verificou-se que este alcalóide inibe todas as infecções pelos serotipos do vírus da dengue *in vitro* mas apenas a infecção pelo serotipo 2 do vírus *in vivo* e que a inibição pela castanospermina ocorre no nível de secreção e da infeciosidade das partículas virais. ⁽²⁹⁶⁾

A geneticina é um aminoglicósido (figura 1.31) que apresenta atividade antiviral contra o vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Dado que o vírus da dengue, o vírus da febre amarela e o BVDV são vírus da família *Flaviviridae*, foi avaliada a atividade antiviral *in vitro*, em células BHK, da geneticina contra o vírus da dengue. Os resultados demonstraram que o composto inibe a proliferação do DENV-2 por : proteção das células BHK contra o efeito citopático do DENV-2, redução da carga viral, inibição quer em número quer em tamanho da formação de placas DENV-2 e por bloqueio do ARN do DENV-2 e da síntese de proteínas. O mecanismo molecular da atividade antiviral da geneticina permanece pouco claro, no entanto os resultados sugerem que o mecanismo antiviral da geneticina é do tipo independente da célula. ⁽²⁹⁷⁾

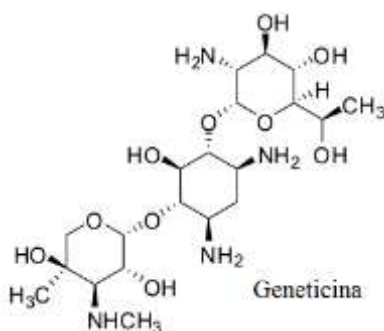


Figura 1.31 – Representação da estrutura molecular da geneticina.

1.8.1.4. Terpenóides

A partir da casca e da madeira de *Trigonostemon cherrieri*, uma planta rara da Nova Caledônia, foram isolados e caracterizados diversos compostos entre os quais os terpenos oxigenados (figura 1.32), os quais foram avaliados relativamente à capacidade para interferir com a polimerase NS5 de DENV, tendo todos apresentado efeitos inibidores sobre a atividade da enzima, com o IC₅₀ de 12,7 ± 0,2; 3,1 ± 0,2 e 16,0 ± 1,3 μmol/L para os compostos A, B e C, respetivamente, não existindo informação sobre o mecanismo de inibição dos compostos. ⁽²⁹⁸⁾

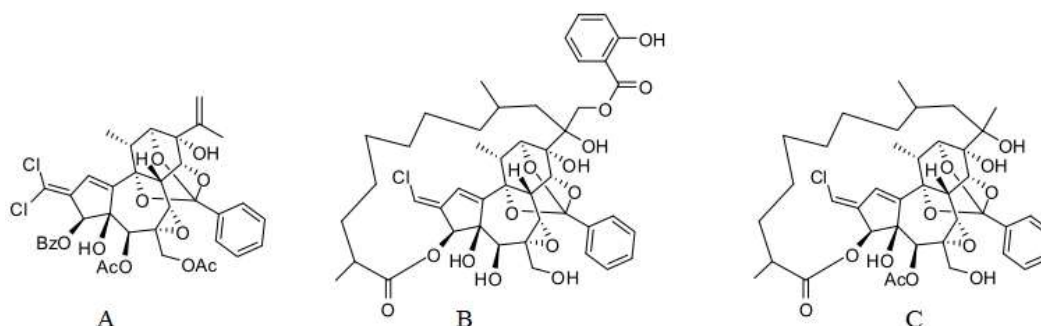


Figura 1.32 – Representação das estruturas moleculares de terpenos extraídos de *Trigonostemon cherrieri*.

Uma investigação sobre os constituintes químicos antivirais presentes no extrato etanólico de folhas de *Arrabidaea pulchra* resultou no isolamento do composto triterpeno e de derivados fenólicos (figura 1.33).

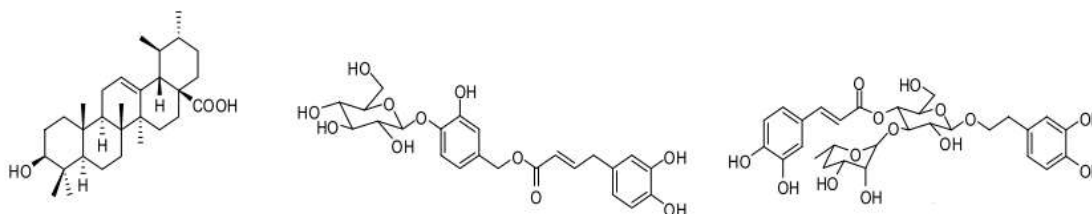


Figura 1.33 – Representação da estrutura molecular de triterpeno e derivados fenólicos, extraídos de *Arrabidaea pulchra*.

Os compostos isolados apresentaram atividade contra o DENV-2 *in vitro* em células LLCMK 2 e células Vero. O mesmo ensaio foi realizado com Herpesvírus Humano-1 (HSV-1), Vírus Vaccinia Western Reserve (VACV-WR) e vírus da encefalomiocardite dos roedores (EMCV). A inibição do HSV-1 e VACV-WR foi menor que a do DENV-2, e não foi observada inibição para EMCV. O esclarecimento do mecanismo da atividade antiviral requer ainda novas investigações. ⁽²⁹⁹⁾

1.8.1.5. Quinonas policíclicas

As quinonas policíclicas gymnochromo D e isogymnochromo D (figura 1.34) foram isolados a partir de crinóides fósseis vivos da espécie *Gymnocrinus richeri* ⁽³⁰⁰⁾ tendo sido avaliado o seu efeito sobre DENV-1 (estirpe Hawai / 1944) *in vitro* utilizando células porcinas (PS). Os resultados mostraram que estes compostos exibem atividade antiviral sobre o DENV-1, não tendo sido elucidado o mecanismo pelo qual os compostos podem inibir o vírus. ⁽³⁰⁰⁾

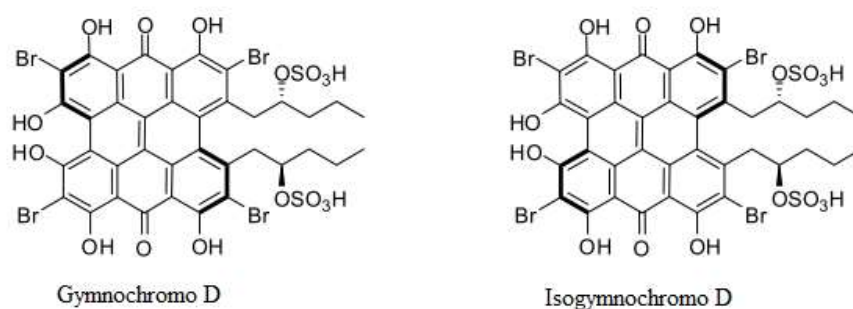


Figura 1.34 – Representação das estruturas moleculares de quinonas cíclicas extraídas de *Gymnocrinus richeri*.

As quinonas policíclicas hipericina, tetrabromohipericina e gymnochromo B (figura 1.35) foram igualmente avaliadas *in vitro* em células PS relativamente ao seu efeito antidengue contra os serotipos 2 e 4. Determinou-se que todas estas quinonas apresentam atividade antiviral e viricida, atividades que são potenciadas pela luz. A atividade viricida apresentou a seguinte ordem crescente de potência: tetrabromohipericina ($EC_{50} = 2,8 \text{ nmol/mL}$); hipericina ($EC_{50} = 1,8 \text{ nmol/mL}$); gymnochromo B ($EC_{50} = 0,042 \text{ nmol/mL}$). Uma tendência semelhante foi encontrada para o efeito antiviral: tetrabromohipericina ($EC_{50} = 3,7 \text{ nmol/L}$); hipericina ($EC_{50} = 0,6 \text{ nmol/mL}$); gymnochromo B ($EC_{50} = 0,029 \text{ nmol/L}$). Considerando-se que o composto que relevou maior atividade foi o gymnochromo B postulou-se que a presença da cadeia lateral na estrutura do composto parece ser benéfica para as atividades antiviral e viricida. ⁽³⁰¹⁾

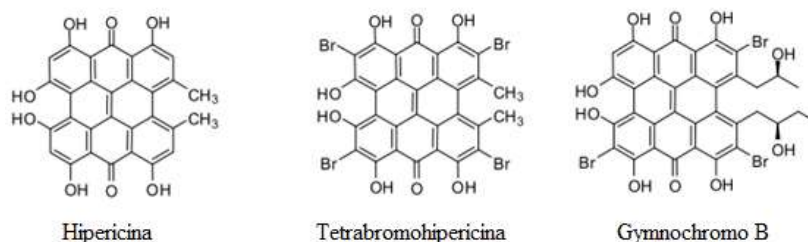


Figura 1.35 – Representação das estruturas moleculares de quinonas policíclicas.

1.8.1.6. Compostos fenólicos

O rastreio de extractos de 850 plantas de Madagáscar resultou no isolamento de vários glicósidos fenólicos de *Flacourtia ramontchi*, tendo sido avaliada a atividade antiviral de vários compostos, em ensaios enzimáticos, usando a enzima purificada polimerase NS5 do vírus da dengue. Os glicósidos fenólicos (figura 1.36) mais ativos contra a polimerase NS5 de DENV revelaram valores de IC_{50} de $9,3 \pm 2,8 \mu\text{mol/L}$ e $9,5 \pm 5,0 \mu\text{mol/L}$. O mecanismo de ação destes compostos precisa ser investigado.⁽³⁰²⁾

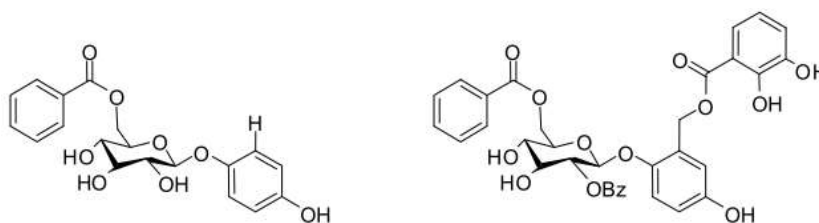


Figura 1.36 – Representação da estrutura molecular de Glicósidos fenólicos extraídos de *Flacourtia ramontchi*.

O galato de metilo (figura 1.37), purificado a partir do extrato metanólico de *Quercus lusitanica*, foi testado *in vitro*, em células C6/36, num ensaio contra o serotipo 2 do vírus da dengue e num ensaio enzimático com a protease NS2B purificada de DENV-2, mostrando uma inibição de 98% da protease NS2B do DENV-2. As células C6/36 mostraram que o efeito dos extratos metanólicos, bem como do galato de metilo purificado a partir dos extratos, regulam negativamente a expressão da proteína NS1. Esse resultado pode estar relacionado com a redução ou ausência de um efeito citopático em células C6/36 infetadas.⁽³⁰³⁾

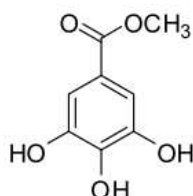


Figura 1.37 – Representação da estrutura molecular do galato de metilo.

1.8.1.7. Outros compostos

Vários outros compostos (figura 1.38) têm sido relatados como possuindo atividade antiviral. O ácido zoastérico, obtido a partir da *Zostera marina*, foi testado na inibição de todos os serotipos do vírus da dengue, tendo apresentado uma modesta atividade antiviral contra o serotipo 2 em ensaios *in vitro* com células LLCMK-2. Em ensaio semelhante, o análogo sintético do ácido zoastérico mostrou ser um composto mais ativo, com efeitos inibitórios contra todos os serotipos de DENV. O análogo do ácido zoastérico mostrou que a inibição está relacionada com o passo inicial da entrada do vírus na célula no início do ciclo de vida viral, o que foi avaliado pelo doseamento por RT-PCR da ligação vírus-célula. ⁽²⁸³⁾

A esqualamina (figura 1.38) foi descoberta pela primeira vez nos tecidos do tubarão peixe cão (*Squalus acanthias*) e mais tarde identificada nos glóbulos brancos circulantes da lampreia (*Petromyzon marinus*). Foi avaliado o efeito *in vitro* de esqualamina sobre a infecção do vírus da dengue em células endoteliais humanas (HMEC-1) e observou-se uma inibição de 60% da infecção usando a concentração de 40 µg/mL, sendo que a infecção por dengue foi completamente inibida a 100 µg / ml. O mecanismo de ação proposto envolve a capacidade da esqualamina para neutralizar a carga negativa da superfície eletrostática das membranas intracelulares, de uma forma que torna a célula menos eficaz no apoio à replicação viral. ⁽³⁰⁴⁾

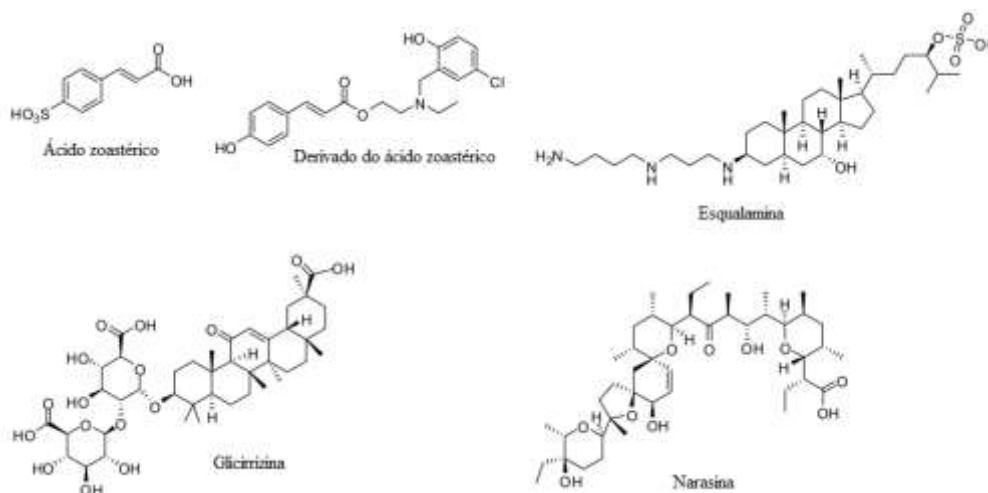


Figura 1.38 – Representação das estruturas moleculares de compostos com atividade antiviral.

A glicirrizina (figura 1.38), o componente principal da *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), uma raiz com sabor doce, foi avaliada contra onze flavivírus, incluindo o

DENV-1, DENV-2 e DENV-3.⁽³⁰⁵⁾ A avaliação antiviral foi realizada *in vitro* com células Vero, sendo mais efetiva a atividade antiviral no serotipo DENV-2.

A narasina (figura 1.38) é um poliéter com propriedades antibióticas produzido por fermentação de *Streptomyces aureofaciens*. Um estudo dependente da dose revelou que a narasina tem uma IC₅₀ de menos de 1 µmol/L contra os quatro serotipos da DENV.⁽³⁰⁶⁾ Ensaio *in vitro* com células Huh-7 sugerem que no tratamento de células infectadas por DENV-2 a narasina está envolvida na inibição das etapas pós-entrada de replicação viral durante a infecção por DENV. O mecanismo antiviral de narasina é suscetível de ser associada com a inibição da síntese proteica viral. No entanto, é necessário uma investigação mais detalhada para compreender o mecanismo molecular exato da narasina na inibição da síntese de proteínas e replicação do DENV.⁽³⁰⁶⁾

Foi isolada uma série de compostos acetilénicos (figura 1.39) a partir de um extracto em acetato de etilo de *Anacolosa pervilleana*, uma planta de Madagascar. Em ensaios enzimáticos utilizando a polimerase RdRp purificada de DENV verificou-se que os compostos acetilénicos inibem a atividade enzimática, com valores de IC₅₀ de cerca de 3 µmol/L.

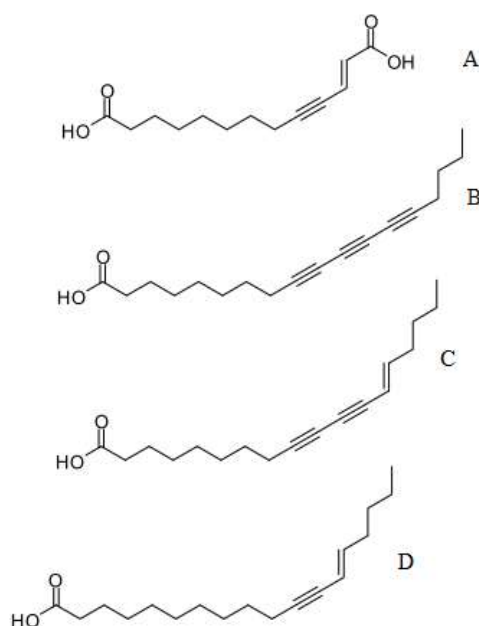


Figura 1.39 – Representação das estruturas moleculares de compostos acetilénicos extraídos de *Anacolosa pervilleana*.

Todos os compostos, exceto o composto A (figura 1.39), mostraram um efeito global antimetabólico em células Vero (CC₅₀ entre 20 e 30 µmol/L), suspeitando-se que a presença de um grupo ácido adicional no composto A provavelmente impede a sua penetração através da membrana celular, o que pode explicar a ausência de citotoxicidade. (307)

Estudos com extratos de plantas medicinais e óleos essenciais revelaram propriedades antivirais. (308,309) Alguns extratos de plantas, em diferentes solventes, exibiram atividade contra o vetor da dengue, *Aedes aegypti*. (310,311) Algumas das plantas cujos extratos foram preparados e testados relativamente contra DENV, listadas na Tabela 1.7, mostraram uma atividade anti-dengue com IC₅₀ inferior a 5 µg/mL nos quatro serotipos do DENV. Contudo, os extratos destas plantas precisam ser mais estudados, no sentido de identificar e isolar os compostos bioativos potenciais, necessários para o desenvolvimento de novos produtos anti-dengue eficazes e menos tóxicos. Neste sentido, os estudos sobre o potencial de plantas como fontes de novos compostos ativos, com atividade anti-dengue demonstrada em testes *in vitro* e *in vivo* em animais, devem ser seguidos por testes de toxicidade e testes clínicos. A identificação do potencial de plantas anti-dengue e seus compostos, bem como o conhecimento dos mecanismos de infecção pelo vírus precisam ser entendidos para facilitar a busca e desenvolvimento dos fármacos mais apropriados.

Deste modo, nos últimos anos as pesquisas têm-se direcionado para a procura de fármacos que inibam a propagação da infecção pelo vírus, focando o desenho em estruturas direcionadas a cada fase do ciclo de vida do vírus, no sentido de evitar a infecção das células hospedeiras, o processo de maturação viral, a síntese do ARN viral ou a propagação das partículas virais.

1.8.2. Fármacos com atividade antiviral na dengue e seus alvos terapêuticos

Presentemente não está disponível um medicamento para o tratamento ou prevenção da infecção pelo DENV. Por conseguinte, o desenvolvimento de novas moléculas antivirais contra DENV tem atraído um interesse significativo nos últimos anos, quer por diversos grupos de investigação quer por empresas farmacêuticas que possuem bibliotecas de compostos sintéticos cujas estruturas têm frequentemente como

base estruturas de compostos naturais com atividade antiviral demonstrada. Deste modo, a abordagem na obtenção de fármacos para a dengue tem-se centrado no ciclo de vida do vírus da dengue, visando por exemplo a procura de inibidores da entrada do vírus nas células ou inibidores de proteínas envolvidas no processo de replicação do vírus, entre as quais se destacam a proteína da cápside (C), a proteína do envelope (E), a NS3 (com o domínio de serina protease e domínio de helicase), e a NS5 (com o domínio de metiltransferase e domínio de ARN polimerase-ARN dependente (RdRp) envolvida na replicação viral).

Assim, seguidamente apresenta-se de modo sumário uma visão geral sobre os desenvolvimentos e estratégias recentes, que abrange os candidatos a fármacos anti DENV utilizando uma abordagem aos alvos de fármacos no vírus e no hospedeiro, e também uma abordagem aos fármacos em fase de desenvolvimento clínico.

1.8.2.1. Inibidores da entrada do vírus e inibidores da cápside

A inibição da entrada do vírus nas células hospedeiras tem sido o principal ponto de intervenção na pesquisa de fármacos para a dengue. Foi demonstrado que na fase inicial da infecção a proteína viral E liga-se a um glicosaminoglicano sulfatado, o sulfato de heparano, na membrana da célula hospedeira. ⁽³¹²⁾ Os anticorpos monoclonais e a heparina demonstraram capacidade de inibir a ligação e a penetração do vírus do dengue. ⁽³¹³⁾ Estas descobertas conduziram ao desenvolvimento de compostos miméticos de heparano, os quais exibiram capacidade de inibir a ligação entre a proteína E e o heparano *in vitro*. ⁽⁴⁶⁾ O Instituto Nacional do Cancro (NCI) e o Instituto Novartis de Doenças Tropicais (NITD) rastrearam entre 142000 a 200000 compostos para avaliar a atividade anti dengue. Foram identificadas algumas moléculas de baixo peso molecular que se ligam no poço hidrofóbico formando um β -N-octil-glucósido (β OG), na proteína E de DENV. ⁽³¹⁴⁾ Foram identificadas duas classes de compostos: a primeira, representada por NITD-448 (tabela 1.8), inibe a fusão com a membrana mediada pela proteína E bem como infecção por DENV; a segunda representada por exemplo pelo composto 6 da tabela 1.8, contendo um núcleo de quinazolina, mostrou capacidade de inibir o vírus DENV em ensaios laboratoriais e clínicos, com valores de EC_{50} na gama micromolar baixa e nanomolar. ⁽³¹⁵⁾

Tabela 1.8 – Inibidores da entrada do vírus e inibidores da cápside (Adaptado de ^(74,316))

Composto	Mecanismo/Alvo	Serotipo	Atividade/Eficácia (EC ₅₀ ou IC ₅₀ /CC ₅₀) μM	Referências
Inibidores da entrada do vírus				
NITD-448	Inibidor da fusão, ligação no poço hidrofóbico formando um βOG com a proteína E	DENV-2	9.8/48.7	(317)
Composto 6	Inibidor da fusão, ligação no poço hidrofóbico formando um βOG com a proteína E	Todos	0.119/>20	(315)
A5	Inibidor da fusão, ligação no poço hidrofóbico formando um βOG com a proteína E	DENV-2	1.2/>100	(318)
P02	Inibidor da fusão, ligação no poço hidrofóbico do vírus da dengue	vírus da febre amarela	13/371	(319)
1662G07	Inibidor da fusão. Interação com haste da proteína E e trómeros de proteína E	DENV-2	8/>100	(320)
1OAN1 (péptido baseado no domínio II da proteína E)	Inibidor da fusão. Interação com proteína E bloqueando a ligação do vírus às células.	DENV-2	7/>50	(321,322)
DN57opt (péptido baseado no domínio II da proteína E)	Inibidor da fusão. Interação com proteína E bloqueando a ligação do vírus às células.	DENV-2	8	(321)
DN59 (péptido baseado na sequência da haste da proteína E)	Inibidor da fusão. Ligação aos trómeros de proteína E bloqueando a ligação da haste	DENV-2	10/>30	(323)
E 419-447 (péptidos baseados na sequência da haste da proteína E)	Ligação aos trómeros da proteína E	DENV-2	IC ₉₀ : 0,1-6	(320)
E 380-389 (péptidos baseados na sequência do domínio III da proteína E)	Inibição da ligação do vírus	DENV-2	35	(324)

Antibiótico SA-17 (derivado da doxorubicina)	Inibidor da entrada do vírus. Possível ligação no poço hidrofóbico formando um β OG com a proteína E	DENV-1 DENV-2 DENV-3	0,52/53	(325)
Antibiótico LCTA-949 (análogo da teicoplanina)	Inibidor da entrada do vírus.	DENV-2	6,9/>25	(326)
Rolitetraciclina (derivado da tetraciclina)	Inibidor da fusão, ligação no poço hidrofóbico com proteína E	DENV-2	67	(327)
Doxiciclina (derivado da tetraciclina)	Inibidor da fusão, ligação no poço hidrofóbico com proteína E	DENV-2	55	(320)
Taninos HHA, GNA e UDA	Interação com proteína E. Inibição do DC-SIGN.	Todos	EC ₅₀ : 4.6; 3.8; 0.29nM	(328)
Pradimicina-S	Interação com proteína E. Bloqueio da ligação do vírus.	DENV-2	11	(328)
PI_88, suramina e polissulfato de pentosano	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	DENV-2	EC ₅₀ : 200 μ g/mL	(329)
Fucoidano	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	DENV-2	IC 50 : 4.7 μ g/mL	(267)
Galactomanano sulfatado	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	DENV-1	EC ₅₀ : 200 mg/mL	(272)
DL-galactano	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	DENV-2	IC ₅₀ : 0,9-1 μ g/mL	(268)
Iota-carragenano	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	DENV-2	IC ₅₀ : 0,4 μ g/mL	(268)
Ácido Zoostérico e análogo sintético CF-238	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	Todos	14-47	(283)

Sulfato de curdlano	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	DENV-2	EC ₅₀ : 7 µg/mL	(330)
Galactano sulfatado, xilomanano sulfatado	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	Todos	IC ₅₀ : 0.12-20 µg/mL	(331)
Polissacárido sulfatado K5	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	DENV-2	EC ₅₀ : 111nM	(332)
Ácido chebulagico, punicalgina (Taninos hidrolizáveis)	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	DENV-2	13,1 e 7,8	(333)
Sulfato de condroitina E	Interação com proteína E. Competição com sulfato de heparano inibe ligação e entrada do vírus.	Todos	EC ₅₀ : 0,3 µg/mL	(334)
Anticorpo monoclonal 9D12	Interação com proteína E	DENV-2	36-49 % bloqueio da adsorção do vírus	(335)
Anticorpos monoclonais humanos DV87.1; DV22.3 e DV88.11	Interação com proteína E	DENV-1,2,3; DENV-4; DENV-1-4	EC ₅₀ : 0,002-0,008 µg/mL; 0,004 µg/mL; 0.02-0.168 µg/mL	(336)
Anticorpos monoclonais humanos IF4; 2D22 e 5J7	Interação com proteína E	Todos	EC ₅₀ : 0,11->10 mg/mL	(337)
Anticorpos monoclonais humanos	Interação com proteína E	Todos	EC ₅₀ : 0,2->40 µg/mL	(338)
Inibidores da cápside				
ST-148	Ligação à proteína C	Todos	0.016/>100 Eficaz em modelo animal (rato AG129)	(339)

Foram também avaliados outros compostos, entre os quais alguns péptidos e antibióticos (tabela 1.8), que revelaram possuir atividade anti-dengue no processo de entrada do vírus na célula. Por outro lado, apenas foi identificado um inibidor da cápside,

o composto ST-148 (tabela 1.8), que tem como alvo a proteína C. Também foram identificados carboidratos, conhecidos como agentes ligantes, que se ligam à proteína E e competem com os receptores celulares para a ligação ao vírus. Entre estes destacam-se como as lectinas HHA (*Hippeastrum híbrido*), GNA (*Galanthus nivalis*), e UDA (*Urtica dioica*) (tabela 1.8), bem como polissacáridos de origem natural (seção 1.8.1.1.) que são na sua maioria agentes miméticos do sulfato de heparano (tabela 1.8), os quais têm mostrado forte atividade antiviral contra os serotipos da dengue.

1.8.2.2. Inibidores da proteína NS4B do DENV

A proteína NS4B, semelhante a NS4A, é uma proteína integral da membrana, que se insere nas membranas derivadas do retículo endoplasmático. A NS4B desempenha um papel importante na replicação viral, embora não contenha diretamente qualquer atividade enzimática.⁽³⁴⁰⁾ No entanto, estudos *in vitro*, mostraram interação da NS4B com o domínio helicase da NS3, demonstrando que a atividade de helicase poderia ser estimulada pela NS4B.⁽³⁴¹⁾ Além disso foi evidenciado que mutações na NS4B podem modular a atividade da replicação do vírus da dengue,⁽³⁴²⁾ o que validou a NS4B como um alvo atrativo para a descoberta de fármacos.

De entre os compostos estudados para avaliar a atividade antiviral na dengue, identificou-se um inibidor da NS4B, o NITD-618⁽³⁴³⁾ (tabela 1.9), ativo contra os quatro serotipos mas inativo contra o ARN viral de outras flavivirose. Estes resultados demonstram que o NITD-618 é um inibidor seletivo na DENV. Este composto pode interromper a formação do complexo NS3-NS4B e estudos em que mutações que levam a alterações de aminoácidos dentro da proteína NS4B, revelaram resistência ao NITD-618. Infelizmente, a elevada lipofilicidade de NITD-618 resultou em fragilidades nas propriedades farmacocinéticas que dificultam os testes de atividade contra DENV em ratinhos AG129. Infelizmente, as alterações para tentar reduzir a lipofilicidade resultaram numa perda de atividade ou numa redução na seletividade antiviral contra DENV.⁽³⁴¹⁾ Em estudos relacionados com flavivirose, outros grupos encontraram inibidores que têm como alvo a proteína NS4B, tendo sido identificadas duas classes de inibidores da proteína NS4B,⁽³⁴⁴⁾ os compostos CCG-3394 e CCG-4088 (tabela 1.9).

Tabela 1.9 – Inibidores da proteína NS4B do DENV (Adaptado de⁽³¹⁶⁾).

Composto	Mecanismo/Alvo	Serotipo	Atividade/Eficácia (EC ₅₀ ou IC ₅₀ /CC ₅₀) μM	Referências
NITD-618	NS4B	Todos	1.0/>40	(343)
CCG-3394	NS4B	DENV	1.48/31	(344)
CCG-4088	NS4B	DENV	0.4/13	(344)
Licorina	Péptido 2K	DENV-2	0.23/24	(345)

A licorina (tabela 1.9) foi relatada como capaz de reduzir os títulos virais do vírus do Nilo ocidental, do vírus da febre amarela e do vírus da dengue, principalmente através da supressão da replicação do ARN viral.⁽³⁴⁵⁾ Uma mudança de aminoácidos no péptido conferiu resistência à licorina, verificando-se aumento da replicação viral. Foi também observado que modificações estruturais envolvendo alterações dos dois grupos hidroxilo na licorina podem aumentar a potência do composto, com redução da sua citotoxicidade.⁽³⁴⁵⁾

1.8.2.3. Inibidores da protease e helicase NS3 do DENV

A NS3 tem atividade de protease serínica, sendo responsável pelo processamento proteolítico das poliproteínas após a tradução. Assim, esta protease foi estabelecida como um alvo ideal para o desenho de fármacos, uma vez que a inibição da enzima previne a replicação viral.⁽³⁴⁶⁾ As proteases virais têm sido alvos preferenciais para o desenho de compostos antivirais, como evidenciado pela disponibilidade clínica de dez inibidores da protease de HIV-1⁽³⁴⁷⁾ e de dois inibidores de protease de HCV.⁽³⁴⁸⁾ Assim, é plausível que um inibidor de protease para DENV possa vir a ter eficácia clínica. Contudo, a experiência com o HIV-1 e HCV indica que há certas desvantagens associadas com os inibidores da protease que são considerações importantes no desenvolvimento de um inibidor da protease para DENV. Por exemplo, no tratamento de infecções por HIV-1 e por HCV foi observada um rápido aparecimento de estirpes virais resistentes aos medicamentos baseados em inibidores de protease. Além disso, enquanto a maioria dos inibidores da protease do HIV-1 são ativos para as diferentes estirpes virais, os inibidores da protease de HCV (telaprevir e boceprevir) são ativos somente contra o genótipo 1 e as mutações na NS3 detetadas resultam em resistência aos dois inibidores da protease.⁽³⁴⁹⁾ As proteases dos quatro serotipos do DENV são muito semelhantes na especificidade do substrato,⁽³⁵⁰⁾ e também existem semelhanças nas sequências de aminoácidos das proteases de DENV e HCV. A primeira abordagem para inibidores de protease de DENV

foi semelhante à utilizada para inibidores de protease de HCV. Basearam-se na procura de péptidos miméticos pelo substrato e nenhum dos compostos avançou para além da fase pré-clínica. De entre os péptidos identificados como inibidores da protease (retro tripéptidos, péptido cíclico 9, tetrapéptido e o composto 32; tabela 1.10) o tetrapéptido revelou ser o inibidor mais potente. Porém, este inibidor não é adequado para administração oral e não é específico para a dengue. ⁽³⁵¹⁾

A segunda abordagem para identificar inibidores da protease teve como base um rastreio das bibliotecas de compostos de várias empresas e de grupos de investigadores. Foram identificados vários compostos com atividade *in vitro*: o composto 1, o composto 32, o composto 166347, o ARDP0006, a ivermectina, o cloreto de benzetónio, a tirotricina, a selamectina, o hidrocloreto de alexidina e ainda derivados da 8-hidroxiquinolona (tabela 1.10) Em geral, estes compostos inibem a protease do DENV-2 e alguns são também ativos no vírus do Nilo ocidental, apresentando inibição competitiva ou mista. Outros compostos foram também testados em rastreios de inibidores de protease para o vírus do Nilo ocidental (aminobenzamida, 23i, 7n, e 1; tabela 1.10). Yang e colaboradores identificaram um composto com grande atividade inibidora da protease de DENV (BP2109; tabela 1.10), Verificaram também que mutações na proteína levam a resistência ao BP2109, o que demonstra que a protease da DENV é um alvo antiviral do fármaco. ⁽³⁵²⁾

A porção C-terminal da proteína NS3 contém a atividade de helicase que é necessária para a separação do ARN do molde que é formado durante a replicação do genoma viral. Como na maioria das helicases, a energia para a separação de cadeias é obtida a partir da hidrólise de ATP no sítio ativo da ATPase, que está localizado nos domínios I e II. ^(353,354) Além disso, a parte C-terminal da NS3 também codifica uma ARN 5' trifosfatase (RTPase) cuja atividade é necessária para a desfosforilação da extremidade 5' do ARN genómico. ⁽³⁵⁵⁾ A presença destas atividades enzimáticas na helicase NS3 valida a NS3 como alvo para o desenvolvimento de fármacos.

Recentemente, foi identificada a Ivermectina (tabela 1.10) como agente com capacidade para inibir a separação da dupla cadeia de ARN em cadeias de ARN simples. Esta capacidade de inibição da helicase foi observada no vírus do Nilo ocidental, no vírus da febre amarela e no vírus da dengue.

Tabela 1.10 – Inibidores da protease e helicase NS3 do DENV (Adaptado de ^(31,316))

Composto	Mecanismo/Alvo	Serotipo	Atividade/Eficácia (EC ₅₀ ou IC ₅₀ /CC ₅₀) μM	Referências
Inibidores da protease				
Retro tripéptidos	Inibição mista	DENV-2	N.D.	(356)
Péptido cíclico 9	Protease	DENV-2	N.D.	(357)
Tetrapéptido	Inibição competitiva	DENV-2	N.D.	(351)
Composto 32	Protease	DENV-2	<10/>100	(358)
Composto 1	Inibição competitiva	DENV-2	N.D.	(359)
166347	Inibição competitiva	DENV-2	N.D.	(360)
8-hidroxiquinolona (A e B)	Inibição mista	DENV-2	Ki : 28,6 e 30,2 μM	(361)
ARDP0006 (1,8- dihidroxi-4,5-nitro- 9,10 -antraquinona	Inibição competitiva	DENV-2	4.2/69	(362,363)
Ivermectina	Inibição mista	DENV-2	N.D.	(364)
Cloreto de benzetonio	Inibição mista	DENV-2	N.D.	(364)
Tirotricina	Inibição competitiva	DENV-2	N.D.	(364)
Selamectina	Inibição mista	DENV-2	N.D.	(364)
Hidrocloreto de alexidina	Inibição mista	DENV-2	N.D.	(364)
Aminobenzamida	Protease	DENV-2	24.7/>100	(365)
Composto 23i	Protease	DENV-2	N.D.	(366)
Composto 7n	Protease	DENV-2	N.D.	(367)
Composto 1	Protease	DENV-2	N.D.	(368)
BP2109	Protease	Todos	0.17/29.28	(352)
Inibidores da helicase				
Ivermectina	Helicase	DENV-2	0.7/3.8	(369)
ST-610 (Benzoxazol)	Helicase	Todos	0.272/>100	(370)

No entanto, a Ivermectina não inibiu a atividade de ATPase da NS3. A Ivermectina é um fármaco aprovado com atividade anti-helmíntica, sendo amplamente utilizado. Porém, ainda está por determinar a sua eficácia *in vivo* para o tratamento da dengue. Outro composto inibidor da atividade da helicase de NS3, o ST-610 (tabela 1.10), foi recentemente descrito como um potente inibidor dos quatro serotipos do DENV em cultura celular. Também foi referido que a alteração de um único aminoácido no domínio da helicase confere a resistência ao composto e que o ST-610 inibe a atividade da helicase do DENV mas não inibe a sua atividade ATPase e eficácia marginal na DENV quando

usado o modelo animal rato AG-129.⁽³⁷⁰⁾ Contudo ainda faltam desenvolverem-se estudos que comprovem as propriedades farmacocinéticas deste composto *in vivo*.

1.8.2.4. Inibidores da Metiltransferase (Mtase) e da ARN-polimerase ARN-dependente (RdRp) NS5 do DENV

O domínio N-terminal da proteína NS5 dos flavivirus funciona como uma dupla metiltransferase (MTase). Esta pode metilar a extremidade 5' do ARN genômico viral na posição N-7 da guanina (N-7 MTase) e a posição 2'-OH da ribose do primeiro nucleótido (2'-O MTase).^(370,371) Pode ainda metilar adenosinas internas do genoma ARN viral e, potencialmente, metilar a ribose na posição 2'-OH (metilação interna) no ARN do hospedeiro.⁽³⁷²⁾ Estes processos de metilação usam a S-adenosina-L-metionina como dador do grupo metilo para gerar a S-adenosina-L-homocisteína como sub-produto, existindo um único local de ligação para a S-adenosina-L-metionina.⁽³⁷³⁾ Estudos funcionais mostraram que as metilações N-7 e 2'-OH do ARN são essenciais para a tradução e replicação do vírus DENV.^(371,374) Mutações na MTase que impedem a metilação N-7 são letais para replicação de flavivírus,⁽³⁷⁵⁾ sugerindo que a MTase é um potencial alvo antiviral.

Os compostos que mostrarem capacidade para inibirem a MTase de NS5 de DENV (tabela 1.11) são na sua maioria análogos da S-adenosina-L-metionina. Especificamente, o composto 10 (tabela 1.11) com um grupo químico adicional, interage seletivamente com os flavivirus inibindo as MTases, sendo um dos mais potentes inibidores na DENV.

A ARN-polimerase ARN-dependente (RdRp) NS5 é a proteína mais conservada dos flavivirus e é essencial para a síntese do ARN viral. A similaridade estrutural entre a RdRp de dengue e a RdRp do HCV sugere que esta proteína seja considerada como alvo no desenho de inibidores alostéricos que se liguem aos poços hidrofóbicos da polimerase.⁽³⁷³⁾ Os inibidores desta polimerase viral podem ser classificados em duas grandes categorias: inibidores nucleosídicos (IN) e inibidores não nucleosídicos (INN).

Os IN representam a maior classe de antivirais aprovados em uso clínico, havendo claros benefícios terapêuticos com esta classe de inibidores no tratamento de doenças virais, tais como HIV-1,⁽³⁷⁶⁾ e infeção pelo HBV.⁽³⁷⁷⁾ Embora conceptualmente fácil, existem vários desafios-chave no desenvolvimento de IN para terapêutica. Em primeiro

lugar, muitas vezes é impossível prever/interpretar a relação estrutura/atividade dos compostos, e por vezes são necessários alguns passos enzimáticos para convertê-los em trifosfatases ativas. ⁽³⁷⁸⁾ Em segundo lugar, a toxicidade dos análogos de nucleósidos é imprevisível e muitas vezes não é observada *in vitro*. Assim, são necessários estudos toxicológicos em animais para avaliar o potencial efeito colateral desta classe de compostos. Entre os IN da RdRp avaliados que apresentam atividade inibidora da RdRp do vírus da dengue (tabela 1.11) sobressai o NITD-008, um análogo de adenosina que inibe potentemente a replicação do DENV. ^(379,380)

O NITV-008 mostrou ser eficaz em modelo animal de ratos AG-129. Nenhum efeito adverso foi observado quando os ratos foram testados durante 1 semana com NITD-008 a 50 mg/kg/dia. Contudo, após 2 semanas de administração oral foram observados graves efeitos secundários em ratos e cães. Estes efeitos, especialmente a toxicidade renal, levaram a considerar inaceitável o NITD-008 para mais estudos para o tratamento DENV. ⁽³⁸¹⁾

O Balapiravir (tabela 1.11) é um éster (tri-isobutirato de 4'-azidocitidina) que foi originalmente desenvolvido para o tratamento do HCV. O seu desenvolvimento para HCV foi interrompido devido a efeitos hematológicos adversos em pacientes após o tratamento prolongado. ⁽³⁸²⁾ Este composto foi proposto para um ensaio clínico de fase II para DENV, ⁽³⁸³⁾ contudo o Balapiravir, que apresenta atividade *in vitro* contra DENV, não melhorou o estado clínico e os parâmetros virológicos nos pacientes, incluindo os níveis virais no sangue, ou a duração da febre. Assim, não existe ainda um IN seguro e específico para a dengue.

Tabela 1.11 – Inibidores da Metiltransferase (Mtase) e da ARN-polimerase ARN-dependente (RdRp) da NS5 do DENV (Adaptado de ^(31,316)).

Composto	Mecanismo/Alvo	Serotipo	Atividade/Eficácia (EC ₅₀ ou IC ₅₀ /CC ₅₀) μM	Referências
Inibidores MTase NS5				
Composto 7	Mtase	DENV	60,5	⁽³⁸⁴⁾
Ácido aurintricarboxílico (ATA)	Mtase	DENV-2	2,3	⁽³⁸⁵⁾
NSC140047	Mtase	DENV-2	8,78	⁽³⁸⁶⁾
S-adenosil-homocisteína	Mtase	DENV-2	0,34	⁽³⁸⁷⁾

Composto 10 (derivado da S-adenosil-homocisteína)	Mtase	DENV-3	0,63	(388)
Inibidores nucleosídicos de RdRp NS5				
NIDT-008	Inibidor nucleósido de adenosina	Todos	0.64/>100 Eficaz em modelo animal (rato AG129)	(380,381)
β -D-2'-etnil-7-deaza-trifosfato de adenosina	Inibidor nucleósido de adenosina	Todos	0,31-1,06	(389)
1- β -D-ribofuranosil-3-etnil-[1,2,4]triazol (ETAR)	Inibidor nucleósido	DENV-1, DENV-2 e DENV-3	N.D.	(390)
Análogo de 7-deaza-6-metil-9- β -D-ribofuranosilpurina	Inibidor nucleósido	DENV-2	0,062	(391)
Balapiravir	Inibidor nucleósido de citidina		1,9/N.D.	(383)
Inibidores não nucleosídicos de RdRp NS5				
NITD-2 (derivado do ácido N-sulfonilantranílico)	Inibidor não nucleósido	DENV-2	0,7-5	(392,393)
Brequinar (Sal de sódio do ácido 4-quinolino carboxílico)	Inibidor não nucleósido	DENV-2	0,078	(394)
NITD-107	Inibidor não nucleósido	DENV-2	N.D.	(395)

Os inibidores não nucleosídicos da polimerase são tipicamente inibidores não competitivos. Atuam em poços específicos da polimerase e bloqueiam mudanças conformacionais que são necessárias para a iniciação e/ou continuação da atividade da RdRp. Embora haja muitos bons exemplos de INN's tendo como alvo a transcriptase reversa do HIV-1 em uso clínico, ⁽³⁹⁶⁾ ainda não há INN's aprovados pela FDA disponíveis para outras polimerases virais. Numerosos candidatos a fármacos INN de RdRp de HCV ⁽³⁹⁷⁾ foram testados em ensaios clínicos, como por exemplo o Tegobuvir ou Filibuvir mas os resultados têm sido decepcionantes, pois não apresentam eficácia em monoterapia. ⁽³⁹⁸⁾ Outros compostos, tais como Setrobuvir, BI207127 e VX-222, estão atualmente em ensaios de fase II para HCV. Há várias desvantagens potenciais para a

utilização de INN na terapia viral. Em primeiro lugar, a proteína alvo de fármacos deve ser bem conservada para o composto atuar amplamente em diferentes serotipos ou genótipos. Em segundo lugar, o vírus pode gerar mutações de aminoácidos nas proximidades do local de ligação dos INN para superar a sua ação inibitória. No lado das vantagens, a alta especificidade dos INN pode traduzir-se em menores efeitos e potencialmente menor citotoxicidade. A procura de INN para a RdRp de DENV levou à identificação dos compostos NITD-2, NITD-107 e Brequinar (tabela 1.11). O NITD-2 liga-se ao ARN da RdRp, e provavelmente inibe as suas funções, bloqueando a síntese de ARN. ⁽³⁹³⁾ O NITD-107 liga-se ao sítio ativo da RdRp da DENV, inibindo a enzima. ⁽³⁹⁵⁾

1.8.2.5. Inibidores de alvos no hospedeiro envolvidos no ciclo de vida do DENV

Uma outra via de investigação levou à pesquisa de inibidores de alvos no hospedeiro envolvidos no ciclo de vida do DENV para neutralizar a infecção viral. Os estudos indicam que algumas proteínas do hospedeiro podem ser inibidas com redução da atividade viral em diferentes famílias de vírus. ⁽³⁹⁹⁾ Assim, várias proteínas do hospedeiro têm mostrado ser importantes para a replicação do DENV constituindo vias para o aparecimento de diferentes tipos de inibidores.

Têm sido identificados diversos tipos de compostos com atividade em alvos diferentes no hospedeiro. Foi identificada uma classe de inibidores de tradução virais, derivados do benzomorfolano, como inibidores de DENV. ⁽⁴⁰⁰⁾ O primeiro composto identificado, NITD-2636 exibiu um amplo espectro de atividade antiviral, reduzindo o conteúdo viral de DENV e também o conteúdo viral de outras flaviviruses, incluindo as provocadas pelo vírus da febre amarela e pelo vírus do Nilo ocidental. A substituição do grupo fenol, que é metabolicamente lábil, por um grupo nitrilo conduziu ao composto NITD-451 (tabela 1.12) que manteve atividade antiviral e apresenta maior estabilidade.

O mecanismo de ação do NITD-451 (tabela 1.12) foi elucidado usando um sistema de replicação da DENV, avaliando a supressão da atividade luciferase de DENV, o que indica o seu papel inibitório na tradução do ARN. Como o vírus necessita de fatores do hospedeiro para traduzir o seu genoma, o NITD-451 tem como alvo um fator do hospedeiro envolvido na tradução. Porém, a identidade deste fator ainda não foi determinada. No entanto a interação entre o composto e o seu alvo é específica, uma vez que apenas o enantiómero S,R,S NITD-451 é ativo e inibe a replicação e tradução do ARN do DENV, enquanto o enantiómero R,S,R NITD-451 se revelou inativo. Em estudos

in vivo, em ratos AG-129, o NITD-451 também se mostrou eficaz na redução da virémia.
(400)

Tabela 1.12 – Inibidores de alvos no hospedeiro envolvidos no ciclo de vida do DENV (Adaptado de ^(31,316)).

Composto	Mecanismo/Alvo	Serotipo	Atividade/Eficácia (EC ₅₀ ou IC ₅₀ /CC ₅₀) μM	Referências
Derivados do iminociclitol	Inibidor da α-glucosidade	DENV-2	4,7-11,8	(401)
Ácido micofenólico	Inibidor da inosina monofostato desidrogenase	DENV-2	0,4	(402)
Desatinib e Saracatinib (AZD0530)	Inibidor da proteína quinase c-Src	DENV-2	N.D.	(403)
N-nonil-desoxinojirimicina	Inibidor da α-glucosidade	DENV-2	N.D. Eficaz em modelo animal (rato AG129)	(404)
Derivados de imino açúcares PDBNJ0801, PDBNJ0803, PDBNJ0804	Inibidor da α-glucosidade	DENV-2	1,0-3,0	(405)
Composto 1 (Baseado no uracilo)	Inibidor da inosina monofostato desidrogenase	DENV-2	EC ₅₀ : 5,7 μg/mL	(406)
Derivados de imino açúcares alquiloxygenados CM-9-78 e CM-10-18	Inibidor da α-glucosidade	DENV-2	0,42-1,55	(405,407)
NITD-451	Inibidor da tradução	DENV	0.16/57 Eficaz em modelo animal (rato AG129)	(400)
NITD-982	Inibidor da síntese da pirimidina. Inibidor da dihidroorotato desidrogenase	DENV	0.0024/>5	(408)
Celgosivir (6-O-butanoilcastanospermina)	Inibidor da α-glucosidade	Todos	0.22/>100 Eficaz em modelo animal (rato AG129)	(296,404,409)

U18666A	Inibidor do transporte de colesterol	DENV-2	2,9-6,2	(410)
Ácido nordihidroguaiarético	Inibidor da síntese do colesterol	DENV-4	N.D.	(411)

De outra classe de compostos, conjugados de isoxazol-pirazol, foi selecionado o composto NITD-982 (tabela 1.12), que revelou capacidade como inibidor da biossíntese de pirimidina. ⁽⁴⁰⁸⁾ A proteína dihidroorotato desidrogenase (DHODH), uma proteína mitocondrial que catalisa a oxidação de dihidroorotato para orotato, a quarta etapa enzimática da biossíntese da pirimidina, foi identificada como alvo do composto. O efeito inibitório do composto NITD-982 conduz a supressão da síntese do ARN viral.

O transporte e biossíntese de colesterol foram implicados na replicação do vírus de várias flaviviruses, incluindo a DENV. A diminuição dos níveis de colesterol, lipoproteínas e triglicerídeos no plasma estão associados com a gravidade da dengue. ^(412,413) Verificou-se que a infecção por DENV é atenuada quando é interrompida a entrada de colesterol na célula, usando um inibidor do transporte de colesterol, o U18666A (tabela 1.12). ⁽⁴¹⁰⁾ Um estudo recente refere que o ácido nordihidroguaiarético (tabela 1.12), um inibidor da síntese de colesterol, inibe a replicação viral em DENV-4. ⁽⁴¹¹⁾

Uma outra classe de compostos capazes de inibir a dengue tem como alvo a α -glucosidase I celular. As α -glucosidase são as enzimas responsáveis pela correta biossíntese de oligossacarídeos ligados à asparagina, ⁽⁴¹⁴⁾ sendo também cruciais nos mecanismos de enrolamento das proteínas. ⁽⁴¹⁵⁾ Os inibidores desta enzima diminuem a infectividade do vírus da dengue por perturbação das vias de enrolamento das proteínas prM e E. ⁽²⁹⁶⁾ Como inibidores de α -glucosidase no hospedeiro são conhecidos análogos de iminoaçúcares (tabela 1.12). Contudo, o inibidor mais eficaz identificado foi o Celgosivir (butil-castanospermina; tabela 1.12) que é um pró-fármaco, com biodisponibilidade oral, do produto natural castanospermina, que inibe a α -glucosidase I. Esta enzima desempenha um papel crítico na maturação viral, iniciando o processamento de oligossacarídeos e glicoproteínas do envelope. O Celgosivir atua em todos os serotipos de DENV e mostrou ser eficaz em testes *in vivo*, usando o modelo de ratos AG129, obtendo-se resultados promissores relativamente à sua farmacocinética, nomeadamente a absorção, distribuição e excreção. ⁽⁴⁰⁴⁾ Com base nesses resultados encorajadores, o Celgosivir integrou um ensaio clínico de fase II para avaliar a atividade, a farmacocinética, segurança e tolerabilidade em pacientes com dengue. O Celgosivir foi

testado em ensaios clínicos em combinação com Interferão e Ribavirina, usada para o tratamento de infecção por HCV. Os ensaios não continuaram, porque o efeito do Celgosivir não foi melhor do que observado com o regime dos medicamentos padrão. ⁽⁴¹⁶⁾

Também foi levantada a hipótese de a família das quinases Src ter um papel importante na replicação do vírus da dengue, uma vez que se demonstrou que o Dasatinib e AZD0530 (tabela 1.12) inibem o encapsulamento da partícula viral devido à inibição da sub-família de proteína quinases c-Rcr, que são cruciais para a saída do vírus da dengue do lúmen do retículo endoplasmático.

Além disso foram testados fármacos que inibem outra enzima, a inosina monofosfato desidrogenase. Esta enzima é crucial na biossíntese de nucleotídeos de purina, pois participa numa etapa limitante na síntese de nucleotídeos de guanina a partir de inosina 5'-monofosfato. Foram identificados com atividade antiviral em DENV-2, o composto 1 e o ácido micofenólico (tabela 1.12), um fármaco aprovado como imunossupressor utilizado em transplantados.

1.8.2.6. Outros alvos de inibidores

Recentemente surgiram estudos que apontam para a relevância do complexo NS2B-NS3 da dengue na replicação do vírus, relativamente à sua atividade proteolítica, tornando-o num alvo para o desenho de inibidores. Estes estudos incidiram sobre fármacos aprovados para uso clínico, nomeadamente o ácido mefenâmico e alguns derivados (ácido tolfenâmico, ácido flufenâmico e ácido meclofenâmico), os fármacos anti-inflamatórios não esteróides com propriedades analgésicas e ainda antibióticos como a tetraciclina e derivados (doxiciclina, oxitetraciclina e rolitetraciclina). Entre os compostos estudados, o ácido mefenâmico e a doxiciclina foram os que mostraram maior potencial na inibição do complexo protease NS2B-NS3 de DENV2, apresentando valores de K_i $32 \pm 2 \mu\text{M}$ e $55 \pm 5 \mu\text{M}$, respetivamente, e sendo ambos inibidores não competitivos. As concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) foram avaliadas para o ácido mefenâmico ($150 \pm 5 \mu\text{M}$) e doxiciclina ($125 \pm 4 \mu\text{M}$). Também se verificou uma redução significativa da carga viral após a aplicação de ácido mefenâmico e doxiciclina, para valores de EC_{50} de $32 \pm 4 \mu\text{M}$ e $40 \pm 3 \mu\text{M}$. O ácido mefenâmico mostrou maior seletividade contra a replicação do vírus do dengue *in vitro*, em comparação com a doxiciclina. ⁽⁴¹⁷⁾ Estes resultados sublinham a necessidade de mais experiências e estudos clínicos sobre estes

fármacos utilizando as suas atividades anti-dengue e anti-inflamatória para atenuar os sintomas clínicos da infecção por dengue.

Outro estudo cujo alvo é o complexo protease NS2B-NS3 de DENV-2 conduziu a uma nova geração de péptidos inibidores de protease de dengue híbridos que incorporam heterociclos (5-*arilideno-tiazolidina-2,4*-diona) N-substituídos (rodaminas e tiazolidinodionas). Os compostos foram extensivamente caracterizados relativamente à eficácia na inibição de várias proteases, mecanismos de inibição, a permeabilidade da membrana, atividade antiviral e citotoxicidade em cultura de células. Os resultados revelam que a troca de enxofre/oxigênio na posição 2 do heterociclo tem um efeito significativo sobre essas propriedades e atividades. O resultado mais promissor *in vitro* foi observado para híbridos peptídicos-tiazolidinadiona contendo grupos hidrofóbicos com valores de K_i entre 1,5 e 1,8 μM e mecanismos de inibição competitiva. Os híbridos peptídicos de rodamina com substituintes hidrófobos têm, em correlação com a sua permeabilidade na membrana, uma atividade antiviral mais pronunciada em cultura de células do que as tiazolidinodionas. ⁽⁴¹⁸⁾

Tendo ainda como alvo o complexo NS2B-NS3 de DENV2 foi revelado recentemente que a amodiaquina, um fármaco da família das 4-aminoquinolinas usado para o tratamento da malária, inibe a DENV-2 com EC_{50} de $1,08 \pm 0,09 \mu\text{M}$ e CC_{50} de $52,09 \pm 4,25 \mu\text{M}$, resultados que suportam a amodiaquina como um candidato promissor para a terapia anti-flaviviral. ⁽⁴¹⁹⁾

1.8.3. Fármacos em ensaios clínicos na dengue

Das diferentes drogas para DENV em desenvolvimento experimental muito poucas avançaram para ensaios clínicos. Muitas moléculas inicialmente promissoras não conseguiram progredir mais devido ao perfil insatisfatório, com base em várias características físico-químicas e outras, incluindo as propriedades de permeabilidade celular, a citotoxicidade, a estabilidade no plasma ou a sua biodisponibilidade por via oral e de outros fatores que também condicionam a eficácia pré-clínica.

Dado o custo e o tempo necessários para os estudos completos para novos compostos, os programas de desenvolvimento de fármacos cada vez mais atende ao reposicionamento de medicamentos antigos para novas indicações, como estratégia para melhorar a relação custo-eficácia. Essa estratégia tem sido seguida no desenvolvimento de medicamentos para a dengue e os compostos que foram objeto de ensaios clínicos são

fármacos usados noutras doenças ou fármacos reaproveitados que falharam em desenvolvimento para outras doenças. Deste modo, aproveitaram-se muitos recursos no desenvolvimento de fármacos para HCV, um vírus que pertence à família de vírus *Flaviviridae* como o vírus da dengue.

Os fármacos em ensaios clínicos estão em vários estádios. Alguns encontram-se na fase inicial de planeamento, outros já têm os ensaios concluídos (tabela 1.13). Relativamente aos ensaios clínicos relacionados com fármacos que foram objeto de estudo para HCV estão em ensaios o Balapiravir, o Celgosivir e a Ribavirina (tabela 1.13).

O Balapiravir é um pró-fármaco de um análogo nucleósido (4'-azidocitidina) denominado R1479 e foi desenvolvido pela Hoffmann-La Roche, para o tratamento da hepatite C crónica, infeção provocada pelo vírus (HCV).^(420,421) No entanto, o desenvolvimento clínico do Balapiravir para a infeção pelo HCV foi interrompido quando alguns problemas de toxicidade hematológica foram detetados em pacientes recebendo tratamento prolongado (2-3 meses). Considerando que o HCV e o DENV possuem RdRp semelhantes,⁽⁴²²⁾ e após testada a atividade *in vitro* contra DENV, foi realizado um ensaio clínico de Balapiravir, em pacientes com dengue para avaliar a segurança, tolerabilidade e eficácia. Os resultados, avaliados em termos de duração de febre, os títulos séricos de virémia e antigénio NS1, não mostraram diferença significativa entre os grupos tratados com Balapiravir e com o placebo.⁽³⁸³⁾

Tabela 1.13 – Ensaios clínicos de fármacos com atividade anti dengue (Adaptada de⁽⁴²³⁾).

Identificador do ensaio	Fármaco	Responsável pelo ensaio	Fase	Local do ensaio	Estado atual (Fim)
NCT02045069	Ivermectina	Mahidol University	II/III	Tailândia	No início
NCT02061358	UV-4B	Unither Virology	I	Não divulgado	No início
NCT01973855	Ribavirina	Guangzhou 8th People's Hospital	II	China	A decorrer (Dezembro 2015)
ISRCTN03147572	Lovastatina	Oxford University Clinical Research Unit & Wellcome Trust	I	Vietname	Finalizado (Janeiro 2015)
NCT00849602	Cloroquina	University of Sao Paulo	I/II	Brasil	Finalizado (Junho 2009)
ISRCTN38002730	Cloroquina	Oxford University Clinical Research Unit & Wellcome Trust	I	Vietname	Finalizado (Julho 2008)

ISRCTN3957523	Prednisolona	Oxford University Clinical Research Unit & Wellcome Trust	I	Vietname	Finalizado (Janeiro 2011)
NCT02016027	Extrato de Carica folia	Fr. Muller Homeopathic Medical College	I	Índia	Finalizado (Dezembro 2013)
NCT01096576	Balapiravir	Hoffmann-La Roche	I	Vietname	Finalizado (Abril 2011)
NCT01619969	Celgosivir	Singapore Gen Hospital e Duke-NUS Graduate Med School	I/II	Singapura	Finalizado (Julho 2013)

Relativamente ao Celgosivir, um conhecido inibidor da α -glucosidase que não mostrou eficácia terapêutica contra o HCV, também foi testado recentemente, em pacientes com dengue, estando os ensaios clínicos em fase II. ⁽⁴²⁴⁾ No entanto, o Celgosivir não mostrou benefícios terapêuticos estatisticamente significativos para pacientes com dengue. ⁽⁴²⁴⁾ Atualmente está em curso um ensaio clínico de Fase II com a Ribavirina, fármaco já aprovado para tratamento da hepatite C crônica em conjunto com o interferão α 2b.

A Oxford University Clinical Research Unit & Wellcome Trust realizou ensaios clínicos no Vietname com fármacos utilizados noutras patologias (tabela 1.13) nomeadamente com a Cloroquina, um fármaco aprovado para tratamento da malária e que também já foi referido como inibidor da replicação do serotipo DENV-2 com a Prednisolona, um fármaco do grupo terapêutico dos glucocorticóides e com a Lovastatina, um fármaco antidislipémico indicado para redução do nível de colesterol no sangue.

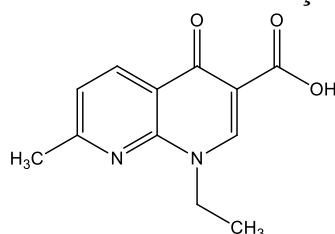
O ensaio com Cloroquina revelou que o fármaco não reduziu a duração da viremia de dengue em pacientes, estando associado a significativos efeitos adversos observados. ⁽⁴²⁵⁾ Por outro lado, a Prednisolona, que foi testada para proporcionar benefício esperado através da sua ação anti-inflamatória na redução da incidência das complicações mais severas da febre da dengue, apesar de não ocorrerem os acontecimentos adversos significativos, também não se verificou efeito terapêutico comparando com o grupo tratado com placebo. ⁽⁴²⁶⁾ Finalmente estão em início ensaios clínicos para Invermectina, um fármaco anti-helmíntico que já foi referenciado como inibidor da protease e helicase NS3 do DENV com base em ensaios *in vitro*.

Capítulo 2

2. Quinolonas em química medicinal

2.1 Introdução

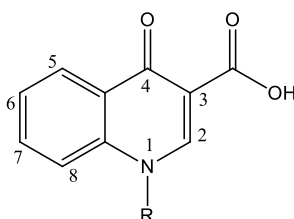
O primeiro derivado quinolínico foi descoberto em 1962 por George Lesher, resultante do isolamento de um produto secundário da síntese de um composto antimalárico, a cloroquina. Este composto mostrou atividade antibacteriana, e foi subsequentemente modificado para produzir ácido nalidíxico (figura 2.1), uma quinolona de primeira geração que apresentava atividade contra as bactérias aeróbias gram-negativas, mas pouca atividade contra bactérias aeróbias ou anaeróbias gram-positivas. O uso do ácido nalidíxico, fora inicialmente limitado devido ao seu estreito espectro de ação, apresentação de níveis séricos baixos e problemas de toxicidade. No entanto, na década de 1980 foi utilizado no tratamento da diarreia e infecções do trato urinário. ^(428,429,430,431)



Ácido nalidíxico

Figura 2.1 – Representação da estrutura molecular do ácido nalidíxico.

Através de estudos de relações estrutura-atividade partindo de bibliotecas de análogos do ácido nalidíxico com variabilidade estrutural, constatou-se que a evolução terapêutica das quinolonas se devia a modificações no núcleo quinolínico (figura 2.2) através da adição de diferentes grupos substituintes selecionados especificamente para posições chave do núcleo, nomeadamente nas posições N-1, C-6, C-7 e C-8. Estas modificações conduziram a uma otimização do espectro de atividade intrínseca e das propriedades farmacocinéticas e metabólicas das quinolonas, reduzindo a toxicidade e as interações medicamentosas, com o conseqüente alargar do espectro de ação para o tratamento de várias infeções. ^(428,429,432,433,434,435,436)



R=H, alquilo, arilo

Figura 2.2 – Representação da estrutura básica molecular de derivados de ácido 1,4-diidro-4-oxoquinolina carboxílico.

A gatifloxacina, representada na figura 2.4, apresenta um grupo metoxi na posição C-8, responsável por inibir o desenvolvimento de resistência às quinolonas. Os alvos específicos são as topoisomerases II e IV. ^(435,436)

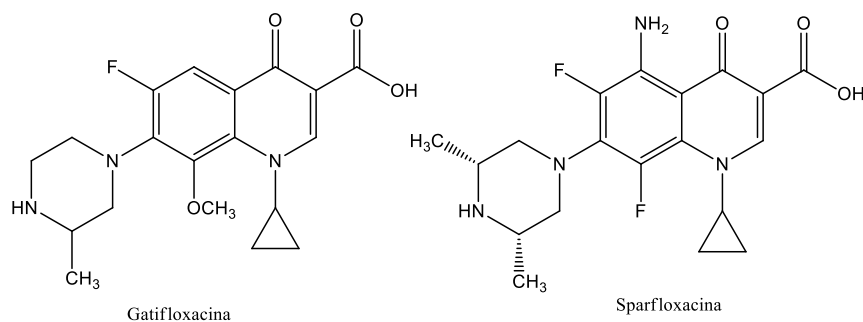


Figura 2.4 – Representação das estruturas moleculares de gatifloxacina e sparfloxacina (quinolonas de terceira geração).

A garenoxacina (figura 2.5), primeira quinolona representativa de quarta geração, mantém um substituinte ciclopropílico em N-1 e, pela remoção do átomo de flúor de C-6, diminuiu-se o risco de genotoxicidade e de efeitos adversos no sistema nervoso central (SNC). ^(428,439)

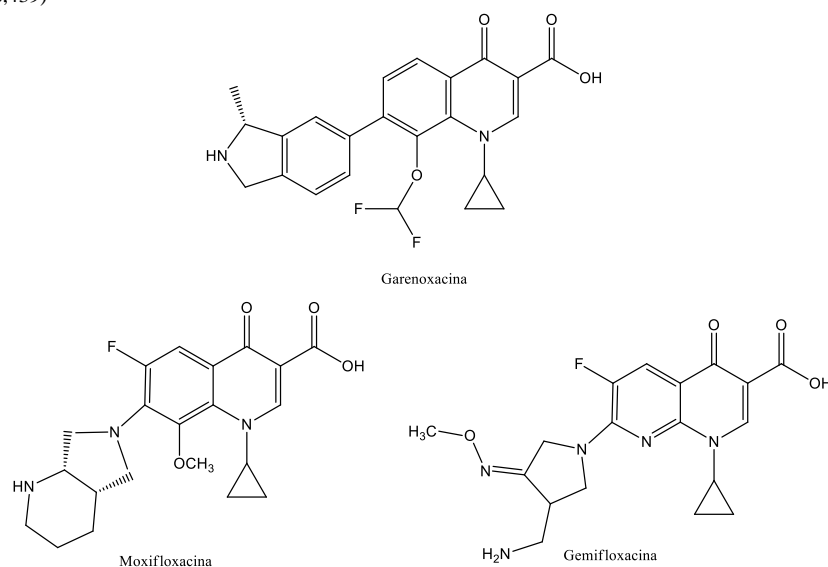


Figura 2.5 – Representação das estruturas moleculares de garenoxacina, moxifloxacina e gemifloxacina (quinolonas de quarta geração).

A moxifloxacina e gemifloxacina, representadas na figura 2.5, são também quinolonas de quarta geração. São menos suscetíveis a mecanismos de efluxo por parte das bactérias já que possuem na posição C-7 uma cadeia lateral volumosa de piperazina e pirrolidina, respectivamente. ^(431,440)

A moxifloxacina está aprovada para o tratamento de infecções intra-abdominais, incluindo infecções polimicrobianas e abscessos, infecções do trato respiratório, como pneumonias causadas por estirpes resistentes de *Staphylococcus pneumoniae*, e infecções

da pele causadas por bactérias gram positivas. A gemifloxacina apresenta indicações terapêuticas apenas para infecções respiratórias, como por exemplo bronquite crônica e pneumonias causadas por estirpes multirresistentes de *S. pneumoniae*.⁽⁴³¹⁾

As quinolonas apresentam um espectro de atividade que abrange bactérias gram positivas e gram negativas, incluindo estafilococos resistentes à metilina e *Pseudomonas aeruginosa*. Podem ser administradas por via oral e demonstram uma excelente biodisponibilidade, boa difusão nos tecidos e fluidos do corpo e um perfil de segurança bastante favorável, daí a aplicação para o tratamento de doenças bacterianas hospitalares e comunitárias. Por apresentarem um largo espectro de atividade e potência terapêutica elevada, também são usadas como fármacos de segunda linha no tratamento da Tuberculose.⁽⁴²⁹⁾

As quinolonas atuam através da inibição da topoisomerase tipo IV, em bactérias gram positivas, e por inibição da atividade de uma enzima topoisomerase II (ADN girase) em bactérias gram-negativas.^(437,441)

A atividade das quinolonas resulta principalmente da formação de complexos ternários entre o ADN e as topoisomerasas do tipo II, estabilizando o complexo ADN-enzima, e assim provocando um bloqueio da progressão da maquinaria de replicação, inibindo diretamente a síntese de ADN, criando lesões no ADN e induzindo a apoptose bacteriana.^(428,429)

2.2. Quinolonas e atividade antiviral

Recentes estudos relatam casos de quinolonas que exibem atividades antimalárica, tuberculostática, anti-tumoral, anti-isquêmica e ansiolítica.^(420,429)

A versatilidade da molécula de quinolona, levou à descoberta de vários agentes bioativos que exibem atividades antivirais, especificamente como anti-VIH-1, anti-HCV, anti-WNV, anti-DENV e anti-herpes.^[8] Dados previamente relatados relativos à ligação com o cromossoma bacteriano reforçaram a hipótese de que as quinolonas também poderiam interferir com o ácido nucleico viral.^(361,368,420,429,442,443,444,445,446)

Entre estes estudos, destaca-se um estudo com doze fluoroquinolonas (incluindo a norfloxacina) em que se apresenta evidência de atividade inibitória da helicase NS3 do HCV, levando à inibição da replicação do ARN viral do HCV *in vitro* (observada com dois modelos diferentes de culturas de células).⁽⁴⁴²⁾

Um outro estudo mostrou que alguns derivados quinolínicos se ligam ao centro alostérico de inibidores não nucleósidos para a polimerase NS5B, inibindo a replicação do HCV, destacando-se o composto 16 pelo seu elevado potencial inibidor (figura 2.6).

(446)

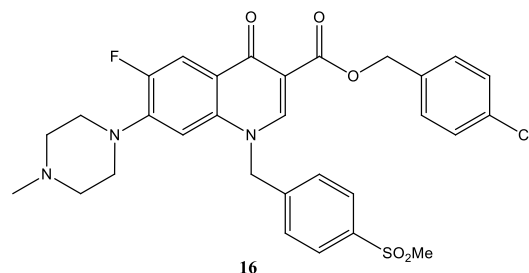


Figura 2.6 – Representação da estrutura molecular do composto 16, inibidores não nucleósídicos para a polimerase NS5B de HCV. (446)

Outro estudo selecionou compostos derivados de uma estrutura base que contém o núcleo 8-hidroquinolina. Foi demonstrado que os compostos apresentam atividade antiviral por inibição da protease WNV (NS2B-NS3). Testes *in vitro* com um substrato tetrapéptido (substrato da protease DENV-2) mostraram que o 8-hidroquinolina-aminobenzotiazole (composto 1) (figura 2.7) é inibidor competitivo da protease NS2B-NS3 da DENV-2 (com um IC_{50} de $0.91 \pm 0.05 \mu M$). (368)

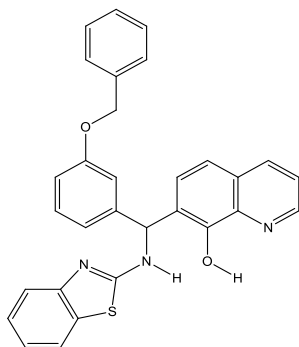


Figura 2.7 – Representação da estrutura molecular de 8-hidroquinolina-aminobenzotiazole (composto 1), um inibidor competitivo da protease NS2B-NS3 da DENV-2. (368)

Outro estudo selecionou dois compostos, pertencentes à família das 8-hidroxiquinolinas (figura 2.8) que foram identificados como potentes inibidores da protease de WNV, mas que mostraram menor capacidade inibidora da protease de DENV-2. (361)

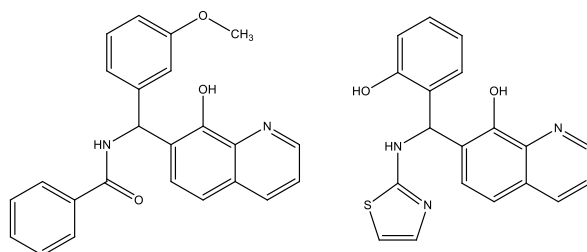


Figura 2.8 – Representação das estruturas moleculares de duas 8-hidroxiquinolinas inibidoras da protease de WNV.

Em estudos realizados recentemente, alguns derivados de 4-aminoquinolina, como a amodiaquina e cloroquina (figura 2.9), conhecidos fármacos antimaláricos, exibiram atividade antiviral *in vitro*, inibindo a protéase NS2B-NS3 de flavivirus (DENV 2 e WNV) e a consequente inibição da replicação. ⁽⁴²⁰⁾

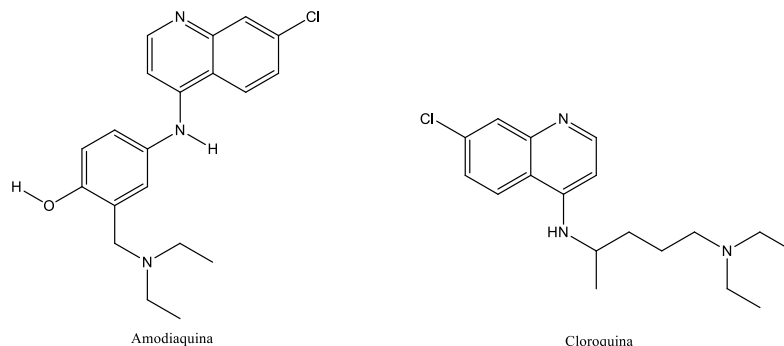


Figura 2.9 – Representação das estruturas moleculares da amodiaquina e cloroquina, inibidores da protéase NS2B-NS3 de flavivirus (DENV 2 e WNV).

2.3. Objetivo do trabalho laboratorial

Dada a existência de evidências de atividade anti-viral de compostos quinolínicos em vírus da família *Flaviviridae*, como por exemplo o vírus da hepatite C (HCV) e o vírus do Nilo ocidental (WNV), que apresentam genomas semelhantes ao vírus da dengue, e considerando o elevado grau de homologia entre as proteínas estruturais e não estruturais dos mesmos, com este trabalho pretende-se sintetizar laboratorialmente dois derivados quinolínicos com potencial interesse para estudos na terapia da dengue.

2.4. Discussão

Com o intuito de perspetivar novos compostos com potencial na terapia da dengue, realizou-se um trabalho laboratorial que constou na síntese de dois derivados quinolínicos. As estruturas destes compostos estão representadas na figura 2.10.

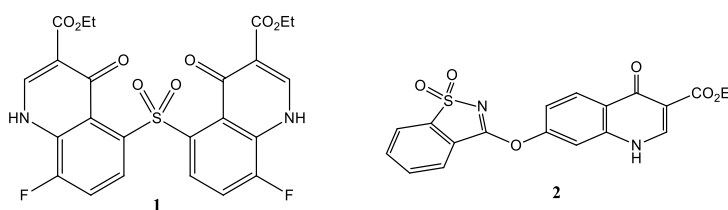


Figura 2.10 - Representação da estrutura dos derivados quinolínicos sintetizados

As estratégias de síntese utilizadas para preparação dos compostos **1**, **2** estão representadas nas figuras 2.11 e 2.12. A síntese da bisquinolona (**1**) (figura 2.11) envolve vários passos: a) redução dos grupos nitro da molécula de bis(4-fluoro-3-nitrofenil)sulfona (**3**) a amina; b) acoplamento das funções amina da molécula (**4**) com etoximetilenomalonato de dietilo; e c) ciclização de (**5**) para a obtenção da bisquinolona (**1**) através de dois métodos diferentes, ou seja, por aquecimento com oxiclureto de fósforo (POCl₃) a 97°C e por aquecimento em dowtherm A a 250°C. Este último método apresenta limitações, relacionadas com a temperatura elevada (acima dos 225°C) a que a reação é submetida, podendo ocorrer degradação térmica, e dependência da concentração. Além disso, a maioria das quinolonas apresentam uma baixa solubilidade, dificultando a sua extração e purificação. (447)

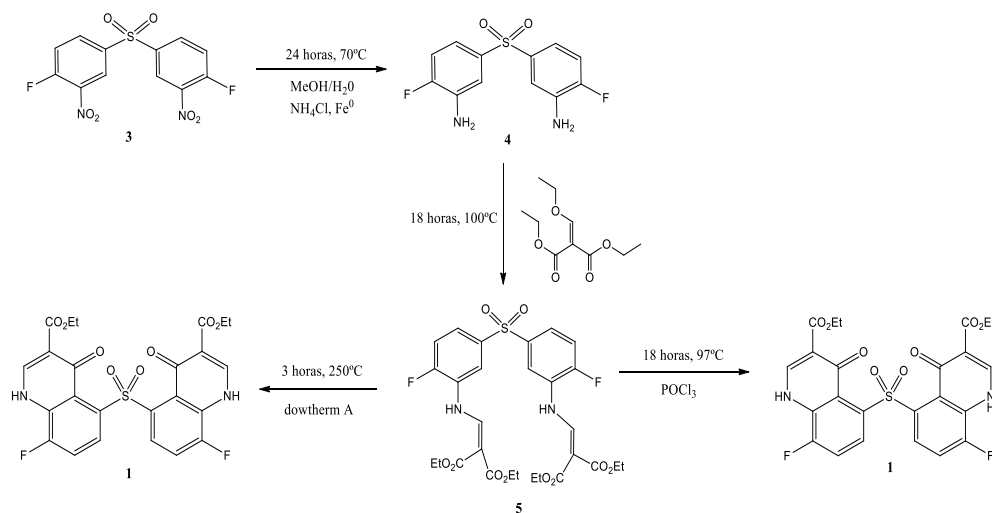


Figura 2.11 - Representação da estratégia proposta para a síntese do primeiro derivado quinolínico (bisquinolona).

A estratégia de síntese para a obtenção da quinolona (**2**) com o heterociclo benzisotiazole como substituinte na posição 7 do sistema quinolínico, envolve cinco passos (figura 2.12). Iniciando a síntese a partir de 3-aminofenol (**6**), o primeiro passo consiste no acoplamento da amina com etoximetilenomalonato de dietilo, seguindo-se a eterificação do grupo hidroxilo terminal de (**7**) com um cloreto de benzisotiazole (sacarina), através do ataque nucleofílico do hidroxilo “fenólico” ao carbono imínico do cloreto de pseudo-sacarina (**9**) (previamente sintetizado por halogenação da sacarina (**8**)). Por fim, a estratégia de síntese inclui a etapa de ciclização para obtenção da quinolona (**2**) por dois métodos distintos: aquecimento com oxiclureto de fósforo (POCl₃), a 97°C; aquecimento em dowtherm A a 250°C.

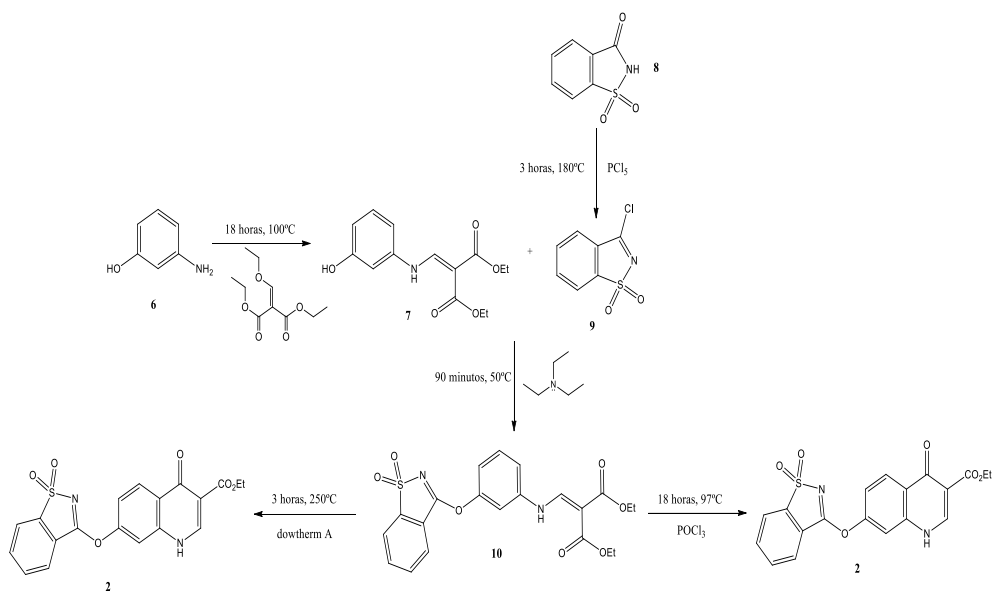


Figura 2.12 – Representação da estratégia proposta para a síntese do segundo derivado quinolínico (quinolona com o resíduo de benzisotiazole em posição 7).

Seguidamente descrevem-se propostas mecanísticas para as diferentes etapas de cada processo de síntese, bem como a discussão dos resultados obtidos em cada etapa. A análise e caracterização dos compostos sintetizados foi efetuada por espectrometria de massa (MS) e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) (protónica e de carbono) dos compostos.

2.4.1. Síntese do primeiro derivado quinolínico (bisquinolona)

2.4.1.1. Redução da função nitro de bis(4-fluoro-3-nitrofenil)sulfona a amina

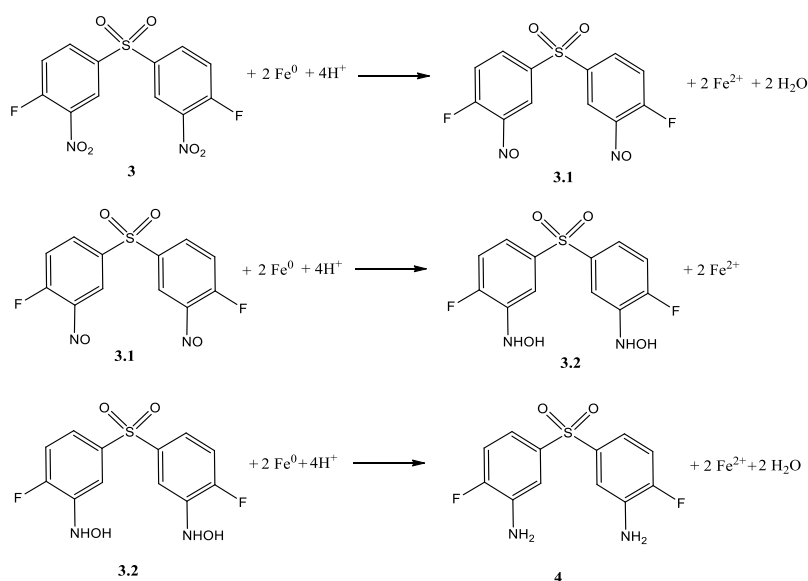


Figura 2.13 – Proposta mecanística para a redução da função nitro de bis(4-fluoro-3-nitrofenil)sulfona (3), a amina.

A função nitro de bis(4-fluoro-3-nitrofenil)sulfona (**3**) foi reduzida a amina (**4**) (figura 2.13) através da utilização de ferro em pó (Fe^0), em meio ácido, usando o cloreto de amônio (NH_4Cl) como agente redutor. Durante a redução formam-se dois produtos intermediários, bis(4-fluoro-3-nitrosfenil)sulfona (**3.1**) e bis(4-fluoro-3-hidroxianilina)sulfona (**3.2**), culminando na formação de bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona (**4**), sem purificação, como um sólido amarelo e com um rendimento de 59.2%, após cerca de 24 horas.

A massa molar do composto final da reação é de 284.28 g/mol, sendo que a presença de um pico com um valor de m/z de 284.0457 no espectro de massas, em modo positivo, confirma a presença do produto pretendido (Anexo 1). Foram encontrados picos relativos a fragmentos do composto pretendido, nomeadamente os picos com valores de m/z de: 220.0825 (fragmento molecular obtido pela perda da função sulfona (SO_2)); 158.0081 (fragmento resultante da perda da fluoroanilina e da segunda amina) e 63.0232 (fragmento resultante da perda de duas fluoroanilinas).

O produto de reação também foi caracterizado por ^1H RMN, observando-se a existência dos picos característicos dos seis prótons aromáticos que compõem a molécula em causa, entre os 7.77-7.36 ppm (Anexo 3). Na caracterização por ^{13}C RMN observou-se a existência de doze picos correspondentes aos doze carbonos dos dois anéis aromáticos da molécula (Anexo 4). Os picos observados, especialmente no espectro de ^1H RMN (Anexo 3) correspondem a desvios químicos mais próximos e compatíveis com os esperados para prótons aromáticos da bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona (**4**). O espectro de ^1H RMN (Anexo 2) de bis(4-fluoro-3-nitrofenil)sulfona (**3**) é apresentado para comparação.

2.4.1.2. Acoplamento da bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona com etoximetilenomalonato de dietilo

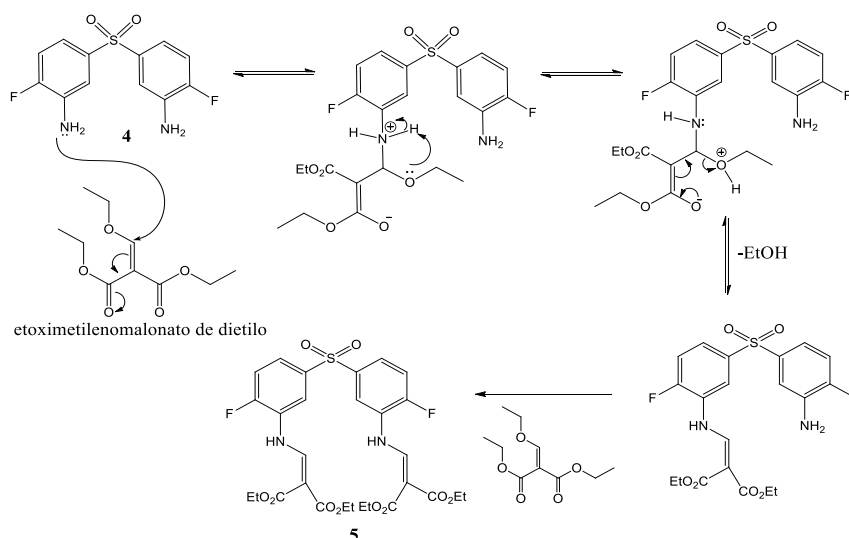


Figura 2.14 – Proposta mecanística para a reação do acoplamento da amina com etoximetilenomalonato de dietilo.

A reação da funcionalidade amina de bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona (4), com etoximetilenomalonato de dietilo, em ambas as funções amins, está descrita na figura 2.14, que inclui uma proposta mecanística. Obteve-se o produto esperado, bis-dietil-2-(((4-fluoro-3-aminofenil)metileno)malonato)sulfona (5), como um sólido cristalino amarelado, com um rendimento de 63,7%.

O composto (5) tem uma massa molar de 624.61 g/mol. Por espectrometria de massa observou-se um pico com um valor de m/z de 624.4072, em modo positivo (Anexo 5), que corresponde ao íon molecular do composto esperado. Através da análise do espectro de massas do composto constata-se a presença de fragmentos com valores de m/z de 578.2991 (resultante da perda de um grupo etoxi do composto final), 533.2091 (perda de dois grupos etoxi) e 505.1830 (fragmento resultante da perda de um grupo éster (CO_2Et) e de um grupo etoxi).

A caracterização do composto final (5), por ^1H RMN revelou a existência de picos característicos, tais como os correspondentes aos doze prótons metílicos terminais da função éster do derivado malonato, entre os 1.26 e 1.21 ppm; aos oito prótons característicos do grupo CH_2 da função éster do derivado malonato, entre 4.23 e 4.13 ppm; aos seis prótons aromáticos, entre 8.35 e 7.56 ppm; dois hidrogénios ligados aos carbonos adjacentes às funções amina que formam o acoplamento correspondente, entre os 8.53 e 8.50 ppm, e dois hidrogénios correspondentes às duas funções amina secundárias do composto, entre os 10.91 e 10.88 ppm (Anexo 6). Na caracterização por

^{13}C RMN observou-se a existência de picos correspondentes aos vinte e oito carbonos do composto final (Anexo 7), com os desvios químicos esperados, consistentes com a estrutura do composto final pretendido.

2.4.1.3. Síntese da quinolona por ciclização do derivado malonato em presença de oxiclreto de fósforo (POCl_3), a 97°C

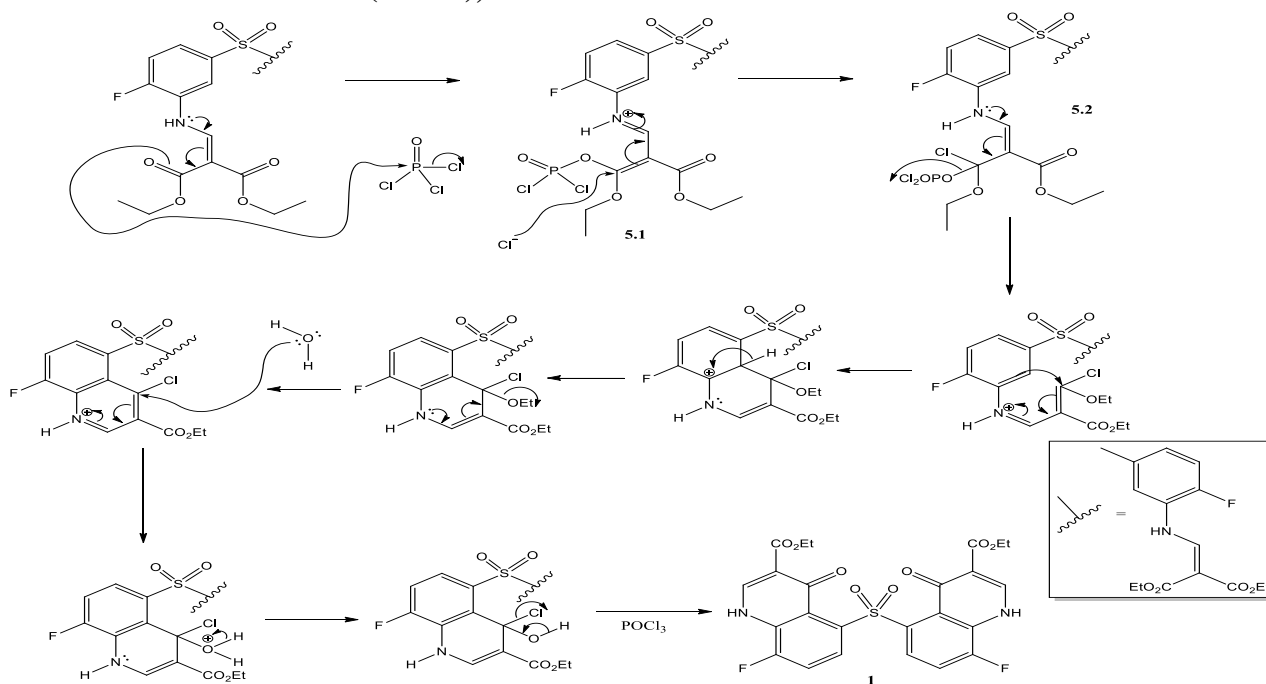


Figura 2.15 – Proposta mecanística para reação de ciclização com formação de quinolona, em presença de oxiclreto de fósforo (POCl_3).

O mecanismo proposto para a ciclização está representado na figura 2.15. Pretendia-se que a ciclização ocorresse nos dois “braços” ou ramificações da molécula, culminando com a formação da bisquinolona 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) (**1**) através de aquecimento com oxiclreto de fósforo (POCl_3).

Da análise do produto por espectrometria de massa (Anexo 8), verificou-se que não se formou o composto pretendido (**1**). O composto esperado teria uma massa molar de 532.47 g/mol, não se encontrando um pico com um m/z próximo desse valor no espectro de massa. No entanto a presença de um pico correspondente a m/z de cerca de 777 poderá sugerir que se trata do composto intermédio que se forma no segundo passo da reação, aquando do ataque nucleófilo do cloro (**5.1**) e posterior saída de PO_2Cl_2 (**5.2**). Considera-se que a reação terá possivelmente terminado neste passo.

Da caracterização por ^1H RMN e ^{13}C RMN do composto final (**1**), detetou-se a presença de alguns picos inconclusivos e de picos característicos do solvente (DMSO) em ambos os espectros (Anexos 9 e 10). O sólido formado era pouco solúvel em DMSO.

2.4.1.4. Ciclização através do aquecimento em dowtherm A (250°C)

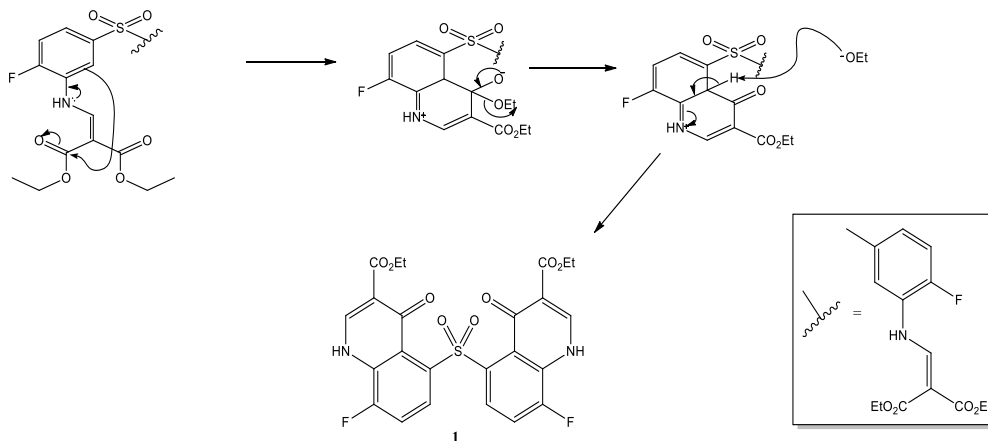


Figura 2.16 – Mecanismo de Gould-Jacobs proposto para a ciclização intramolecular conduzida termicamente em dowtherm A.

O mecanismo de reação proposto para a ciclização intramolecular conduzida termicamente, conhecida por método de Gould-Jacobs, está representado na figura 2.16, em que se propõe que o anel fenilo atua como nucleófilo, atacando o carbono do grupo carbonilo da função éster do derivado malonato^(447,448), culminando com a formação de 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) (**1**) através de aquecimento em dowtherm A.

Purificou-se o resíduo sólido obtido no final da reação efetuando uma cromatografia por “flash” e obtiveram-se três frações, como sólidos amarelos. As três frações resultantes foram caracterizadas por ^1H RMN (frações I, II e III) e por ^{13}C RMN (frações II e III). Ao analisar o espectro de ^1H RMN da fração I, verifica-se a presença de picos inconclusivos, possivelmente por problemas de solubilidade do composto (Anexo 11). Caracterizando as frações II e III por ^1H RMN, verifica-se que estas são semelhantes, pois ambos os espectros apresentam picos em comum, nomeadamente os picos a 4.2 e 1.2 ppm, diferindo ligeiramente na zona aromática (8.5-7.5) ppm, devido ao fato de a fração III não estar pura. (Anexos 12 e 13)

A presença de picos em torno dos 4.2 e 1.2 ppm no espectro de ^1H RMN (Anexos 12 e 13) e entre os 60 e os 14 ppm no espectro de ^{13}C RMN (Anexos 14 e 15) comprovam a existência da função éster terminal nas frações II e III.

2.4.2. Síntese do segundo derivado quinolínico (quinolona com o resíduo de benzisotiazole em posição 7)

2.4.2.1. Acoplamento de 3-aminofenol com etoximetilenomalonato de dietilo

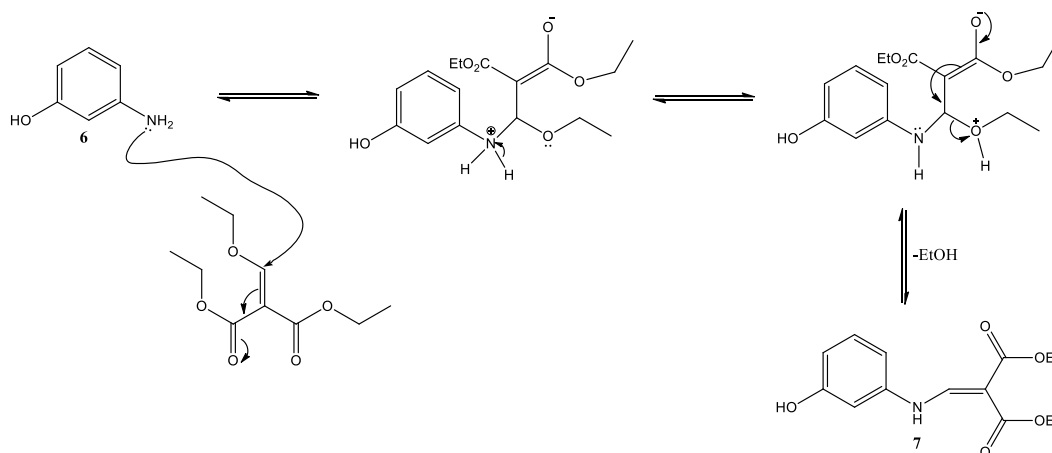


Figura 2.17 – Proposta de mecanismo de reação.

O acoplamento de 3-aminofenol (6) com etoximetilenomalonato de dietilo, culminou com a formação de cristais amarelos de 2-(((3-hidroxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo (7) com um rendimento de 90,9%. O mecanismo proposto encontra-se representado na figura 2.17.

O composto final (7) apresenta uma massa molar de 279.29 g/mol, tendo-se observado a presença de um pico com um valor de m/z de 280.1254 no espectro de massas, em modo positivo, correspondente ao respetivo ião molecular. Neste espectro é possível constatar a existência de: um aducto de sódio com o composto final (7), através da presença de um pico com um valor de m/z de 302,1058; um aducto com potássio, através de um pico a 318,0742 m/z ; e de um fragmento resultante de perda de um grupo etoxi pelo composto final (7), através da presença de um pico a 234,0934 m/z (Anexo 16).

Na análise ao espectro de massa, em modo negativo, comprova-se a existência do anião molecular pela presença de um pico com um valor de m/z de 277.8961. Os fragmentos do composto com picos a 231.9580 e 113.0895 m/z , correspondem respetivamente à perda de um grupo etoxi e um hidrogénio da função álcool (OH), e à perda de um grupo hidroxilo e dois grupos (CO₂Et). (Anexo 17)

O produto resultante foi caracterizado por ¹H RMN, observando-se a presença dos seguintes picos característicos da molécula em causa: ressonâncias de seis prótons metílicos pertencentes ao éster terminal, entre 1.37 e os 1.32 ppm; ressonâncias de quatro prótons metilénicos (CH₂) do éster, entre os 4.32 e os 4.20 ppm; ressonâncias de três

protões aromáticos, entre 6.71 e 6.61 ppm; ressonância de um protão aromático em posição orto, o tripleto a 7.21 ppm, e ressonância de um protão aromático, o singuleto a 8.53 ppm que comprova a presença de um hidrogénio ligado ao carbono adjacente à função amina. (Anexo 18). O composto final (**7**) também foi caracterizado por ^{13}C RMN (Anexo 19).

2.4.2.2. Síntese de cloreto de pseudo-sacarina

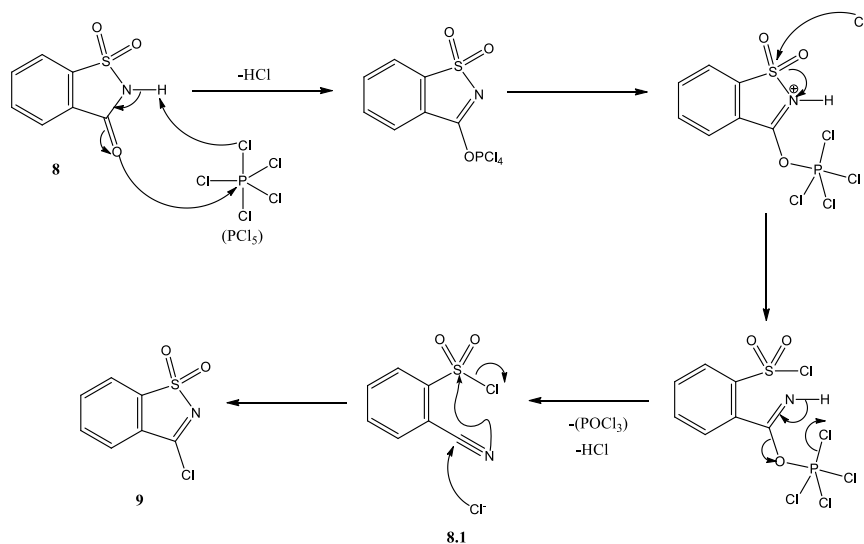


Figura 2.18 – Mecanismo proposto para a síntese de cloreto de pseudo-sacarina, a partir de sacarina.

A reação de halogenação da sacarina (**8**), usando como reagente de halogenação o PCl_5 , conduziu à formação de cloreto de pseudo-sacarina e, como produtos secundários, POCl_3 e HCl . A proposta mecanística está representada na figura 2.18.

Os reagentes foram aquecidos a temperaturas em torno dos 180°C , devido ao facto de a formação de cloreto de pseudo-sacarina (**9**) a partir de cloreto de sulfonilo (**8.1**), requerer um ataque nucleofílico ao carbono do grupo cianeto, o qual tem baixa suscetibilidade nucleofílica. ⁽⁴⁴⁹⁾ A condução da reação utilizando temperaturas baixas e diminuindo o tempo de reação, resulta na formação do cloreto de sulfonilo (**8.1**), explicando-se assim a necessidade de utilizar temperaturas (por volta dos 180°C) para que se aumente o rendimento de produto. ⁽⁴⁵⁰⁾

Após destilação e sucessivas recristalizações, obteve-se o produto resultante, com um rendimento de 20%, como cristais brancos em forma de agulha. A recristalização de cloreto de sacarina (**9**), foi efetuada em tolueno. Através da caracterização do produto por ^1H RMN, foi possível detetar a presença de picos correspondentes a ressonâncias dos quatro protões aromáticos, entre os 7.95 e 7.93 ppm e entre os 7.839 e os 7.837 ppm

(Anexo 20). Também pela caracterização do composto por ^{13}C RMN, observou-se a presença de picos que comprovam a existência de sete carbonos do cloreto de pseudo-sacarina (**9**). (Anexo 21)

Com base na medida do intervalo de fusão do produto ($141\text{-}142^\circ\text{C}$), verifica-se que está de acordo com o referido na literatura ($141\text{-}144^\circ\text{C}$).⁽⁴⁵¹⁾

2.4.2.3. Síntese de 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato de dietilo ou preparação de éter de benzisotiazole.

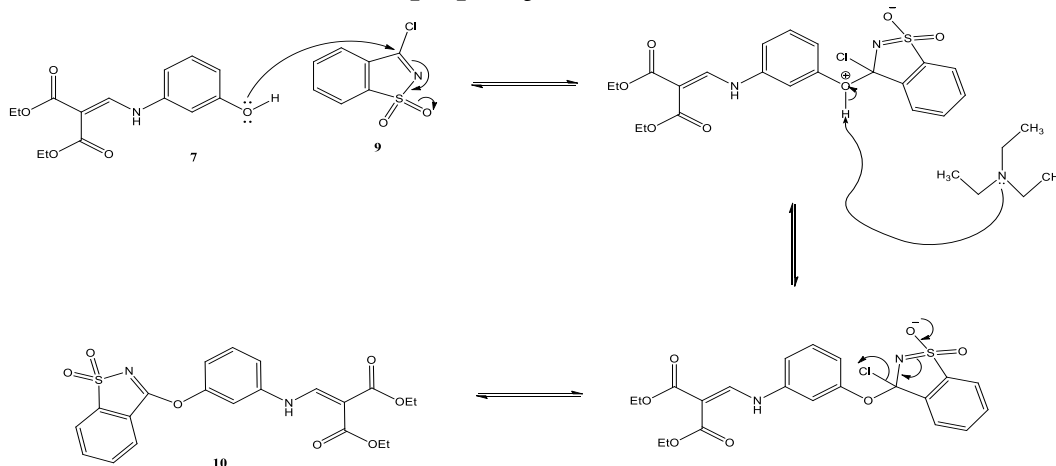


Figura 2.19 – Mecanismo proposto para as etapas envolvidas na síntese de 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato de dietilo (**10**).

O mecanismo de substituição nucleofílica no carbono imínico do cloreto de pseudo-sacarina conduz a formação do éter de sacarina que está representado na figura 2.19, e envolve o ataque nucleofílico do hidroxilo de (**7**) ao cloreto de pseudo-sacarina (**9**), na presença de uma base de Lewis (triethylamina), com formação de 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato de dietilo (**10**), após 90 minutos, com um rendimento de 31,5%, como cristais incolores.

O composto (**10**) tem uma massa molar de 444.46 g/mol, tendo a sua presença sido comprovada pela existência de um pico a 445.1307 m/z, no espectro de massa, em modo positivo, correspondente ao íon molecular. A presença de picos com valores de m/z de 398.0763 que corresponde ao fragmento resultante da perda de um grupo etoxi pelo composto (**10**), a 352.0242 m/z outro fragmento resultante da perda de dois grupos etoxi; 279.1118 m/z perda de um resíduo de sacarina, e um fragmento a 187.0278 m/z resultante da perda de 3-fenoxibenzo-isotiazole-1,1-dioxido (Anexo 22). Este mesmo produto foi ainda caracterizado por ^1H RMN, observando-se a existência de picos característicos, tais como os correspondentes a ressonâncias de seis prótons, entre 1.27 e 1.21 ppm, e de quatro prótons, entre os 4.23 e 4.09 ppm, ambos constituintes da função éster; aos oito

protões dos dois anéis aromáticos, entre 8.22 e 7.25 ppm; ao protão adjacente à função amina, entre 8.40 e 8.36 ppm, e ao protão característico da função amina, entre 10.73 e 10.70 ppm. (Anexo 23).

2.4.2.4. Ciclização em presença de oxiclureto de fósforo (POCl₃), a 97°C

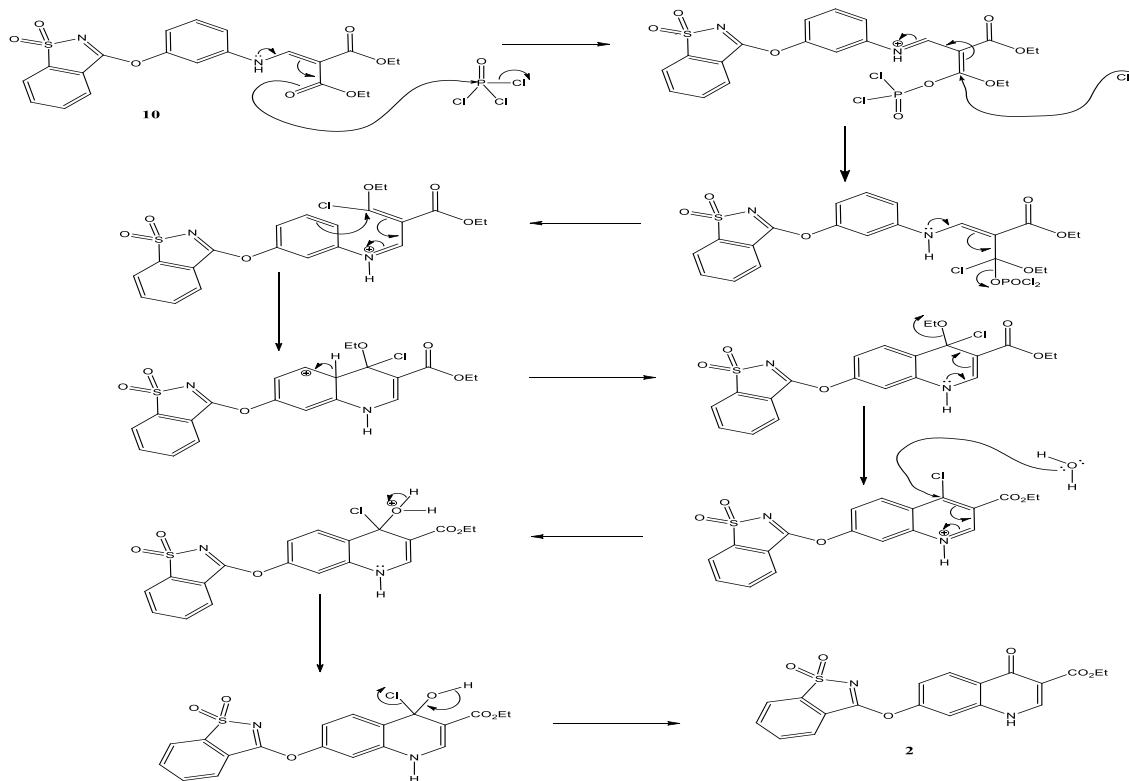


Figura 2.20 – Mecanismo de reação proposto para a ciclização com oxiclureto de fósforo, com formação de 4-cloroquinolína, seguida por hidrólise, para formação de 4-oxoquinolína.

Após a execução do procedimento experimental não ocorreu precipitação da mistura reacional, pelo que não foi possível recuperar qualquer composto do meio reacional até à data. Apesar de não ter sido possível obter qualquer produto, seria de esperar que a reação ocorresse pelo mecanismo proposto na figura 2.20.

2.4.2.5. Ciclização através do aquecimento em dowtherm A (250°C)

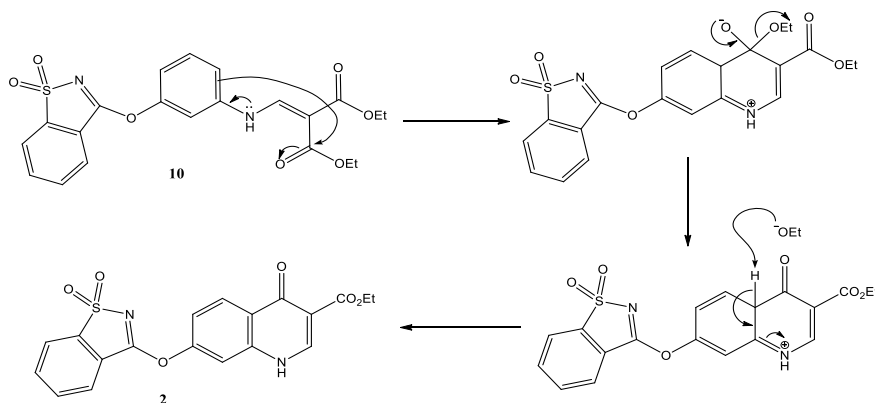


Figura 2.21 – Mecanismo de reação da ciclização intramolecular conduzida termicamente, metodologia de Gould-Jacobs.

O mecanismo de reação proposto para a ciclização intramolecular conduzida termicamente, em dowtherm A (250°C), conhecida por método de Gould-Jacobs, está representado na figura 2.21.

Apesar da análise por TLC do sólido amarelado obtido ter revelado que este não se encontrava puro, a amostra foi caracterizada por espectrometria de massa e por ^1H RMN.

O composto final (**2**) tem uma massa molar de 398.39 g/mol, sendo que a sua presença é comprovada pela existência de um pico com um valor de m/z de 399.1. A presença de outro pico a 421.0 m/z é correspondente à formação de um aducto de sódio com o composto final. Outro pico presente a 256.1 m/z corresponde ao fragmento formado pela perda do resíduo de sacarina pelo aducto de sódio do composto final (Anexo 24). Contudo a presença de outros picos dão a entender que a amostra não se encontrava pura.

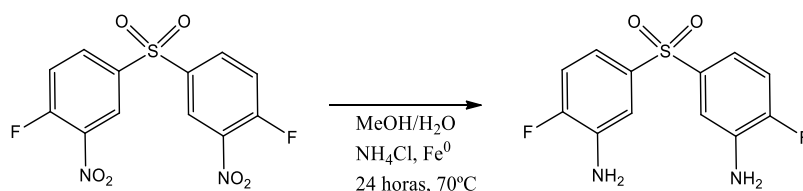
Na caracterização do mesmo produto por ^1H RMN (Anexo 25), observou-se a presença de picos entre 1.31 e 1.28 ppm, correspondentes às ressonâncias de três prótons (CH_3), e entre 4.26 e 4.21 ppm, correspondentes às ressonâncias de dois prótons (CH_2) do grupo éster; a presença de picos entre 8.61 e 7.53 ppm referentes aos oito prótons aromáticos e a presença de um duplete entre 12.53 e 12.51 ppm, característico do próton da amina pertencente à quinolona. A zona aromática entre os 7 e os 8.60 ppm apresenta picos devido à possível presença de impurezas, pois a amostra não se encontrava pura, e analisando o espectro de ^1H NMR do solvente dowtherm A utilizado (Anexo 26) deteta-se a presença de picos a 7.02, 7.15, 7.40, 7.47 e 7.66 ppm que são comuns aos picos aromáticos encontrados no espectro do produto de reação (Anexo 25), evidência comprovada pela sobreposição espectral na zona aromática dos dois espectros (Anexo 27).

Uma possível impureza detetada na zona aromática poderá ocorrer devido ao próprio solvente (dowtherm A), pois este apresenta um ponto de ebulição muito elevado, sendo difícil de extrair dos sólidos e mesmo filtrando e lavando com hexano e éter de petróleo por vezes dificulta a sua remoção na totalidade. Confirma-se que o substituinte sacarina está ligado à quinolona devido à presença de um quarteto característico correspondente às ressonâncias de dois prótons, entre 8.04 e 7.94 ppm, comum aos espectros de ^1H RMN do composto (Anexo 25) e da caracterização da síntese de 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato de dietilo (**10**) (Anexo 23).

2.5. Procedimento experimental

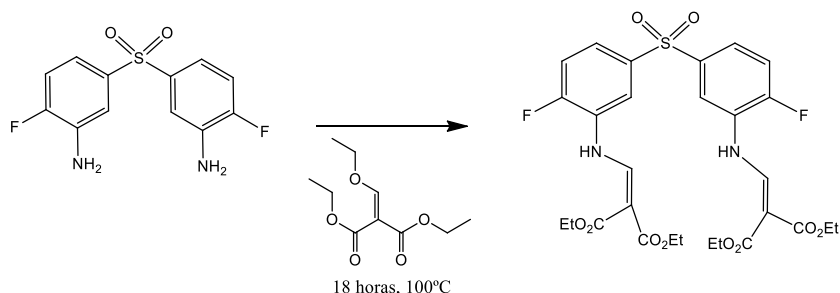
2.5.1. Síntese de 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato)

2.5.1.1. Síntese de bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona



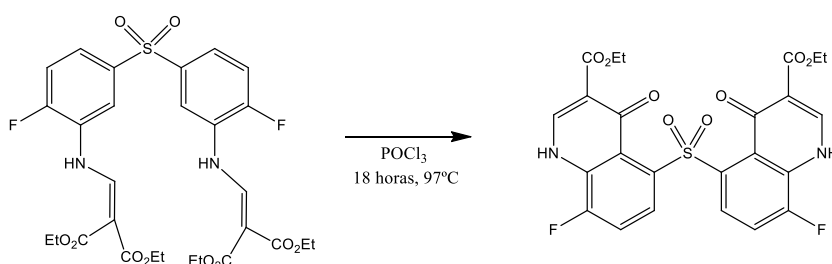
Dissolveu-se bis(4-fluoro-3-nitrofenil)sulfona (2g; 5,8mmol) numa mistura de 30mL de metanol:água (1:1). Seguidamente adicionou-se cloreto de amónio (2,02g; 37,7mmol) e ferro em pó (1,04g; 18,56mmol) e colocou-se a mistura sob agitação, a 70°C, durante 24 horas. Após arrefecimento, filtrou-se a mistura reacional com celite (adsorvendo os resíduos inorgânicos) e lavou-se com metanol, acetato de etilo e DCM. De seguida procedeu-se à evaporação do filtrado e extração do resíduo aquoso com acetato de etilo, com posterior secagem com sulfato de magnésio anidro, filtração e concentração do filtrado orgânico. Colocou-se o resíduo orgânico obtido sobre gelo e acidificou-se com ácido clorídrico concentrado (até pH \approx 1). Ocorreu precipitação e filtrou-se o precipitado, obtendo-se o produto como um sólido amarelo (0,978g; 3,44mmol; 59,2%). MS m/z (TOF MS, EI⁺): 284,0457 ([M]⁺); 285,0465 ([M+H]⁺). ^1H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7.77-7.75 (dd, 2H), 7.67-7.64 (m, 2H), 7.40-7.36 (dd, 2H). ^{13}C RMN (101 MHz, MeOD) δ 157.43, 154.81, 138.14, 138.10, 129.76, 129.61, 122.87, 122.79, 119.46, 119.42, 116.80, 116.60. Anexos 1, 3 e 4. Intervalo de fusão 212-213°C.

2.5.1.2. Síntese de bis-dietil-2-(((4-fluoro-3-aminofenil)metileno)malonato)sulfona



A 100°C e em condições anidras, colocou-se sob agitação bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona (1,001g; 3,52mmol) dissolvido em etoximetilenomalonato de dietilo (1,42mL; 7,04mmol), durante 18 horas. Arrefeceu-se a mistura reacional e dissolveu-se com DCM e etanol, deixando em repouso para o produto cristalizar. Filtrou-se o sólido cristalino obtido e lavou-se com etanol gelado. Por TLC mostrou-se que o composto se encontrava puro. Obteve-se bis-dietil-2-(((4-fluoro-3-aminofenil)metileno)malonato)sulfona (1,4g; 2,24mmol; 63,7%) como sólido cristalino amarelado, o qual foi caracterizado. MS m/z (TOF MS, EI⁺): 624,4072 ([M]⁺), 625,4125 ([M+H]⁺). ¹H RMN (400 MHz, D₆-DMSO) δ 10,91-10,88 (d, 2H), 8,53-8,50 (d, 2H), 8,35-8,33 (dd, 2H), 7,84-7,80 (m, 2H), 7,61-7,56 (m, 2H), 4,23-4,13 (dq, 8H), 1,26-1,21 (m, 12H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 171,70, 169,87, 168,40, 165,14, 155,49, 152,76, 152,34 149,48, 133,09, 126,48, 122,72, 117,64, 102,94, 102,80, 97,64, 97,48, 60,70, 14,20. Anexos 5, 6 e 7. Intervalo de fusão 189-190°C.

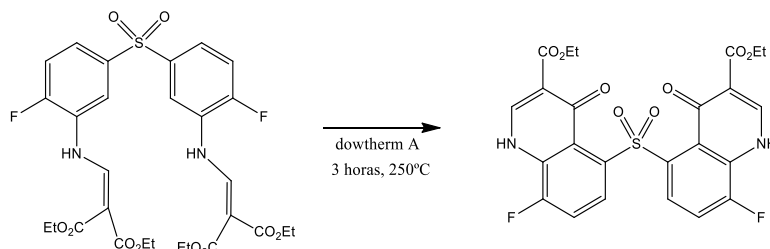
2.5.1.3. Síntese de 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) através de aquecimento com oxiclreto de fósforo (POCl₃)



Colocou-se sob agitação, a 97°C, em condições anidras, bis-dietil-2-(((4-fluoro-3-aminofenil)metileno)malonato)sulfona (1g; 1,6mmol) dissolvido em oxiclreto de fósforo (10mL) durante 18 horas. De seguida removeu-se por sistema de vácuo e aquecimento o excesso de POCl₃ e derivados. Adicionou-se 15mL de isopropanol quando a temperatura do sistema reacional se encontrava a 90°C, e manteve-se em agitação durante 30 minutos. Deixou-se o sistema reacional arrefecer até atingir a temperatura

ambiente. Filtrou-se o sólido obtido e lavou-se com isopropanol e éter de petróleo 40-60, gelado. Obteve-se 0.775g de pó alaranjado. A amostra apresentou problemas de solubilidade em DMSO. Espectros disponibilizados em: Anexos 8, 9 e 10.

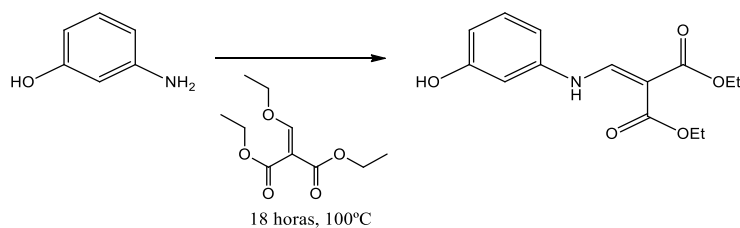
2.5.1.4. Síntese de 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) através de aquecimento em dowtherm A



Colocou-se sob agitação, a 250°C, sob condições anidras, bis-dietil-2-(((4-fluoro-3-aminofenil)metileno)malonato)sulfona (1g; 1,6mmol) dissolvido em dowtherm A (10mL), durante 3 horas. Desligou-se a temperatura do sistema reacional até a mistura atingir a temperatura ambiente. Formou-se um sólido alguns dias depois. Filtrou-se o sólido e lavou-se com hexano e éter etílico. Ao analisar por TLC verificou-se que o sólido não se encontrava puro, e efetuou-se uma cromatografia em coluna de sílica, eluindo inicialmente com 50% acetato de etilo em hexano e aumentando-se progressivamente a polaridade do solvente para 15% de metanol em DCM. Obtiveram-se 3 frações de um sólido amarelo com 198, 455 e 206mg. A fração I apresentou problemas de solubilidade. Fração II: ^1H RMN (400 MHz, D6-DMSO) δ 4.25-4.14 (m, 2H), 1.28-1.23 (t, 3H); ^{13}C RMN (101 MHz, D6-DMSO) δ 60.65, 14.67. Fração III: ^1H RMN (400 MHz, D6-DMSO) δ 4.24-4.14 (m, 2H), 1.28-1.24 (t, 3H); ^{13}C RMN (101 MHz, D6-DMSO) δ 60.34, 14.52. Espectros disponibilizados em: Anexos 11, 12, 13, 14 e 15.

2.5.2. Síntese de acetato de 7-((1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato

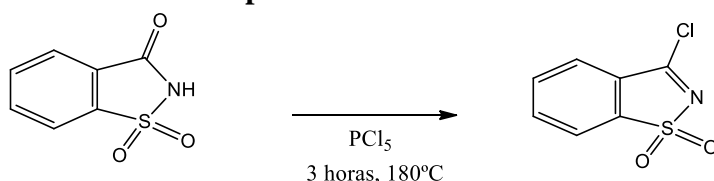
2.5.2.1. Síntese de 2-(((3-hidroxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo



Em condições anidras dissolveu-se 3-aminofenol (2g; 18,33mmol) em etoximetilenomalonato de dietilo (3,7ml; 18,33mmol) e colocou-se a mistura em

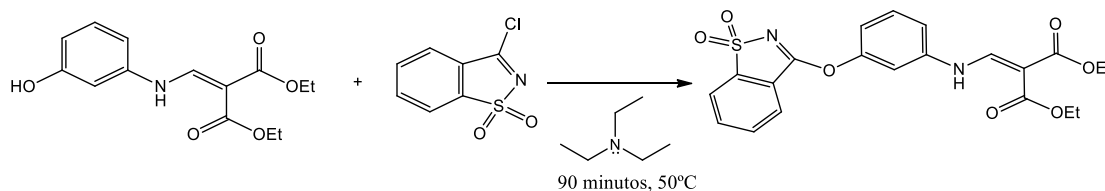
agitação, a 100°C, durante 18 horas. Após arrefecimento, dissolveu-se o sólido em DCM e etanol para cristalizar. Após filtração, o sólido foi lavado com etanol gelado. Obteve-se 4,653g (16,66mmol; 90,9%) de 2-(((3-hidroxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo sob a forma de cristais amarelos. MS m/z (TOF MS, EI+): 280,1254 ([M+H]⁺); 302,1058 ([M+Na]⁺); 318,0742 ([M+K]⁺). MS m/z (TOF MS, EI-): 277,8961 ([M-H]⁻). ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8.53 (br, s, 1H), 7.21 (t, 1H), 6.71-6.61 (m, 3H), 4.32-4.20 (dq, 4H), 1.37-1.32 (dt, 6H). ¹³C RMN (101 MHz, D6-DMSO) δ 167.69, 165.23, 158.90, 151.27, 140.81, 130.97, 112.29, 108.59, 104.57, 93.25, 60.02, 59.81, 14.63, 14.56. Anexos 16, 17, 18 e 19. Intervalo de fusão 151-152°C.

2.5.2.2. Síntese do cloreto de pseudo-sacarina



Colocou-se em agitação e a 180°C, sob condições anidras, sacarina (10g; 54,6mmol) e pentacloreto de fósforo (12,39g; 59,514mmol). Após 3 horas removeu-se por destilação sob vácuo e aquecimento o excesso de PCl₅ e derivados (POCl₃ e HCl). Posteriormente adicionou-se tolueno (80mL), quando o sistema reacional se encontrava a 110°C, até dissolver a mistura. Deixou-se arrefecer lentamente até precipitar um sólido. Filtrou-se, e lavou-se o sólido obtido com tolueno gelado. De seguida o sólido foi recristalizado sucessivamente com tolueno, até obter cristais puros. Obteve-se (2,2g; 10,91mmol; 20%) de cristais brancos em forma de agulha. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.95-7.93 (d, 2H), 7.839-7.837 (d, 2H). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 166.08, 140.63, 134.93, 134.41, 129.94, 125.07, 122.49. Anexos 20 e 21. Intervalo de fusão 141-142°C.

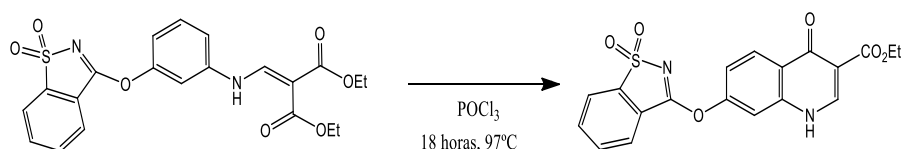
2.5.2.3. Síntese de 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato de dietilo



Em condições anidras e a 50°C, colocou-se em agitação 2-(((3-hidroxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo (1g; 3,58mmol) e cloreto de pseudo-sacarina (0,938g; 4,65mmol) dissolvidos em tolueno (15mL), durante 30 minutos. Seguidamente adicionou-se trietilamina (0,99mL; 7,16mmol). Deixou-se a mistura sob

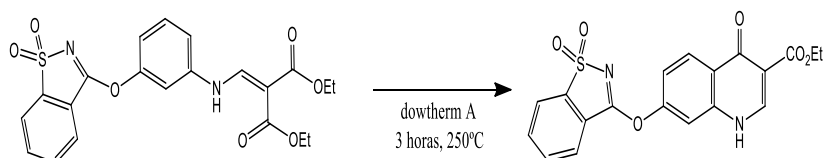
agitação durante 1 hora e controlou-se o progresso da reação por TLC. Posteriormente desligou-se a temperatura do sistema, e deixou-se arrefecer lentamente até formar um sólido. Filtrou-se o sólido com tolueno gelado. Recristalizou-se com DCM e etanol. Filtraram-se os cristais e lavaram-se com etanol gelado. Obteve-se (0,501g; 1,127mmol; 31,5%) de cristal branco. MS m/z (TOF MS, EI+) 444,1267 ([M+]); 445,1307 ([M+H]⁺). ¹H RMN (400 MHz, D6-DMSO) δ 10.73-10.70 (d, 1H), 8.40-8.36 (d, 1H), 8.22-8.20 (d, 1H), 8.14-8.12 (d, 1H), 8.02-7.94 (q, 2H), 7.67 (br, s, 1H), 7.55-7.51 (t, 1H), 7.42-7.40 (d, 1H), 7.27-7.25 (d, 1H) 4.23-4.09 (dq, 4H), 1.27-1.21 (dt, 6H). Espectros disponíveis em: Anexos 22 e 23. Intervalo de fusão 150-153°C.

2.5.2.4. Síntese de acetato de 7-((1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)-4-oxo-1,4-di-hidroquinolina-3-carboxilato através de aquecimento com oxiclreto de fósforo (POCl₃)



Colocou-se sob agitação, a 97°C, sob condições anidras 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato de dietilo (0,268g; 0,603mmol) dissolvido em oxiclreto de fósforo (10 mL) durante 18 horas. Seguidamente procedeu-se à destilação sob vácuo, para remoção do excesso de POCl₃ e outros produtos secundários. Desligou-se o sistema reacional e quando a temperatura atingiu os 90°C adicionou-se isopropanol (10mL), mantendo-se a mistura a esta temperatura durante 30 minutos, sob agitação. Posteriormente a mistura atingiu, progressivamente, a temperatura ambiente. Não ocorreu precipitação da mistura reacional e não foi possível recuperar qualquer produto.

2.5.2.5. Síntese de acetato de 7-((1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato através de aquecimento em dowtherm A



Em condições anidras, e sob agitação, dissolveu-se 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato de dietilo (0,5g; 1,125mmol) em dowtherm A (8.5mL), a 250°C, durante 3 horas. De seguida desligou-se a temperatura do

sistema reacional, até atingir a temperatura ambiente. Seguidamente adicionou-se hexano e colocou-se a mistura no congelador. Após algumas horas ocorreu precipitação. Filtrou-se o sólido amarelo e lavou-se com hexano gelado. Efetuou-se um controlo por TLC do composto obtido e, apesar de não se encontrar puro, a amostra foi caracterizada pois observou-se uma mancha maioritária e contaminação muito ténue. Obteve-se 0.019g de composto. MS m/z (TOF MS, EI+): 399.1 ($[M+H]^+$), 421.0 ($[M+Na]^+$). 1H RMN (400 MHz, D6-DMSO) δ 12.53-12.51 (d, 1H), 8.61-8.60 (d, 1H), 8.31-8.29 (d, 1H) 8.24-8.23 (d, 1H), 8.18-8.16 (d, 1H), 8.04 – 7.96 (q, 2H), 7.81-7.80 (d, 1H), 7.56-7.53 (dd, 1H), 4.26 – 4.21 (q, 2H), 1.31 – 1.28 (t, 3H). Espetros disponíveis em: Anexos 24 e 25.

Capítulo 3

3. Conclusão

A dengue tornou-se uma das principais preocupações de saúde pública em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo.

Não existem ainda terapêuticas profiláticas ou farmacológicas específicas da dengue, nem vacinas aprovadas para uso clínico. O único tratamento disponível para pacientes de dengue grave é a terapia de reposição de líquidos, sob supervisão médica. Deste modo, uma abordagem possível para fazer face ao alastramento dramático da doença verificado nas últimas décadas passará por harmonizar a vigilância (entomológica e epidemiológica), a prevenção integrada (gestão ambiental, controlo químico e biológico), uma melhor organização nos serviços de saúde existentes de forma a promover um diagnóstico clínico e laboratorial precoce de casos, uma gestão adequada dos casos mais graves e gestão de surtos de dengue de forma eficaz, bem como campanhas de sensibilização de educação em saúde com a participação da comunidade. Esta estratégia conjunta irá contribuir para a redução da morbidade e mortalidade no mundo causada pela dengue.

Nos últimos anos temos assistido a um elevado número de investigações em muitos setores que podem contribuir a curto prazo para a minimização deste grave problema de saúde pública, nomeadamente a procura de métodos de controlo mais eficazes e seguros para o homem e para o ambiente, e de baixo custo. O controlo biológico à base de *Wolbachia* pode constituir uma alternativa ecológica, segura e barata, demonstrando potencial para ser eficaz numa escala global.

Outra abordagem requer uma melhor compreensão sobre a estrutura viral, o seu ciclo de vida e a patogénese, para acelerar o desenvolvimento de vacinas e fármacos antidengue eficazes. A existência de fármacos e vacinas disponíveis para outras doenças virais agudas e crónicas apoia a noção de que também pode ser viável o desenvolvimento de medicamentos e vacinas contra infeções DENV. Com a disponibilização de kits de deteção precoce do antigénio da DENV nos últimos anos, o desenvolvimento de um fármaco para o tratamento atempado tornou-se uma prioridade. Dada a enorme ameaça à saúde pública colocada pela dengue, com cerca de metade da população mundial em risco, é urgente desenvolver um fármaco antiviral para a dengue e / ou uma vacina.

Atualmente existem várias vacinas candidatas anti dengue, mas só a vacina CYD Sanofi se encontra em ensaios de fase III. Esta vacina demonstrou ser segura, apresenta

diferentes níveis de eficácia contra os quatro serotipos e elevada eficácia contra a dengue grave. Contudo, mais trabalhos de investigação e ensaios clínicos serão necessários até que uma vacina contra a dengue segura e eficaz possa ser aprovada para uso clínico.

Atualmente estão em estudo alguns fármacos com a capacidade de reduzir rapidamente títulos virais numa fase precoce. Os estudos sobre fármacos com atividade anti-DENV têm sido feitos com múltiplas abordagens. Tipicamente, estes têm sido baseados quer em ensaios bioquímicos com um alvo quer em ensaios baseados em células e confinados em geral a um único serotipo DENV. Contudo, é importante que um ideal inibidor do vírus da dengue seja eficaz em todos os quatro serotipos. Além disso, apenas alguns candidatos a fármacos anti-DENV foram testados no modelo animal disponível para avaliar a eficácia *in vivo* (ratos AG129).

Alguns fármacos atingiram a fase de desenvolvimento clínico, mas os resultados não têm sido muito encorajadoras, pelo que é necessário prosseguir com as triagens de moléculas no sentido de identificar alguma que seja eficaz nos quatro serotipos da DENV.

A base molecular da dengue grave está longe de ser claramente entendida, e em particular os fatores do hospedeiro que estão envolvidos na patogénese da dengue grave.

Também é importante ter um modelo animal pequeno confiável para avaliação pré-clínica *in vivo* para avaliar a eficácia de fármacos e tal modelo não está ainda disponível.

Como a dengue é endémica nas nações pobres em recursos, onde os pacientes potenciais têm pouco poder de compra, manteve-se uma das doenças negligenciadas. Assim, ao contrário de HCV, o desenvolvimento de medicamentos antivirais para a dengue não têm sido objeto de particular interesse por parte das empresas farmacêuticas. Porém, recentemente, muitos estudos académicos e algumas empresas têm investido na procura de soluções no sentido de encontrar um composto promissor, o qual deve ser avaliado em diferentes modelos animais *in vitro* a fim de gerar maior confiança para os ensaios clínicos. É imperioso que estes trabalhos se desenvolvam, para que as vacinas e os fármacos, se aliem muito em breve no combate eficaz da dengue. Esperam-se progressos significativos no desenvolvimento de medicamentos e vacinas para a dengue na próxima década, sendo provável o aparecimento de uma solução terapêutica.

O trabalho de investigação bibliográfica que suporta a presente dissertação foi complementado por uma atividade laboratorial que consistiu na síntese de dois derivados

quinolínicos. As estratégias de síntese seguidas são multi-etápicas, tendo sido variadas as condições reacionais no último passo.

O desenho e a síntese de derivados quinolínicos, como os preparados neste trabalho experimental, pode servir de base para o desenvolvimento e otimização de novos agentes antivirais para uso terapêutico na dengue, dado que estruturas semelhantes já revelaram possuir atividade antiviral em vírus da família *Flaviviridae*.

Referências bibliográficas

- 1- Gubler DJ. Dengue/dengue hemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Symp.* 2006; 277:3–16.
- 2- Anne NE, Murray, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of Dengue: past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology.* 2013; 5:299-309.
- 3- Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever: Its History and Resurgence as a Global Public Health Problem. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* London: CAB International. 1997;1–22.
- 4- Wilder-Smith A, Gubler DJ. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *Med Clin N Am.* 2008; 92(6):1377–1390.
- 5- Gubler DJ. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trend Microbiol* 2002; 10(2):100-103.
- 6- Gubler DJ. Prevention and control of tropical diseases in the 21st century: back to the field. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2001; 65, v-xi.
- 7- Anonymous "Etymologia: dengue". *Emerging Infectious Diseases.* 2006; 12(6):893. doi:10.3201/eid1206.ET1206.
- 8- Dusane P, Patil ST, Pawar SP. A Review of Dengue. *International Journal of Pharmaceutical e Biological Archives.* 2013; 4(6):1075-1085.
- 9- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical microbiology reviews.* 1998; 11(3):480 - 96.
- 10- World Health Organization (WHO). *Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020.* Geneva: WHO Press. 2012.
- 11 - Gubler DJ. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health.* 2011; 39(4):3–11.
- 12- World Health Organization. *Global Alert and Repsonse Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever.* Geneva: 2013; Available from: <http://www.who.int/csr/disease/dengue/en/index.html>.
- 13- Ferreira GL. Global dengue epidemiology trends. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012; 54(18):S5–S6.
- 14- Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 2002; 33(4):330–342.
- 15- Shepard DS, Coudeville L, Halasa YA, Zambrano B, Dayan GH. Economic impact of dengue illness in the Americas. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(2):200–207
- 16- Gibbons RV, Vaughn DW. Dengue: an escalating problem. *BMJ.* 2002; 324(7353):1563-1566.
- 17- World Health Organization (WHO); *Dengue, countries or areas at risk, 2011.* Geneva. 2012.
- 18 - Hammond SN, Balmaseda A, Perez L, Tellez Y, Saborío SI, Mercado JC, Videá E, Rodríguez Y, Pérez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, Idiaquez W, Gonzalez A, Harris E. Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73(6):1063–1070.
- 19- Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S, Halstead SB. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *Int J Infect Dis.* 2002; 6(2):118–124.

- 20- Gubler DJ. The economic burden of dengue. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86(5):743–744.
- 21- Beatty ME, Beutels P, Meltzer MI, Shepard DS, Hombach J, Hutubessy R, Dessis D, Coudeville L, Dervaux B, Wichmann O, Margolis HS, Kuritsky JN. Health economics of dengue: a systematic literature review and expert panel’s assessment. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(3):473–488.
- 22- Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, Moyes CL, Farlow AW, Scott TW, Hay SI. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(8):e1760.
- 23- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013; 496:504–507.
- 24- Chen LH, Wilson ME. The role of the traveler in emerging infection sand magnitude of travel. *Med Clin North Am.* 2008; 92:1409–32.doi:10.1016/j.mcna. 2008.07.005
- 25- Dengue and severe dengue: Fact Sheet No 117 [webpage on the Internet]. Geneva: World Health Organization (WHO); 2012 cited. 2013; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/index.html>.
- 26- Normile D. Tropical medicine. Surprising new dengue virus throw s a spanner in disease control efforts. *Science.* 2013; 342:415.doi:10.1126/science.342. 6157.415.
- 27- Grange L, Simon-Lauriere E, Sakuntabhai A, Gresh L, Paul R, Harris E. Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. *Frontiers in immunology.* 2014.
- 28- Halstead SB. Is there an inapparent dengue explosion?.*Lancet.* 1999; 353:1100–1.doi:10.1016/S0140-6736(05)76461-8.
- 29- Simmons CP, Farrar JJ, Van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *New England Journal of Medicine.* 2012; 366: 1423 – 1432.
- 30- Lisova O, Belkadi L, Bedouelle H. Direct and indirect interactions in the recognition between a cross-neutralizing antibody and the four serotypes of dengue virus. *Wileyonlinelibrary.com* doi 2013; 10.1002/jmr.2352.
- 31- Gubler DJ, Ooi EE, Farrar J, Vasudevan S. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.* 2ª Ed. Cab International. 2014.
- 32- Gibbons RV, Kalanarooj S, Jarman RG, Nisalak A, Vaughn DW, Endy TP, Mammen MP, Srikiatkachorn A. Analysis of repeat hospital admissions for dengue to estimate the frequency of third or fourth dengue infections resulting in admissions and dengue hemorrhagic fever, and serotype sequences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 77:910–913.
- 33- Reich NG, Shrestha S, King AA, Rohani P, Lessler J, Kalayanarooj S, Yoon IK, Gibbons RV, Burke SD, Cummings DAT. Interactions between serotypes of dengue highlight epidemiological impact of cross-immunity. *Interface.* 2014.
- 34- World Health Organization. *Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition.* Geneva: World Health Organization. 2009.
- 35- Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion . *Cell* 2002; 108:717–725.

- 36- Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, west Nile and dengue viruses. *Natural Medicine*. 2004; 10:598-5109.
- 37- Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2007.
- 38- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5:518–528.
- 39- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiology*. 2005; 3:13–22. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1067>.
- 40- Kostyuchenko VA, Chew PL, Ng TS, Lok SM. Near-Atomic Resolution Cryo-Electron Microscopic Structure of Dengue Serotype 4 Virus. *Journal of Virology*. 2014; 477-482.
- 41- Umareddy I, Pluquet O, Wang QY, Vasudevan SG, Chevet E, GuF. Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Journal of Virology*. 2007; 4:91.
- 42- Faheem M, Raheel U, Riaz MN, Kanwal N, Javed F, us Sahar Sadaf Zaidi N, Qadri I. A molecular evaluation of dengue virus pathogenesis and its latest vaccine strategies. *Mol. Biol Rep*. 2011; 38:3731-3740.
- 43- Herrero LJ, Zakhary A, Gahan ME, Nelson MA, Herring BL, Hapel AJ, Keller PA, Obeysekera M, Chen W, Sheng KC, Taylor A, Wolf S, Bettadapura J, Broor S, Dar L, Mahalingam S. Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013; 137:266-282.
- 44- Romero TA, Tumban E, Jun J, Lott WB, Hanley KA. Secondary structure of dengue virus type 4 3' untranslated region: impact of deletion and substitution mutations. *J Gen Virol*. 2006; 87:3291–3296.
- 45- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *Journal of Virology*. 2005; 79:1223–1231.
- 46- Marks RM, Lu H, Sundaresan R, Toida T, Suzuki A, Imanari T, Hernáiz MJ, Linhardt RJ. Probing the interaction of dengue virus envelope protein with heparin: Assessment of glycosaminoglycan-derived inhibitors. *J. Med. Chem*. 2001; 44:2178–2187.
- 47- Mondotte JA, Lozach PY, Amara Ali, Andrea VG. Essential role of dengue virus envelope protein N glycosylation at asparagine-67 during viral propagation. *Journal of Virology*. 2007; 81:7136–7148.
- 48- Mackenzie JM, Jones MK, Young PR. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology*. 1996; 220:232–240.
- 49- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10 de junho de 2003; 100(12): 6986–6991.
- 50- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis HS, Martínez E, Nathan MB, Pelegrino JL, Simmons C, Yoksan S, Peeling RW. Dengue: a continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol*. dezembro de 2010; 8(12):S7–16.
- 51- Ray D, Shi PY. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2006; 1(1):45–55.
- 52- Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice, CM. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: Knipe, DM, Howley, PM. *Fields Virology*, 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007; (1):1102-1148.

- 53- Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(2):376–381.
- 54- Somnuk P, Hauhart RE, Atkinson JP, Diamond MS, Avirutnan P. N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement. *Virology.* 2011; 413(2):253–264.
- 55- Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(24):14333–14338.
- 56- Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of Virology.* 1997; 65:2467-2475.
- 57- Matusan AE, Pryor MJ, Davidson AD, Wright PJ. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication *Journal of Virology.* 2001; 75(20):9633–9643.
- 58- Miller S, Kastner S, Locker JK, Buhler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *J Biol Chem.* 2007; 282(12):8873–888224.
- 59- Qi R, Zhang L, Chi C. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2008; 40(2):91–101.
- 60- McBride WJH, Bielefeldt-Ohmann H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. *Microbes and infection.* 2000; 2(9):1041-1050.
- 61- Dengue and Chikungunya in our backyard: Preventing Aedes Mosquito – Borne Diseases. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. 2015.
- 62- Gould EA, Solomon T. "Pathogenic flaviviruses". *The Lancet.* 2008; 371(9611):500–509. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60238-X. PMID 18262042.
- 63- World Health Organization. Vector-borne viral infections. Retrieved. 2011.
- 64- Center for Disease Control and Prevention. "Chapter 5 – dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF)". *Yellow Book.* Retrieved. 2010; 12-23.
- 65- Carrington LB, Simmons CP. Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Frontiers in Immunology.* 2014.
- 66- Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, Khen NT, Drouet MT, Huong VT, Ha DQ, Buisson Y, Deubel V. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch* 2001; 438:107–115.
- 67- Araújo F, Nogueira R, de Sousa Araújo M, Perdigo A, Cavalcanti L, Brilhante R, Rocha M, Vilar DF, Holanda SS, Braga Dde M, Sidrim J. Dengue in patients with central nervous system manifestations, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:677–679.
- 68 - Halstead SB. Dengue. *Lancet* 2007; 370:1644–1652.
- 69- Hidari KIPJ, Suzuki T. Dengue virus receptor. 2011. *Tropical Medicine and Health* Vol. 39 No. 4 Supplement. 2011; 37-43.

- 70 - Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* 2005; 79:4557–4567.
- 71- Thepparit C, Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67- kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J Virol* 2004; 78:12647–12656.
- 72- Clyde K, Kyle JL, Harris E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J Virol*. 2006; 80:11418–11431.
- 74- De La Guardia C, Leonart R. Progress in the Identification of Dengue Virus Entry/Fusion Inhibitors. *BioMed Research International*. 2014. Article ID 825039.
- 75- Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2003; 197(7):823–829.
- 76- Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Desprès P. Dendritic- cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell- derived dengue viruses. *EMBO Reports*. 2003; 4(7):723–728.
- 77- Hung J, Hsieh M, Young M, Kao C, King C, Chang W. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *Journal of Virology*. 2004; 78(1):378–388.
- 78- Chen Y, Wang S, King C. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human mono-cytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14- dependent mechanism. *Journal of Virology*. 1999; 73(4):2650–2657.
- 79- Miller JL, Wet BJM, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macro-phages. *PLoS Pathogens*. 2008; 4(3):article 17.
- 80- Reyes-del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *Journal of Virology*. 2005; 79(8):4557–4567.
- 81- Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Archives of Virology*. 2004; 149(5):915–927.
- 82- Thepparit C. Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *Journal of Virology*. 2004; 78(22):12647–12656.
- 83- Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host and Microbe*. 2012; 12(4):544–557.
- 84 -Zhang J, Wang J, Gao N, Chen Z, Tian Y, An J. Up-regulated expression of $\beta 3$ integrin induced by dengue virus serotype 2 infection associated with virus entry into human dermal microvascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 356(3):763–768.
- 85- Gao F, Duan X, Lu X, Liu Y, Zheng L, Ding Z, Li J. Novel binding between pre-membrane protein and claudin-1 is required for efficient dengue virus entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010; 391(1):952–957.

- 86- Che P, Tang H, Li Q. The interaction between claudin-1 and dengue viral prM/M protein for its entry. *Virology*. 2013; 446(1-2):303–313.
- 87- Jesús Martínez-Barragón J, Del Angel RM. Identification of a putative coreceptor on Vero cells that participates in dengue 4 virus infection. *Journal of Virology*. 2001; 75(17):7818–7827.
- 88- Krishnan MN, Sukumaran B, Pal U, Agaisse H, Murray JL, Hodge TM, Fikrig E. Rab5 is required for the cellular entry of dengue and West Nile viruses. *Journal of Virology*. 2007; 81:4881-4885.
- 89- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of General Virology*. 2008; 89:474-484.
- 90- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cellular Microbiology*. 2009; 11:1533-1549.
- 91- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Differential requirements in endocytic trafficking for penetration of dengue virus. *PloS One*. 2012; 7: e44835.
- 92- Mosso C, Galvan-Mendoza IJ, Ludert JE, Angel RM. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. *Virology*. 2008; 378:193-199.
- 93- Nayak V, Dessau M, Kucera K, Anthony K, Ledizt M, Modis M. Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. *Journal of Virology*. 2009; 83:4338-4344.
- 94- Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*. 1997; 71:8475–8481.
- 95- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*. 2008; 319:1834–1837.
- 96- Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 5^o ed. 2007.
- 97- World Health Organization. *Comprehensive Guidelines for Prevention and Control of Dengue and Dengue Haemorrhagic Fever*. Revised and expanded edition. World Health Organization; Regional Office for South-East Asia. 2011.
- 98- Nimmannitya S, Halstead SB, Cohen SN, Margiotta MR. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964.I. Observations on hospitalized patients with haemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1969.18:954-971.
- 99- World Health Organization. *Dengue Haemorrhagic Fever : Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. World Health Organization; Geneva. 1986.
- 100- World Health Organization. *Dengue Haemorrhagic Fever : Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. 2nd ed. World Health Organization. Geneva. 1997.
- 101- Sumarmo WH, Jahja E, Gubler DJ, Suharyono W, Sorensen K. Clinical observations on virologically confirmed fatal dengue infections in Jakarta. Indonesia. *Bulletion of the World Health Organization*. 1983; 61:693-701.
- 102- Balmaseda A, Hammond SN, Perez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, Idiaquez W, Harris E. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005; 73:1059-1062.

- 103- Bandyopadhyay S, Lum LC, Kroeger A. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Tropical Medicine and International Health*. 2006; 11:1238-1255.
- 104- Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dungue NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *The Lancet*. 2006; 368:170-173.
- 105- Rigau-Perez JG. Severe Dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infectious Diseases*. 2006; 6:297-302.
- 106- Siler JF, Hall MW, Hitchens AP. Dengue, its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. *Philippines Journal of Science*. 1926; 29:1-304.
- 107-Sabin AB. Dengue. In: Rivers, T.M. and Horsfall, FL(eds) *Viral and Rickettsial Infections of man*. Lippincott. 1959; Philadelphia, Pennsylvania. 361-373.
- 108- Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Vaughn DW, Ennis FA. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infections: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *American Journal of Epidemiology*. 2002; 156:40-51.
- 109- Sirivichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Jiwariyavej V, Chocejindachai W, Pengsaa K, Suvannadabba S, Dulyachai W, Letson GW, Sabchareon A. Dengue infection in children in Ratchaburi, Thailand: a cohort study. II. Clinical manifestations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012; 6 e 1520.
- 110- Phurong CH, Nhan NT, Kneen R, Thuy PT, Van Thin C, Nga NT, Thuy TT, Solomon T, Stepniwska K, Wills B. Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the World Health Organization classification system helpful? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004; 70:172-179.
- 111- Gregory CJ, Santiago LM, Arguello DF, Hunsperger E, Tomashek KM. Clinical and laboratory features that differentiate dengue from other febrile illnesses in an endemic area- Puerto Rico, 2007-2008. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010; 82:922-929.
- 112- Dietz V, Gubler DJ, Ortiz S, Kuno G, Casta-Velez A, Sather GE, Gomez I, Vergne E. The 1986 dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico: epidemiologic and clinical observations. *Puerto Rico Health Sciences Journal*. 1996; 15:201-210.
- 113- Lee LK, Gan VC, Lee VJ, Tan AS, Leo YS, Lye DC. Clinical relevance and discriminatory value of elevated liver anittransferase levels of dengue severity. *PloS Neglected Tropical Diseases*. 2012; 6 e 1676.
- 114- Kalayanarooj S. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *Journal of Infectious Diseases*. 1997; 176:313-321.
- 115- Martinez-Torres E, Polanco-Anaya AC, Pleites-Sandoval EB. Why and how children with dengue die? *Revista cubana de medicina tropical*. 2008; 60(1):40-47.
- 116- Seet RC, Quek AM, Lem EC. Post-infectious fatigue syndrome in dengue infection. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society of Clinical Virology*. 2007; 38:1-6.
- 117- Qiu FX, Gubler DJ, Liu JC, Chen QQ. Dengue in China: a clinical review. *Bulletin of the World Health Organization*. 1993; 71:349-359.

- 118- Srichaikul T, Punyagupta S, Kanchanapoom T, Chanokovat C, Likittanasombat K, Leelasiri A. Hemophagocytic syndrome in dengue hemorrhagic fever with severe multiorgan complications. *Journal of the Medical Association of Thailand*. 2008; 91:104–109.
- 119- Ramachandran B, Balasubramanian S, Abhishek N, Ravikumar KG, Ramanan AV. Profile of hemophagocytic lymphohistiocytosis in children in a tertiary care hospital in India. *Indian Pediatrics*. 2011; 48:31–35.
- 120- Kapdi M, Shah I. Dengue and haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2012; 44:708–709.
- 121- Tan LH, Lum LC, Omar SF, Kan FK. Hemophagocytosis in dengue: comprehensive report of six cases. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012; 55:79–82.
- 122- Srikiatkhachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, Nimmannitya S, Kalayanarooj S. Dengue – how best to classify it. *Clinical Infectious Diseases*. 2011; 53:563–567.
- 123- Kalayanarooj S, Nimmannitya S. *Guidelines for Dengue Hemorrhagic Fever Case Management*. Bangkok Medical Publisher, Bangkok. 2004.
- 124- Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: Gubler, D. and Kuno, G. (eds) *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International, Wallingford, UK. 1997; 313–334.
- 125- Guzman MG, Kouri G. Dengue diagnosis, advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases*. 2004; 8:69–80.
- 126- Buchy P, Peeling RW. Laboratory diagnosis and diagnostic test. In: TDR/OMS (ed.) *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. WHO Press, Geneva, Switzerland. 2009.
- 127- Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, Enria DA, Farrar J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Hunsperger E, Kliks S, Margolis HS, Nathanson CM, Nguyen VC, Rizzo N, Vazquez S, Yoksan S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Reviews. Microbiology*. 2010; 8:S30–38.
- 128- Gubler DJ, Sather G. Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever. *Proceedings of International Symposium of Yellow Fever and Dengue, Rio de Janeiro, Brazil*. 1988; 15–19.
- 129- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn, S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA, Nisalak A. Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *Journal of Infectious Diseases*. 2000; 181:2–9.
- 130- Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A. Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bulletin of the World Health Organization*. 1981; 59:623–630.
- 131- Sabin AB, Schelesinger MC. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*. 1945; 101:640–642.
- 132- Kimura R, Hotta S. Studies on dengue fever (V). Experiments on inoculation of dengue virus into mice. In: Hotta, S. (ed.) *Dengue and Related Arboviruses*. Yokosha Printing House, Kobe, Japan. 1995.

- 133- Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S. A plaque reduction test for dengue vírus neutralizing antibodies. *Journal of Immunology*. 1967; 99:285–290.
- 134- Rosen L, Gubler D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1974; 23:1153–1160.
- 135- Rosen L, Drouet MT, Deubel V. Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 61:720–724.
- 136- Sariol CA, Pelegrino JL, Martinez A, Arteaga E, Kouri G, Guzman MG. Detection and genetic relationship of dengue virus sequences in seventeen-year-old paraffin-embedded samples from Cuba. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 61:994–1000.
- 137- Wang HL, Lin KH, Yueh YY, Chow L, Wu YC, Chen HY, Sheu MM, Chen WJ. Efficient diagnosis of dengue infections using patients’ peripheral blood leukocytes and serum/plasma. *Intervirology*. 2000; 43:107–111.
- 138- Klungthong C, Gibbons RV, Thaisomboonsuk B, Nisalak A, Kalayanarooj S, Thirawuth V, Nutkumhang N, Mammen MP, Jarman RG. Dengue virus detection using whole blood for reverse transcriptase PCR and virus isolation. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45: 2480–2485.
- 139- Lanciotti RS., Calisher CH., Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30:545–551.
- 140- Hu D, Di B, Ding X, Wang Y, Chen Y, Pan Y, Wen K, Wang M, Che X. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Virology Journal*. 2011; 8:47.
- 141- Hu Z, Norström H, Nowotny N, Falk KI, Sandström G. Anchored pan dengue RT-PCR and fast Sanger sequencing for detection of dengue RNA in human serum. *Journal of Medical Virology*. 2010; 82:1701–1710.
- 142- Ito M, Takasaki T, Yamada K, Nerome R, Tajima S, Kurane I. Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42:5935–5937.
- 143- Sadon N, Delers A, Jarman RG, Klungthong C, Nisalak A, Gibbons RV, Vassilev V. A new quantitative RT-PCR method for sensitive detection of dengue virus in serum samples. *Journal of Virological Methods*. 2008; 153:1–6.
- 144- Hue KD, Tuan TV, Thi HT, Bich CT, Anh HH, Wills BA, Simmons CP. Validation of an internally controlled one-step real-time multiplex RT-PCR assay for the detection and quantitation of dengue virus RNA in plasma. *Journal of Virological Methods*. 2011; 177, 168–173.
- 145- Chao DY, Davis BS, Chang GJ. Development of multiplex real-time reverse transcriptase PCR assays for detecting eight medically important flaviviruses in mosquitoes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45:584–589.

- 146- Wu SJ, Lee EM, Putvatana R, Shurtliff RN, Porter KR, Suharyono W, Watts DM, King CC, Murphy GS, Hayes CG, Romano JW. Detection of dengue viral RNA using a nucleic acid sequence-based amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39:2794–2798.
- 147- Jittmittraphap A, Thammapalo S, Ratanasetyuth N, Wongba N, Mammen MP, Jampangern W. Rapid detection of dengue viral RNA in mosquitoes by nucleic acid-sequence based amplification (NASBA). *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2006; 37:1117–1124.
- 148- Parida MM, Horioka K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, Islam MA, Inoue S, Hosaka N, Morita K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop mediated isothermal amplification assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(6):2895–2903.
- 149- Libraty DH, Endy TP, Hough HS, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Chansiriwongs W, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL. Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. *Journal of Infectious Diseases*. 2002; 185:1213–1221.
- 150- Gubler DJ, Sather GE. Laboratory diagnosis of dengue and dengue haemorrhagic fever; proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue. 1988; Rio de Janeiro, Brasil.
- 151- Gubler DJ. Serological diagnosis of dengue fever/dengue haemorrhagic fever. *Dengue Bulletin*. 1996; 20:23.
- 152- Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1988; 38(1):172–180.
- 153- Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *Journal of Virological Methods*. 1991; 33:101–113.
- 154- Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Solomon T, Kalayanarooj S, Aaskov J, Dung NM, Devine PL. Comparison of PanBio dengue duo IgM and IgG capture ELISA and Venture Technologies dengue IgM and IgG dot blot. *Journal of Clinical Virology*. 2000; 16:135–144.
- 155- Falconar AK, Plata E, Romero-Vivas CM. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006; 13:1044–1051.
- 156- Valdez JJ, Ruiz D, Vazquez S, Calzada N, Guzman MG. Evaluación del sistema diagnóstico SD Dengue Duo para la detección de la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG anti-dengue. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2012; 64:27–34.
- 157- George FHM. Abordagem Clínica para casos de dengue. In: saúde D-Gd, editor. Lisboa: Ministério da saúde. 2008.
- 158- Alves MJ, Fernandes PL, Amaro F, Osório H, Luz T, Parreira P, Andrade G, Zê- Zé L, Zeller H. Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal. *Euro Surveill*. 2013;18(6):20398.
- 159- Gubler DJ. Cities spawn epidemic dengue viruses. *Nature Medicine*. 2004; 10:129–130.
- 160- Gubler DJ. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Foundation Symposium* 277, 3–16; discussion. 2006; 16–22, 71–73, 251–253.

- 161- Gubler DJ, Meltzer M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. 1999.
- 162 -Morrison AC, Zielinski-Gutierrez E, Scott TW, Rosenberg R. Defining challenges and proposing solutions for control of the virus vector *Aedes aegypti*. *PLoS Medicine* 5. 2008; e68.
- 163- Salud OPdl. Plan Continental de ampliación e intensificación del combate a *Aedes aegypti* 1. *Rev Panam Salud Publica*. 1998; 125.
- 164- Glória TM, Barreto ML, Guerra Z. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. *Informe Epidemiológico do SUS*. 1999; 8(4):5-33.
- 165- World Health Organization, Regional Office for Western Pacific. Guidelines for dengue surveillance and mosquito control. Manila: WHO-WPRO. 1995.
- 166- Pan American Health Organization. Dengue and dengue haemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Washington: WHO-PAHO. 1994.
- 167- Goh KT. Dengue—re-emerging infectious disease in Singapore. In: Goh KT. Ed. *Dengue in Singapore*. Singapore: Institute of Environmental Epidemiology, Ministry of Environment. 1998; 33–49.
- 168- Das PK, Sivagnaname N, Amalraj DD. A comparative study of a new insecticide-impregnated fabric trap for monitoring adult mosquito populations resting. Indoors. *Bull Entomol Res*. 1997; 87:397–403.
- 169- Reiter P, Amador MA, Colon N. Enhancement of CDC ovitrap with hay infusion for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *J Am Mosq Control Assoc*. 1991; 7:52–55.
- 170- Jansen CC, Beebe NW. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and infection*. 2010; 12(4):272-279.
- 171- Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. Ministério da Saúde. Brasília. 2009.
- 172- Brown A, Pal R. *Insecticide Resistance in Arthropods*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 1971.
- 173- Bang YH, Tonn RJ. Vector control and intervention. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, 1993; 139–163.
- 174- World Health Organization. Guidelines for drinking water quality [electronic resource]: incorporating 1st and 2nd addenda, vol. 1, Recommendations. 3rd ed. Geneva: WHO, 2010.
- 175- Sihuíncha M, Zamora-Perea E, Orellana-Rios W, Stancil JD, López-Sifuentes V, Vidal-Oré C, Devine GJ. Potential use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Perú. *J Med Entomol*. 2005; 42(4):620–630.
- 176- Chang. Six months of *Aedes aegypti* control with a novel controlled-release formulation of pyriproxyfen in water storage containers in Cambodia. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health*. 2008; 39(5):822–826.
- 177- Rozendaal JA. *Vector control: Methods for use by individual and communities*. Geneva: World Health Organization, 1997.
- 178- Giatropoulos A, Papachristos DP, Kimbaris A, Koliopoulos G, Polissiou MG, Emmanouel N, Michaelakis A. Evaluation of bioefficacy of three citrus essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. *Parasitology Research*. 2012; 111:2253–2263

- 179- Kovendan K, Murugan K, Vincent S. Evaluation of larvicidal activity of *Acalypha alnifolia* Klein ex Willd. (Euphorbiaceae) leaf extract against the malarial vector, *Anopheles stephensi*, dengue vector, *Aedes aegypti* and Bancroftian filariasis vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. 2012; 110:571–581.
- 180- Mahesh KP, Murugan K, Kovendan K, Panneerselvam C, Prasanna Kumar K, Amerasan D, Subramaniam J, Kalimuthu K, Nataraj T. Mosquitocidal activity of *Solanum xanthocarpum* fruit extract and copepod *Mesocyclops thermocyclopoides* for the control of dengue vector *Aedes aegypti*. *Parasitology Research*. 2012; 111:609–618.
- 181- Gubler DJ. *Aedes aegypti* mosquitoes and *Aedes aegypti*-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1989; 40:571–578.
- 182- Newton EAC, Reiter P. A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. *Am J Trop Med Hyg*. 1992; 47(b):709–20.
- 183- Reiter P, Gubler DJ. Surveillance and control of urban dengue vectors. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and dengue haemorrhagic fever*. Wallingford, Oxon: CAB International. 1997; 425–462.
- 184- Esu E, Lenhart A, Smith L, Horstick O. Effectiveness of peridomestic space spraying with insecticide on dengue transmission; systematic review. *Tropical Medicine & International Health*. 2010; 15(5):619-631.
- 185- Marten GG, Reid JW. Cyclopoid copepods. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2007; 23:65–92.
- 186- Lardeux FR. Biological control of culicidae with the copepod *mesocyclops aspericornis* and larvivorous fish (poeciliidae) in a village of French Polynesia. *Med Vet Entomol*. 1992; 6:9–15.
- 187- Kay BH, Hanh TTT, Le NH, Quy TM, Nam VS, Hang PVD, Yen NT, Hill PS, Vos T, Ryan PA. Sustainability and cost of a community-based strategy against *Aedes aegypti* in northern and central Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010; 82:822–830.
- 188- Scholte EJ, Knols BG, Samson RA, Takken W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*. 2004; 4(19).
- 189- Goettel MS, Eilenberg J, Glare T. Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. *Comprehensive Molecular Insect Science*. 2005; 6:361–405.
- 190- Garcia-Munguia AM, Garza-Hernández JA, Rebollar-Tellez EA, Rodríguez-Pérez MA, Reyes-Villanueva F. Transmission of *Beauveria bassiana* from male to female *Aedes aegypti* mosquitoes. *Parasites & Vectors*. 2011; 4(24).
- 191- Luz C, Tai MHH, Santos AH, Silva HH. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008; 103:214–215.
- 192- Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*. 2007; 17:553–596.
- 193- Strasser H, Vey A, Butt TM. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology*. 2000; 10:717–735.

- 194- Lacey LA. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2007; 23:133–163.
- 195- Armengol G, Hernandez J, Velez JG, Orduz S. Long-lasting effects of a *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* experimental tablet formulation for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) control. *Journal of Economic Entomology*. 2006; 99:1590–1595.
- 196- Novak RJ, Gubler DJ, Underwood D. Evaluation of slow-release formulations of temephos (Abate) and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1985; 1:449–453.
- 197- Ritchie SA, Rapley LP, Benjamin S. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) provides residual control of *Aedes aegypti* in small containers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010; 82:1053–1059.
- 198- Gratz NG. Emergency control of *Aedes aegypti* as a disease vector in urban areas. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 1991; 7:353–365.
- 199- Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*. 2008; 281:215–220.
- 200- Hoffmann AA, Turelli M. Cytoplasmic incompatibility in insects. In: O’Neill, S.L., Hoffmann, A.A. and Werren, J.H. (eds) *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford University Press, New York. 1997; 42–80.
- 201- Saridaki A, Bourtzis K. *Wolbachia* -induced reproductive parasitism and applications. *Entomol Hell*. 2009; 18:3-16.
- 202- Guruprasad NM, Jalali SK, Puttaraju HP. *Wolbachia* and its prospectives in biological control of insect pests and diseases vectors. *Appl Entomol Zool*. 2013; doi: 10.1007/s13355-013-0178-2.
- 203- Guruprasad NM, Mouton L, Puttaraju HP. Effect of antibiotic, temperature curing of *Wolbachia* and seasonal variation on the reproductive fitness of the *Uzifly* *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae). *Symbiosis*. 2011; 54(3): 151-158.
- 204- Comunicação Instituto Oswaldo Cruz. *Wolbachia pipientis*. Como a *Wolbachia* atua no controlo da dengue. 2015.
- 205- McNaughton D. Progress Report: Community Engagement. James Cook University, Cairns, Australia. 2010.
- 206 - Brelsfoard CL, Dobson SL. An update on the utility of *Wolbachia* for controlling insect vectors and disease transmission. *Asian Pac J Mol Biol Biotechnol*. 2011; 19(3):85-92.
- 207- Sinkins SP, O’Neill SL. *Wolbachia* as a Vehicle to Modify Insect Populations. CRC Press, Boca Raton, Florida. 2000. 25.
- 208- Moreia LA, Saig E, Turley AP, Ribeiro JM, O’Neill SL, McGraw EA. Human probing behavior of *Aedes aegypti* when infected with a life shortening of *Wolbachia*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(12):568.
- 209- Pinto SB, Mariconti M, Bazzocchi C, Bandi C, Sinkins SP. *Wolbachia* surface protein induces innate immune responses in mosquito cells. *BMC Microbiol* 2012; 12(1):S11.
- 210- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang YF, O’Neill SL. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*. 2009; 323:141–144.

- 211- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaeche I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, Turelli M, Lloyd AL, Ritchie SA, O’Neill SL, Hoffmann AA. A non-virulent *Wolbachia* infection blocks dengue transmission and rapidly invades *Aedes aegypti* mosquito populations. *Nature*. 2011; 476:450–453.
- 212- Iturbe-Ormaeche I, Walker T, O’Neill SL. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne diseases. *EMBO Reports*. 2011; 12:508–518.
- 213- Lobo NF, Clayton JR, Fraser MJ, Kafatos FC, Collins FH. High efficiency germ-line transformation of mosquitoes. *Nature Protocols*. 2006; 1:1312–1317.
- 214 -Phuc HK, Andreasen MH, Burton RS, Vass C, Epton MJ, Pape G, Fu G, Condon KC, Scaife S, Donnelly CA, Coleman PG, White-Cooper H, Alphey L, Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol*. 2007; 5(11).
- 215- Wilke AB, Gomes AC, Natal D, Marrelli MT. Control of vector populations using genetically modified mosquitoes. *Rev. Saude Publica*. 2009; 43(5):869-874.
- 216- Alphey L, Benedict M, Bellini R, Clark GG, Dame DA, Service MW, Dobson SL. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010; 10(3):295-311.
- 217- Horn C, Wimmer EA. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. *Nat. Biotechnol*. 2003; 21(1):64-70.
- 218- Tonelli FMP, Resende RR. Transgenia a serviço da qualidade de vida: combate à dengue. *Bio &Tecnologia, Biologia, Saúdeadmin_cms*. 2014; 1(10).
- 219- Thomas JS. Developing a dengue vaccine: progress and future challenges. *Antimicrobial Therapeutics Reviews*. 2014.
- 220- Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002; 2(1):33-42.
- 221- Halstead SB. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI. Hypotheses and discussion. *The Yale journal of biology and medicine*. 1970; 42(5):350-362.
- 222- Teo D, Ng L, Lam S. Is dengue a threat to the blood supply? *Transfusion Medicine*. 2009; 19(2):66-77.
- 223- Figueiredo LTM. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. *Medicina, Ribeirão Preto*. 1999; 32(1):15-20.
- 224- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *Journal of Infectious Diseases*. 1997; 176(2):322-330.
- 225- Schwartz LM, Halloran ME, Durbin AP, Jr Longini I. The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. *Vaccine* 33. 2015; 3293-3298.
- 226 - Guy B, Barrere B, Malinowski C, Savill M, Teysour R, Lang J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine*. 2011; 29:7229-7241.
- 227- Wilder-Smith A. A Dengue vaccines: dawning at last? *Lancet*. 2014; 14(6):6736.
- 228- Osorio JE, Huang CY-H, Kinney RM, Stinchcomb DT. Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53 based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine*. 2011; 29:7251-7269.

- 229- ClinicalTrials.gov. Safety and immunogenicity of diferente schedules of Takeda's tetravalente dengue vaccine candidate (TDV) in healthy participants. 2015.
- 230- Durbin AP, McArthur J, Marron JA, Blaney JE, Thumar B, Wanionek K. The live attenuated dengue serotype 1 vaccine Rden1Delta30 is safe and highly immunogenic in healthy adult volunteers. *Hum Vaccine*. 2006; 2:167-173.
- 231- ClinicalTrials.gov. Phase II trial to evaluate safety and immunogenicity of a dengue 1,2,3,4 (attenuated) vaccine. 2015.
- 232- ClinicalTrials.gov. Safety study of a vaccine (DENV-1 PIV) to prevent dengue disease. 2015.
- 233- ClinicalTrials.gov. TDENV PIC and LAV dengue prime-boost strategy. 2014.
- 234- Coller B-AG, Clements DE, Bett AJ, Sagar SL, Ter MJH. The development of recombinante subunit envelope-based vacines to protect against dengue virus induced disease. *Vaccine*. 2011; 29:7267-7275.
- 235- ClinicalTrials.gov. Study of a dengue vaccine (V180) in healthy adults (V180-001). 2015.
- 236- Beckett CG, Tjaden J, Burgess T, Danko JR, Tamminga C, Simmons M. Evaluation of prototype dengue-1 DNA vaccine in phase I clinical trial. *Vaccine*. 2011; 29:960-968.
- 237- ClinicalTrials.gov. Safety study of a dengue virus DNA vaccine. 2009.
- 238- Leo YS, Wilder-Smith A, Archuleta S, Shek LP, Chong CY, Leong HN. Immunogenicity and safety of recombinant tetravalent dengue vaccine (CYD-TDV) in individuals aged 2-45y: phase II randomized controlled trial in Singapore. *Hum Vaccines Immunother*. 2012; 8:1259-1271.
- 239- Sabchareon A, Wallace D, Siricichayakul C, Limkittikul K, Chanthavanich P, Suvannadabba S. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomized controlled phase IIb trial. *Lancet*. 2012; 380:1559-1567.
- 240- Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SRS, Ismail HIHM, Chotpiayasunondh T, Chua MN. Supplementary appendix to capeding. *Lancet*. 2014; 6736:S1-5.
- 241- Villar L, Dayan GH, Arredondo-Garcia JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C. Efficacy of a tetravalente dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med*. 2014.
- 242- ClinicalTrials.gov. Safety and immunogenicity study to assess DENVax, a live attenuated tetravalent vaccine for prevention of dengue fever. 2015.
- 243- ClinicalTrials.gov. Tetravalent chimeric dengue vaccine trial. 2013.
- 244- Osorio JE, Velez ID, Thomson C, Lopez L, Jimenez A, Haller AA. Safety and immunogenicity of a recombinante live attenuated tetravalente dengue vaccine (DENVax) in flavivírus –naive healthy adults in Colombia: a randomised placebo-controlled, phase I study. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14:830-838.
- 245- ClinicalTrials.gov. Study to investigating safety and immunogenicity of a tetravalente chimeric dengue vaccine in healthy volunteers between the ages of 1.5-45 years. 2015.
- 246- Durbin AP, Kirkpatrick BD, Pierce KK, Elwood D, Larsson CJ, Lindow JC. A single dose of any of four diferente live attenuated tetravalent dengue vacines is safe and immunogenic in flavivírus-naive adults: a randomized, double-blind clinical trial. *J Infect Dis*. 2011; 207:957-965.
- 247- Clinical Trials.gov. Evaluating the safety and imune response to two doses of a dengue vírus vaccine administered 12 months apart. 2014.

- 248- Clinical Trials.gov. A two-dose primary vaccination study of a tetravalente dengue virus purified inactivated vaccines vs placebo in healthy adults (in Puerto Rico). 2014.
- 249- Whalen RG. DNA vaccines for emerging infectious diseases: what if? *Emerging Infectious Diseases*. 1996; 2:168–175.
- 250- Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SRS, Ismail HIHM, Chotpiayasunondh T, Chua MN. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase III, randomized, observermasked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2014; 6736:1-8.
- 251- Phillipson DJ. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*. 2001; 56:237–243.
- 252- Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* 2004; 67:2141–2153.
- 253- Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005; 4:206–220.
- 254- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 2007; 70:461–477.
- 255- Baker DD, Chu M, Oza U, Rajgarhia V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat. Prod. Rep.* 2007; 24:1225–1244.
- 256- Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 2012; 75:311–355.
- 257- Cordell GA, Colvard MD. Natural products and traditional medicine: Turning on a paradigm. *J. Nat. Prod.* 2012; 75:514–525.
- 258- Dos Santos NP, Pinto AC. The forest is his pharmacy-the research of Brazilian plants to combat tropical diseases in the nineteenth century. *Rev. Virtual Quim.* 2012; 4:162–172.
- 259- Kudi AC, Myint SH. Antiviral activity of some Nigerian medicinal plants extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 1999; 68:289–294.
- 260- Kadir SLA, Yaakob H, Zulkifli RM. Potential anti-dengue medicinal plants: a review. *J Nat Med.* 2013; 67:677–689.
- 261- Jiang WL, Luo XL, Kuang SJ. Effects of *Alternanthera philoxeroides* Griseb against dengue virus in vitro. *Journal of First Military Medical University* 2005; 25(4):454–456.
- 262- Tang LIC, Ling APK, Koh RY, Chye SM, Voon KGL. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12(3).
- 263- Parida MM, Upadhyay C, Pandya G, Jana AM. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. *J Ethnopharmacol.* 2012; 79:273–278.
- 264- Kiat TS, Phippen R, Yusof R, Ibrahim H, Khalid N, Rahman NA. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006; 16:3337–3340.
- 265- Ahmad N, Fazal H, Ayaz M, Abbasi BH, Mohammad I, Fazal L. Dengue fever treatment with *Carica papaya* leaves extracts. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011; 1:330–333.
- 266- Klawikkan N, Nukoolkarn V, Jirakanjanakir N, Yoksan S, Wiwat C, Thirapanmethee K. Effect of Thai medicinal plant extracts against Dengue virus in vitro. *The Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2011; 38(1–2):13–18.

- 267- Hidari KIPJ, Takahashi N, Arihara M, Nagaoka M, Morita K, Suzuki T. Structure and anti-Dengue virus activity of sulfated polysaccharide from marine alga. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 376:91–95.
- 268- Talarico LB, Zibetti RGM, Nosedá MD, Duarte MER, Damonte EB, Faria PCS, Pujol CA. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against Dengue virus is dependent on virus serotype and host cells. *Antivir Res.* 2005; 66:103–110.
- 269- Pujol CA, Estevez JM, Carlucci MJ, Ciancia M, Cerezo AS, Damonte EB, Novel DL. -galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. *Antivir Chem Chemother.* 2002; 13(2):83–89.
- 270- Jain M, Ganju L, Katiyal A, Padwad Y, Mishra KP, Chanda S, Karan D, Yogendra KMS, Sawhney RC. Effect of *Hippophae rhamnoides* leaf extracts against Dengue virus infection in human blood-derived macrophages. *Phytomedicine.* 2008; 15:793–799.
- 271- Leardkamolkarn V, Srigulpanit W, Phurimsak C, Kumkate S, Himakoun L, Sripanidkulchai B. The inhibitory actions of *Houttuynia cordata* aqueous extract on Dengue virus and Dengue-infected cells. *J Food Biochem.* 2012; 26:86–92.
- 272- Ono L, Wollinger W, Rocco IM, Coimbra TLM, Gorin PAJ, Sierakowski MR. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antivir Res.* 2003; 60:201–208.
- 273- Srivastava M, Kapoor VP. Seed galactomannans: an overview. *Chem Biodivers.* 2005; 2:295–317.
- 274- Ocazonez RE, Meneses R, Torres FA, Stashenko E. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on Dengue virus replication in vitro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(3):304–309.
- 275- Meneses R, Ocazonez RE, Martínez JR, Stashenko EE. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 8(8).
- 276- Tischer PC, Talarico LB, Nosedá MD, Guimaraes SMPB, Damonte EB, Duarte MER. Chemical structure and anti-viral activity of carragenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. *Carbohydr Polym.* 2006; 63:459–465.
- 277- Mohan L, Amberkar MV, Kumari M. *Ocimum sanctum* Linn (Tulsi)—an overview. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2011; 7(1):51–53.
- 278- Chansang U, Zahiri NS, Bansiddhi J, Boonruad T, Thongsrirak P, Mingmuang J, Benjapong N, Mulla MS. Mosquito larvicidal activity of aqueous extracts of long pepper (*Piper retrofractum* Vahl) from Thailand. *J Vector Ecol.* 2005; 30(2):195–200.
- 279- Muliawan SY, Kit LS, Devi S, Hashim O, Yusof R. Inhibitory potential of *Quercus lusitanica* extract on Dengue virus type 2 replication. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006; 37(9):132–135.
- 280- Sanchez I, Garibay FG, Taboada J, Ruiz BH. Antiviral effect of flavonoids on the Dengue virus. *Phytother Res.* 2000; 14:89–92.
- 281- Reis SRIN, Valente LMM, Sampaio AL, Siani AC, Gandini M, Azeredo EL, D’Avila LA, Mazzei JL, Henriques MGM, Kubelka CF. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8:468–476.
- 282- Vijayan P, Ragu C, Ashok G, Dhanaraj SA, Surej B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. *Indian J Med Res.* 2004; 120:24–29.

- 283- Rees CR, Costin JM, Fink RC, McMichael M, Fontaine KA, Isern S, Michael SF. In vitro inhibition of dengue virus entry by p-sulfoxy-cinnamic acid and structurally related combinatorial chemistries. *Antivir Res.* 2008; 80:135–142.
- 284- Li Bo, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules.* 2008; 13:1671–1695.
- 285- Hidari KIPJ, Abe T, Suzuki T. Carbohydrate-related inhibitors of dengue virus entry. *Viruses.* 2013; 5:605–618.
- 286- Fitton JH. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Mar. Drugs.* 2011; 9:1731–1760.
- 287- Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs.* 2011; 9:196–223.
- 288- Talarico LB, Damonte EB. Interference in dengue virus adsorption and uncoating by carrageenans. *Virology.* 2007; 363:473–485.
- 289- Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, Abubakar S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virol. J.* 2011; 8:1–11.
- 290- Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, AbuBakar S. In vitro antiviral activity of fisetin, rutin and naringenin against Dengue virus type-2. *J. Med. Plants Res.* 2011; 5:5534–5539.
- 291- Allard PM, Dau ETH, Eydoux C, Guillemot JC, Dumontet V, Poullain C, Canard B, Guérite F, Litaudon M. Alkylated flavanones from the bark of *Cryptocarya. chartacea* as dengue virus NS5 polymerase inhibitors. *J. Nat. Prod.* 2011; 11:2446–2453.
- 292- Zandi K, Teoh BT, Sam SS, Wong PF, Mustafa MR, AbuBakar S. Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. *BMC Complement. Altern. Med.* 2012; 12:1–9.
- 293- Simões LR, Maciel GM, Brandão GC, Kroon EG, Castilho RO, Oliveira AB. Antiviral activity of *Distictella. elongate* (Vahl) Urb. (Bignoniaceae), a potentially useful source of anti-dengue drugs from the state of Minas Gerais, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* 2011; 53:602–607.
- 294- Low JSY, Chen KC, Wu KX, Ng MML, Chu JJH. Antiviral activity of emetine dihydrochloride against dengue virus infection. *J. Antivir. Antiretrovir.* 2009; 1:62–71.
- 295- Jia F, Zou G, Fan J, Yuan Z. Identification of palmatine as an inhibitor of West Nile virus. *Arch. Virol.* 2010; 155:1325–1329.
- 296- Whitby K, Pierson TC, Geiss B, Lane K, Engle M, Zhou Y, Doms RW, Diamond MS. Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo. *J. Virol.* 2005; 79:8698–8706.
- 297- Zhang XG, Mason PW, Dubovi EJ, Xu X, Bourne N, Renshaw RW, Block TM, Birk AV. Antiviral activity of geneticin against dengue virus. *Antivir. Res.* 2009; 83:21–27.
- 298- Allard PM, Leysen P, Martin MT, Bourjot M, Dumontet V, Eydoux C, Guillemot JC, Canard B, Poullain C, Guérite F. Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*. *Phytochemistry.* 2012; 84:160–168.
- 299- Brandão GC, Kroon EG, Souza DER, Filho JDS, Oliveira AB. Chemistry and antiviral activity of *Arrabidaea pulchra* (Bignoniaceae). *Molecules.* 2013; 18:9919–9932.
- 300- Laille M, Gerald F, Debitus C. In vitro antiviral activity on dengue virus of marine natural products. *Cell. Mol. Life Sci.* 1998; 54:167–170.

- 301- Laurent D, Baumann F, Benoit AG, Mortelecq A, Nitatpattana N, Desvignes I, Debitus C, Laille M, Gonzales JP, Chungue E. Structure-activity relationships of dengue antiviral polycyclic quinones. *Southeast. Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2005; 36:901–905.
- 302- Bourjot M, Leyssen P, Eydoux C, Guillemot JC, Canard B, Rasoanaivo P, Guérrite F, Litaudon M. Flacourtosides A.F.phenolic glycosides isolated from *Flacourtia. ramontchi*. *J. Nat. Prod.* 2012; 75:752–758.
- 303- Rahman NA, Hadinur B, Muliawan S, Rashid NN, Muhamad M, Yusof R. Studies on *Quercus lusitanica* extracts on DENV-2 replication. *Deng. Bull.* 2006; 30:260–269.
- 304- Zasloff M, Adams A.P, Beckerman B, Campbell A, Han Z, Luijten E, Meza I, Julander J, Mishra A, Qu W. Squalamine as a broad-spectrum systemic antiviral agent with therapeutic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108:15978–15983.
- 305- Crance JM, Scaramozzino N, Jouan A, Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: Antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antivir. Res.* 2003; 58:73–79.
- 306- Low JSY, Wu KX, Chen KC, Ng MML, Chu JJH. Narasin, a novel antiviral compound that blocks dengue virus protein expression. *Antivir. Ther.* 2011; 16:1203–1218.
- 307- Bourjot M, Leyssen P, Eydoux C, Guillemot JC, Canard B, Rasoanaivo P, Guérrite F, Litaudon M. Chemical constituents of *Anacolosia. pervilleana* and their antiviral activities. *Fitoterapia.* 2012; 83:1076–1080.
- 308- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J Nat Prod.* 2003; 66(7):1022–1037.
- 309- Garcia CC, Talarico L, Almeida N, Colombres S, Duschatsky C, Damonte EB. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytother Res.* 2003; 17:1073–1075.
- 310- Grzybowski A, Tiboni M, da Silva MAN, Chitolina RF, Passos M, Fontana JD. The combined action of phytolaryvacides for the control of dengue fever vector, *Aedes aegypti*. *Braz J Pharmacogn.* 2011; 22:549–557.
- 311- Choochote W, Tuetun B, Kanjanapothi D, Rattanachanpicai E, Chaitong U, Chaiwong P, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Riyong D, Pitasawat B. Potential of crude seed extract of celery, *Apium graveolens* L., against the mosquito *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol.* 2004; 29(2):340–346.
- 312- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med.* 1997; 3:866–871.
- 313- Hung SL, Lee PL, Chen HW, Chen LK, Kao C L, King CC. Analysis of the steps involved in Dengue virus entry into host cells. *Virology.* 1999; 257:156–167.
- 314- Alen MM, Schols D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *J. Trop. Med.* 2012; 628475.
- 315- Wang QY, Patel SJ, Vangrevelinghe E, Xu HY, Rao R., Jaber D, Schul W, Gu F, Heudi O, Ma NL, Poh MK, Phong WY, Keller TH, Jacoby E, Vasudevan SG. A small-molecule dengue virus entry inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53:1823–1831.
- 316- Lim SP, Wang QY, Noble CG, Chen YL, Dong H, Zou B, Yokokawa F, Nilar S, Smith P, Beer D, Lescar J, Shi PY. *Antiviral Research.* 2013; 100:500-519.

- 317- Poh MK, Yip A, Zhang S, Smit JM, Wilschut J, Priestle JP, Wenka MR, Schul W. A small molecule fusion inhibitor of dengue virus. *Antiviral Res.* 2009; 84:260–266.
- 318- Kampmann T, Yennamalli R, Campbell P, Stoermer MJ, Fairlie DP, Kobe B, Young PR. In silico screening of small molecule libraries using the dengue virus envelope E protein has identified compounds with antiviral activity against multiple flaviviruses. *Antiviral Res* 2009; 84:234–241.
- 319- Zhou Z., Khaliq M, Suk JE, Patkar C, Li L, Kuhn RJ, Post CB. Antiviral compounds discovered by virtual screening of small-molecule libraries against dengue virus E protein. *ACS Chem. Biol.* 2008; 3:765–775.
- 320- Schmidt AG, Lee K, Yang PL, Harrison SC. Small-molecule inhibitors of dengue-virus entry. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4):e1002627.
- 321- Costin JM, Jenwitheesuk E, Lok SM, Hunsperger E, Conrads KA, Fontaine KA, Rees CR, Rossmann MG, Isern S, Samudrala R, Michael. Structural optimization and de novo design of dengue virus entry inhibitory peptides. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(6):e721.
- 322- Nicholso CO, Costin JM, Rowe DK, Lin L, Jenwitheesuk E, Samudrala R, Isern S, Michael SF. Viral entry inhibitors block dengue antibody-dependent enhancement in vitro. *Antiviral Res.* 2011; 89:71–74.
- 323- Hrobowski YM, Garry RF, Michael SF. Peptide inhibitors of dengue virus and West Nile virus infectivity. *J. Virol.* 2005; 2:49.
- 324- Alhoot MA, Rathinam AK, Wang SM, Manikam R, Sekaran SD. Inhibition of dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides. *International Journal of Medical Sciences.* 2013; 10(6):719–729.
- 325- Kaptein SJ, De Burghgraeve T, Froeyen M, Pastorino B, Alen MM, Mondotte JA, Herdewijn P, Jacobs M, de Lamballerie X, Schols D, Gamarnik AV, Sztaricskai F, Neyts J. A derivate of the antibiotic doxorubicin is a selective inhibitor of dengue and yellow fever virus replication in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54:5269–5280.
- 326- De Burghgraeve T, Kaptein SJ, Ayala-Nunez NV, Mondotte JA, Pastorino B, Printsevskaya SS, de Lamballerie X, Jacob M, Preobrazhenskaya M, Gamarnik AV, Smit JM, Neyts J. An analogue of the antibiotic teicoplanin prevents flavivirus entry in vitro. *PLoS One.* 2012; 7:e37244.
- 327- Yang JM, Chen YF, Tu YY, Yen KR, Yang YL. Combinatorial computational approaches to identify tetracycline derivatives as flavivirus inhibitors. *PLoS ONE.* 2007; 2(5):e428.
- 328- Alen MMF, Burghgraeve T, Kaptein SJF, Balzarini J, Neyts J, D.Schols. Broad Antiviral activity of Carbohydrate binding agents against the four serotypes of dengue virus in monocyte derived dendritic cells. *PLoS ONE.* 2011; 6(6):e21658.
- 329- Lee E, Pavy M, Young N, Freeman C, Lobigs M. Antiviral effect of the heparin sulfate mimetic, PI-88, against dengue and encephalitic flaviviruses. *Antiviral Research.* 2006; 69(1):31–38.
- 330- Ichiyama K, Gopala Reddy SB, Zhang LF, Chin WX, Muschin T, Heinig L, Suzuki Y, Nanjundappa H, Yoshinaka Y, Ryo A, Nomura N, Ooi EE, Vasudevan SG, Yoshida T, Yamamoto N. Sulfated polysaccharide, curdlan sulfate, efficiently prevents entry/fusion and restricts antibody dependent enhancement of dengue virus infection in vitro: a possible candidate for clinical application. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2013; 7(4):e2188.
- 331- Pujol CA, Ray S, Ray B, Damonte EB. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2012; 51(4):412–416.

- 332- Vervaeke P, Alen M, Noppen S, Schols D, Oreste P, Liekens S. Sulfated escherichia coli K5 polysaccharide derivatives inhibit dengue virus infection of human microvascular endothelial cells by interacting with the viral envelope protein E domain III. *PLoS ONE*. 2013; 8(8):e74035.
- 333- Lin LT, Chen TY, Lin SC, Chung CY, Lin TC, Wang GH, Anderson R, Lin CC, Richardson CD. Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. *BMC Microbiology*. 2013; 13(1):187.
- 334- Kato D, Era S, Watanabe I, Arihara M, Sugiura N, Kimata K, Suzuki Y, Morita K, Hidari KI, Suzuki T. Antiviral activity of chondroitin sulphate E targeting dengue virus envelope protein. *Antiviral Research*. 2010; 88(2):236–243.
- 335- Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *Journal of Virology*. 2001; 75:7769–7773.
- 336- Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, Macagno A, Simonelli L, Quyen NT, Sukupolvi-Petty S, Navarro-Sanchez E, Young PR, De Silva AM, Rey FA, Varani L, Whitehead SS, Diamond MS, Harris E, Lanzavecchia A, Sallusto F. The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe*. 2010; 8:271–283.
- 337- De Alwis R, Beltramello M, Messer WB, Sukupolvi-Petty S, Wahala, WM, Kraus, A, Olivarez NP, Pham Q, Brien JD, Tsai WY, Wang WK, Halstead S, Kliks S, Diamond MS, Baric R, Lanzavecchia A, Sallusto F, De Silva AM. In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012; 5:e1188.
- 338- Costin J.M, Zaitseva E, Kahle KM, Nicholson CO, Rowe DK, Graham AS, Bazzone LE, Hogancamp G, Figueroa Sierra M, Fong RH, Yang ST, Lin L, Robinson JE, Doranz BJ, Chernomordik LV, Michael SF, Schieffelin JS, Isern S. Mechanistic study of broadly neutralizing human monoclonal antibodies against dengue virus that target the fusion loop. *Journal of Virology*. 2013; 87:52–66.
- 339- Byrd CM, Dai D, Grosenbach DW, Berhanu A, Jones KF, Cardwell KB, Schneider C, Wineinger KA, Page JM, Harver C, Stavale E, Tyavanagimatt S, Stone MA, Bartenschlager R, Scaturro P, Hraby DE, Jordan RA. Novel inhibitor of dengue virus replication that targets the capsid protein. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2013; 57:15–25.
- 340- Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. *J. Biol. Chem*. 2006; 281:8854–8863.
- 341- 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*. 2006; 87:2605–2614.
- 342- Grant D, Tan GK, Qing M, Ng JK, Yip A, Zou G, Xie X, Yuan Z, Schreiber MJ, Schul W, Shi PY, Alonso S. A single amino acid in nonstructural NS4B protein confers virulence to dengue virus in AG129 mice through enhancement of viral RNA synthesis. *Journal of Virology*. 2011; 85(15):7775-7787.
- 343- Xie X, Wang QY, Xu HY, Qing M, Kramer L, Yuan Z, Shi PY. Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein. *J. Virol*. 2011; 85:11183–11195.
- 344- Patkar CG, Larsen M, Owston M, Smith JL, Kuhn RJ. Identification of inhibitors of yellow fever virus replication using a replicon-based high-throughput assay. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009; 53:4103–4114.

- 345- Zou G, Puig-Basagoiti F, Zhang B, Qing M, Chen L, Pankiewicz K, Felczak K, Yuan Z, Shi P. A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. *Virology*. 2008; 384:242–252.
- 346- Chanprapaph S, Saparpakorn P, Sangma C, Niyomrattanakit P, Hannongbua S, Angsuthanasombat C, Katzenmeier G. Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serine protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavage sites. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 330:1237–1246.
- 347- De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009; 33:307–320.
- 348- Wyles DL. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. *J. Infect. Dis*. 2013; 1:S33–S39.
- 349- Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J. Hepatol*. 2011; 55:192–206.
- 350- Li J, Lim SP, Beer D, Patel V, Wen D, Tumanut C, Tully DC, Williams JA, Jiricek J, Priestle JP, Harris JL, Vasudevan SG. Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. *J. Biol. Chem*. 2005; 280:28766–28774.
- 351- Yin Z, Patel SJ, Wang WL, Chan WL, Ranga Rao KR, Wang G, Ngew X, Patel V, Beer D, Knox J, Ma NL, Ehrhardt C, Lim SP, Vasudevan SG, Keller TH. Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2006; 16:40–43.
- 352- Yang CC, Hsieh YC, Lee SJ, Wu SH, Liao CL, Tsao CH, Chao YS, Chern JH, Wu CP, Yueh A. Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2011; 55:229–238.
- 353- Xu T, Sampath A, Chao A, Wen D, Nanao M, Chene P, Vasudevan S, Lescar J. Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. *J. Virol*. 2005; 79:10278–10288.
- 354- Luo D, Xu T, Watson RP, Scherer-Becker D, Sampath A, Jahnke W, Yeong SS, Wang CH, Lim SP, Strongin A, Vasudevan SG, Lescar J. Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. *EMBO J*. 2008b; 27:3209–3219.
- 355- Wengler G. The NS3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology*. 1993; 197:265–273.
- 356- Nitsche C, Behnam MA, Steuer C, Klein CD. Retro peptide-hybrids as selective inhibitors of the Dengue virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Res*. 2012; 94:72–79.
- 357- Xu S, Li H, Shao X, Fan C, Ericksen B, Liu J, Chi C, Wang C. Critical effect of peptide cyclization on the potency of peptide inhibitors against Dengue virus NS2B-NS3 protease. *J. Med. Chem*. 2012; 55:6881–6887.
- 358- Steuer C, Gege C, Fischl W, Heinonen KH, Bartenschlager R, Klein CD. Synthesis and biological evaluation of alpha-ketoamides as inhibitors of the Dengue virus protease with antiviral activity in cell-culture. *Bioorg. Med. Chem*. 2011; 19:4067–4074.
- 359- Bodenreider C, Beer D, Keller TH, Sonntag S, Wen D, Yap L, Yau YH, Shochat SG, Huang D, Zhou T, Caffisch A, Su XC, Ozawa K, Otting G, Vasudevan SG, Lescar J, Lim SP. A fluorescence quenching assay to discriminate between specific and non specific inhibitors of dengue virus protease. *Anal. Biochem*. 2009; 395:195–204.

- 360- Cregar-Hernandez L, Jiao GS, Johnson AT, Lehrer AT, Wong TA, Margosiak SA. Small molecule pan-dengue and West Nile virus NS3 protease inhibitors. *Antiviral Chem. Chemother.* 2011; 21:209–217.
- 361- Mueller NH, Pattabiraman N, Ansarah-Sobrinho C, Viswanathan P, Pierson TC, Padmanabhan R. Identification and biochemical characterization of small-molecule inhibitors of West Nile virus serine protease by a high-throughput screen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2008; 52:3385–3393.
- 362- Tomlinson SM, Malmstrom RD, Russo A, Mueller N, Pang YP, Watowich SJ. Structure-based discovery of dengue virus protease inhibitors. *Antiviral Res.* 2009; 82:110–114.
- 363- Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2009; 9:327–343.
- 364- Tomlinson SM, Watowich SJ. Use of parallel validation high-throughput screens to reduce false positives and identify novel dengue NS2B-NS3 protease inhibitors. *Antiviral Res.* 2012; 93:245–252.
- 365- Aravapalli S, Lai H, Teramoto T, Alliston KR, Lushington GH, Ferguson EL, Padmanabhan R, Groutas WC. Inhibitors of Dengue virus and West Nile virus proteases based on the aminobenzamide scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* 2012; 20:4140–4148.
- 366- Deng J, Li N, Liu H, Zuo Z, Liew OW, Xu W, Chen G, Tong X, Tang W, Zhu J, Zuo J, Jiang H, Yang CG, Li J, Zhu W. Discovery of novel small molecule inhibitors of dengue viral NS2B-NS3 protease using virtual screening and scaffold hopping. *J. Med. Chem.* 2012; 55:6278–6293.
- 367- Lai H, Dou D, Aravapalli S, Teramoto T, Lushington GH, Mwanja TM, Alliston KR, Eichhorn DM, Padmanabhan R, Groutas WC. Design, synthesis and characterization of novel 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one and 1,3,4-oxadiazole hybrid derivatives: potent inhibitors of Dengue and West Nile virus NS2B/NS3 proteases. *Bioorg. Med. Chem.* 2013; 21:102–113.
- 368- Lai H, Sridhar Prasad G, Padmanabhan R. Characterization of 8-hydroxyquinoline derivatives containing aminobenzothiazole as inhibitors of dengue virus type 2 protease in vitro. *Antiviral Res.* 2013; 97:74–98.
- 369- Mastrangelo E, Pezzullo M, De Burghgraeve T, Kaptein S, Pastorino B, Dallmeier K, de Lamballerie X, Neyts J, Hanson AM, Frick DN, Bolognesi M, Milani M. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67:1884–1894.
- 370- Byrd CM, Grosenbach DW, Berhanu A, Dai D, Jones KF, Cardwell KB, Schneider C, Yang G, Tyavanagimatt S, Harver C, Wineinger KA, Page J, Stavale E, Stone MA, Fuller KP, Lovejoy C, Leeds JM, Hruby DE, Jordan R. Novel benzoxazole inhibitor of dengue virus replication that targets the NS3 helicase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013; 57:1902–1912.
- 371- Egloff MP, Benarroch D, Selisko B, Romette JL, Canard B. An RNA cap (nucleoside-2'-O-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* 2002; 21:2757–2768.
- 372- Ray D, Shah A, Tilgner M, Guo Y, Zhao Y, Dong H, Deas T, Zhou Y, Li H, Shi PY. West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. *J. Virol.* 2006; 80:8362–8370.

- 373- Dong H, Chang DC, Hua MH, Lim SP, Chionh YH, Hia F, Lee YH, Kukkaro P, Lok SM, Dedon PC, Shi PY. 2'-O methylation of internal adenosine by flavivirus NS5 methyltransferase. *PLoS Pathog.* 2012; 8:e1002642.
- 374- Noble CG, Shi PY. Structural biology of dengue virus enzymes: towards rational design of therapeutics. *Antiviral Res.* 2012; 96:115–126.
- 375- Kroschewski H, Lim SP, Butcher RE, Yap TL, Lescar J, Wright PJ, Vasudevan SG, Davidson AD. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS5 methyltransferase domain. *Journal of Biological Chemistry.* 2008; 283:19410–19421.
- 376- Zhou Y, Ray D, Zhao Y, Dong H, Ren S, Li Z, Guo Y, Bernard K, Shi P.-Y, Li H. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. *J. Virol.* 2007; 81:3891–3903.
- 377- Cihlar T, Ray AS. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine. *Antiviral Res.* 2010; 85:39–58.
- 378- De Clercq E. A 40-year journey in search of selective antiviral chemotherapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011; 51:1–24.
- 379- Stein DS, Moore KH. Phosphorylation of nucleoside analog antiretrovirals: a review for clinicians. *Pharmacotherapy.* 2001; 21:11–34.
- 380- Chen YL, Yin Z, Duraiswamy J, Schul W, Lim CC, Liu B, Xu HY, Qing M, Yip A, Wang G, Chan WL, Tan HP, Lo M, Liung S, Kondreddi RR, Rao R, Gu H, He H, Keller TH, Shi PY. Inhibition of dengue virus RNA synthesis by an adenosine nucleoside. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54:2932–2939.
- 381- Yin Z, Chen YL, Schul W, Wang QY, Gu F, Duraiswamy J, Kondreddi RR, Niyomrattanakit P, Lakshminarayana SB, Goh A, Xu HY, Liu W, Liu B, Lim JY, Ng CY, Qing M, Lim CC, Yip A, Wang G, Chan WL, Tan HP, Lin K, Zhang B, Zou G, Bernard KA, Garrett C, Beltz K, Dong M, Weaver M, He H, Pichota A, Dartois V, Keller TH, Shi PY. An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106:20435–20439.
- 382- Yin Z, Chen YL, Kondreddi RR, Chan WL, Wang G, Ng RH, Lim JY, Lee WY, Jeyaraj DA, Niyomrattanakit P, Wen D, Chao A, Glickman JF, Voshol H, Mueller D, Spanka C, Dressler S, Nilar S, Vasudevan SG, Shi PY, Keller TH. N-sulfonylanthranilic acid derivatives as allosteric inhibitors of dengue viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Chem.* 2009; 52:7934–7937.
- 383- Nelson DR, Zeuzem S, Andreone P, Ferenci P, Herring R, Jensen DM, Marcellin P, Pockros PJ, Rodriguez-Torres M, Rossaro L, Rustgi VK, Sepe T, Sulkowski M, Thomason IR, Yoshida EM, Chan A, Hill G. Balapiravir plus peginterferon alfa-2a (40KD)/ribavirin in a randomized trial of hepatitis C genotype 1 patients. *Ann. Hepatol.* 2012; 11:15–31.
- 384- Nguyen NM, Tran CN, Phung LK, Duong KT, Huynh Hle A, Farrar J, Nguyen QT, Tran HT, Nguyen CV, Merson L, Hoang LT, Hibberd ML, Aw PP, Wilm A, Nagarajan N, Nguyen DT, Pham MP, Nguyen TT, Javanbakht H, Klumpp K, Hammond J, Petric R, Wolbers M, Nguyen CT, Simmons CP. A randomized, double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. *J. Infect. Dis.* 2013; 207:1442–1450.
- 385- Luzhkov VB, Selisko B, Nordqvist A, Peyrane F, Decroly E, Alvarez K, Karlen A, Canard B, Qvist J. Virtual screening and bioassay study of novel inhibitors for dengue virus mRNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 2007; 15:7795–7802.

- 386- Milani M, Mastrangelo E, Bollati M, Selisko B, Decroly E, Bouvet M, Canard B, Bolognesi M. Flaviviral methyltransferase/RNA interaction: structural basis for enzyme inhibition. *Antiviral Research*. 2009; 83:28–34.
- 387- Podvinec M, Lim SP, Schmidt T, Scarsi M, Wen D, Sonntag LS, Sanschagrin P, Shenkin PS, Schwede T. Novel inhibitors of dengue virus methyltransferase: discovery by in vitro-driven virtual screening on a desktop computer grid. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 53:1483–1495.
- 388- Selisko B, Peyrane FF, Canard B, Alvarez K; Decroly E. Biochemical characterization of the (nucleoside-2'-O)-methyltransferase activity of dengue virus protein NS5 using purified capped RNA oligonucleotides (7Me)GpppAC(n) and GpppAC(n). *Journal of General Virology*. 2010; 91:112–121.
- 389- Lim SP, Sonntag LS, Noble C, Nilar SH, Ng RH, Zou G, Monaghan P, Chung KY, Dong H, Liu B, Bodenreider C, Lee G, Ding M, Chan WL, Wang G, Jian YL, Chao AT, Lescar J, Yin Z, Vedananda TR, Keller TH, Shi PY. Small molecule inhibitors that selectively block dengue virus methyltransferase. *J. Biol. Chem*. 2011; 286:6233–6240.
- 390- Latour DR, Jekle A, Javanbakht H, Henningsen R, Gee P, Lee I, Tran P, Ren S, Kutach AK, Harris SF, Wang SM, Lok SJ, Shaw D, Li J, Heilek G, Klumpp K, Swinney DC, Deval J. Biochemical characterization of the inhibition of the dengue virus RNA polymerase by β -D-2'-ethynyl-7-deaza-adenosine triphosphate. *Antiviral Research*. 2010; 87:213–222.
- 391- McDowell M, Gonzales SR, Kumarapperuma SC, Jeselnik M, Arterburn JB, Hanley KA. A novel nucleoside analog, 1- β -D-ribofuranosyl-3-ethynyl[1,2,4]triazole (ETAR), exhibits efficacy against a broad range of flaviviruses in vitro. *Antiviral Research*. 2010; 87:78–80.
- 392- Wu R, Smidansky ED, Oh HS, Takhampunya R, Padmanabhan R, Cameron CE, Peterson BR. Synthesis of a 6-methyl-7-deaza analogue of adenosine that potently inhibits replication of polio and dengue viruses. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010; 53:7958–7966.
- 393- Niyomrattanakit P, Abas SN, Lim CC, Beer D, Shi PY, Chen YL. A fluorescence-based alkaline phosphatase-coupled polymerase assay for identification of inhibitors of dengue virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biomol. Screen*. 2010; 16:201–210.
- 394- Niyomrattanakit P, Chen YL, Dong H, Yin Z, Qing M, Glickman JF, Lin K, Mueller D, Voshol H, Lim JY, Nilar S, Keller TH, Shi PY. Inhibition of dengue virus polymerase by blocking of the RNA tunnel. *J. Virol*. 2010; 84:5678–5686.
- 395- Qing M, Zou G, Wang QY, Xu HY, Dong H, Yuan Z, Shi PY. Characterization of dengue virus resistance to brequinar in cell culture. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 54:3686–3695.
- 396- Noble CG, Lim SP, Chen YL, Liew CW, Yap L, Lescar J, Shi PY. Conformational flexibility of the Dengue virus RNA-dependent RNA polymerase revealed by a complex with an inhibitor. *J. Virol*. 2013; 87:5291–5295.
- 397- Blas-Garcia A, Esplugues JV, Apostolova N, Twenty years of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors: time to reevaluate their toxicity. *Curr. Med. Chem*. 2011; 18:2186–2195.
- 398- Sofia MJ, Chang W, Furman PA, Mosley RT, Ross BS. Nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA-polymerase. *J. Med. Chem*. 2012; 55:2481–2531.
- 399- Pockros PJ. Non-nucleoside analogue polymerase inhibitors in development. *Clin. Liver Dis*. 2013; 17:123–128.

- 400- Schwegmann A, Brombacher F. Host-directed drug targeting of factors hijacked by pathogens. *Sci. Signaling*. 2008; 1: re8.
- 401- Wang QY, Kondreddi RR, Xie X, Rao R, Nilar S, Xu HY, Qing M, Chang D, Dong H, Yokokawa F, Lakshminarayana SB, Goh A, Schul W, Kramer L, Keller TH, Shi PY. A translation inhibitor that suppresses dengue virus in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2011; 55:4072–4080.
- 402- Liang PH, Cheng WC, Lee YL, Yu HP, Wu YT, Lin YL, Wong CH. Novel five-membered iminocyclitol derivatives as selective and potent glycosidase inhibitors: new structures for antivirals and osteoarthritis. *ChemBioChem*. 2006; 7:165–173.
- 403- Takhampunya R, Ubol S, Houng HS, Cameron CE, Padmanabhan R. Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. *Journal of General Virology*. 2006; 87:1947–1952.
- 404- Chu JJ, Yang PL. c-Src protein kinase inhibitors block assembly and maturation of dengue virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 2007; 104:3520–3525.
- 405- Schul W, Liu W, Xu HY, Flamand M, Vasudevan SG. A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs. *Journal of Infectious Diseases*. 2007; 195:665–674.
- 406- Chang J, Wang L, Ma D, Qu X, Guo H, Xu X, Mason PM, Bourne N, Moriarty R, Gu B, Guo JT, Block TM. Novel imino sugar derivatives demonstrate potent antiviral activity against flaviviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009; 53:1501–1508.
- 407- Nair V, Chi G, Shu Q, Julander J, Smee DF. A heterocyclic molecule with significant activity against dengue virus. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2009; 19:1425–1427.
- 408- Chang J, Schul W, Butters TD, Yip A, Liu B, Goh A, Lakshminarayana SB, Alonzi D, Reinkensmeier G, Pan X, Qu X, Weidner JM, Wang L, Yu W, Borune N, Kinch MA, Rayahin JE, Moriarty R, Xu X, Shi PY, Guo, JT, Block TM. Combination of α -glucosidase inhibitor and ribavirin for the treatment of dengue virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*. 2011; 89:26–34.
- 409- Wang QY, Bushell S, Qing M, Xu HY, Bonavia A, Nunes S, Zhou J, Poh MK, Florez de Sessions P, Niyomrattanakit P, Dong H, Hoffmaster K, Goh A, Nilar S, Schul W, Jones S, Kramer L, Compton T, Shi PY. Inhibition of dengue virus through suppression of host pyrimidine biosynthesis. *J. Virol*. 2011; 85:6548–6556.
- 410- Rathore AP, Paradkar PN, Watanabe S, Tan KH, Sung C, Connolly JE, Low J, Ooi EE, Vasudevan SG. Celgosivir treatment misfolds dengue virus NS1 protein, induces cellular pro-survival genes and protects against lethal challenge mouse model. *Antiviral Res*. 2011; 92:453–460.
- 411- Poh MK, Shui G, Xie X, Shi PY, Wenk MR, Gu F. U18666A, an intra-cellular cholesterol transport inhibitor, inhibits dengue virus entry and replication. *Antiviral Research*. 2012; 93:191–198.
- 412- Soto-Acosta R, Bautista-Carbajal P, Syed GH, Siddiqui A, Del Angel RM. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) inhibits replication and viral morphogenesis of dengue virus. *Antiviral Research*. 2014; 109:132–140.
- 413- van Gorp EC, Suharti C, Mairuhu AT, Dolmans WM, van Der Ven J, Demacker PN, van Der Meer JW. Changes in the plasma lipid profile as a potential predictor of clinical outcome in dengue hemorrhagic fever. *Clin. Infect. Dis*. 2002; 34:1150–1153.
- 414- Villar-Centeno LA, Díaz-Quijano FA, Martínez-Vega RA. Biochemical alterations as markers of dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2008; 78:370–374.

- 415- Hettkamp H, Legler G, & Bause E. Purification by affinity chromatography of glucosidase I, an endoplasmic reticulum hydrolase involved in the processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Eur J Biochem.* 1984; 142:85–90.
- 416- Helenius A. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 1994; 5:253–265.
- 417- Durantel D. Celgosivir, an alpha-glucosidase I inhibitor for the potential treatment of HCV infection. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2009; 10:860–870.
- 418- Hussin AR, Buckle MJ, Ammar YA, Mohammadjavad P, Shatrah O, Noorsaadah AR, Rohana Y. Study the antiviral activity of some derivatives of tetracycline and non-steroid anti inflammatory drugs towards dengue virus. *Tropical Biomedicine.* 2013; 30(4):1–10.
- 419- Nitsche C, Schreier VN, Behnam MAM, Kumar A, Bartenschlager R, Klein CD. Thiazolidinone-Peptide Hybrids as Dengue Virus Protease Inhibitors with Antiviral Activity in Cell Culture. *J. Med. Chem.* 2013; 56:8389–8403.
- 420- Boonyasuppayakorn S, Reichert ED, Manzano M, Nagarajan K, Padmanabhan R. Amodiaquine, an antimalarial drug, inhibits dengue virus type 2 replication and infectivity. *Antiviral Research.* 2014; 106:125–134.
- 421- Klumpp V, Leveque S, Le Pogam H, Ma W, Jiang H, Kang C, Granycome M, Singer C, Laxton JQ, Hang K, Sarma DB, Smith D, Heindl CJ, Hobbs JH, Merrett J, Symons N, Cammack JA, Martin R, Devos I. The novel nucleoside analog R1479 (4'-azidocytidine) is a potent inhibitor of NS5B-dependent RNA synthesis and hepatitis C virus replication in cell culture. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:3793–3799.
- 422- Klumpp K. Discovery and clinical evaluation of the nucleoside analog balapiravir (R1626) for the treatment of HCV infection. In: Kazmierski W, ed. *Antiviral drugs: from basic discovery through clinical trials* hoboken. NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2011.
- 423- Yap TL, Xu T, Chen YL, Malet H, Egloff MP, Canard B, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J. Virol.* 2007; 81:4753–65.
- 424- Beesetti H, Khanna N, Swaminathan S. Drugs for dengue: a patent review (2010-2014). *Expert Opin. Ther. Patents.* 2014; 24(11):1171-1184.
- 425 Low JG, Sung C, Wijaya L, Wei Y, Rathore APS, Watanabe S, Tan BH, Toh L, Chua LT, Hou Y, Chow A, Howe S, Chan WK, Tan KH, Chung JS, Cherng BP, Lye DC, Tambayah PA, Ching Ng L, Connolly J, Hibberd ML, Leo YS, Cheung YB, Ooi EE, Vasudevan SG. Efficacy and safety of celgosivir in patients with dengue fever (CELADEN): a phase 1b, randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(8):706-715.
- 426- Tricou V, Minh NN, Van TP, Lee SJ, Farrar J, Wills B, Tran HT, Simmons CP. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(8):e785.
- 427- Tam DT, Ngoc TV, Tien NT, Kieu NT, Thuy TT, Thanh LT, Tam CT, Truong NT, Dung NT, Qui PT, Hien TT, Farrar JJ, Simmons CP, Wolbers M, Wills BA. Effects of short-course oral corticosteroid therapy in early dengue infection in Vietnamese patients: a randomized, placebo-controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 55(9):1216-1224.
- 428- Bambeke FV, Michot JM, Eldere JV, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005; 11:256-280.
- 429- Ahmed A, Daneshtalab M. Nonclassical Biological Activities of Quinolone Derivatives *J. Pharm Pharmaceut Sci.* 2011; 15(1):52 -72.

- 430- Dalhoff A. Antiviral, antifungal, and antiparasitic activities of fluoroquinolones optimized for treatment of bacterial infections: a puzzling paradox or a logical consequence of their mode of action? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34:661–668.
- 431- Bolon MK. The Newer Fluoroquinolones. *Med Clin N Am.* 2011; 95:793–817.
- 432- Andriole VT. The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clinical Infectious Diseases.* 2005; 41:s113-119.
- 433- Andriole VT. The quinolones: prospects. In: Andriole VT, ed. *The quinolones.* 3rd ed. San Diego: Academic Press.2000; 477–495.
- 434- Brighty KE, Gootz TD. Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. In: Andriole VT, ed. *The quinolones.* 3rd ed. San Diego: Academic Press. 2000; 33–97.
- 435- Domagala JM. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother.* 1994; 33:685–706.
- 436- Zhao X, Xu C, Domagala JM, Drlica K. DNA topoisomerase targets of the fluoroquinolones: a strategy for avoiding bacterial resistance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:13991–13996.
- 437-Patrick GL. *An Introduction to Medical Chemistry . 3ª Ed.* Oxford. 2005; 16:428-431.
- 438- Andriole VT. The future of the quinolones. *Drugs.* 1999; 58(2):1–5.
- 439- Domagala JM, Hagen SE. Structure–activity relationships of the quinolone antibacterials in the new millenium: some things change and some do not. In: Hooper DC, Rubinstein E, eds. *Quinolone antimicrobial agents.* Washington, DC: ASM Press. 2003; 3–18.
- 440- Scheld WM. Maintaining fluoroquinolone class efficacy: review of influencing factors. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(1):1–9.
- 441- Wiles JA, Wang Q, Lucien E, Hashimoto A, Song Y, Cheng J, Marlor CW, Ou Y, Podos SD, Thanassi J, Thoma CL, Deshpande M, Pucci MJ, Bradbury BJ. Isothiazoloquinolones containing functionalized aromatic hydrocarbons at the 7-position: Synthesis and in vitro activity of a series of potent antibacterial agents with diminished cytotoxicity in human cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2006; 16:1272–1276.
- 442- Khan I, Siddiqui S, Rehmani S, Kazmi SU, Ali SH. Fluoroquinolones inhibit HCV by targeting its helicase. *Antiviral Therapy.* 2012; 17:467-476.
- 443- Kimura T, Katsube T. Aminoquinoline derivatives as anti-HIV agents. *European patente.* 1993; 572259.
- 444- Bender W, Roeben W, Paesens A, Bartel S. WO9602532, Preparation of 7-piperazinyl-1,4-dihydro-4-oxo-1-[4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl-methyl)phenyl] quinoline-3-carboxylic acids as virucides. *Ger. Offen.* 1996; 4425660-19960125.
- 445- Hartline CB, Harden EA, William-Aziz SL, Kushner NL, Brideau RJ, Kerner ER. Inhibition of herpesvirus replication by a series of 4-oxo-dihydroquinolines with viral polimerase activity. *Antiviral Research.* 2005; 65:97-105.
- 446- Kumar DV, Rai R, Brameld KA, Somoza JR, Rajagopalan R, Janc JW, Xia YM, Tony TL, Shaghafi MB, Hu H, Lehoux I, To N, Young WB, Green MJ. Quinolones as HCV NS5B polymerase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21. 2011; 82–87.
- 447- Horta PC, Henriques MSC, Kuş N, Paixão JA, O’Neill PM, Cristiano MLS, Fausto R. Synthesis, structural and conformational analysis, and IR spectra of ethyl 4-chloro-7-iodoquinoline-3-carboxylate. *Tetrahedron.* 2015; 71(40):7583-7592.
- 448- Gould RG, Jacobs WAJ. *Am. Chem. Soc.* 1939; 61, 2890-2895.

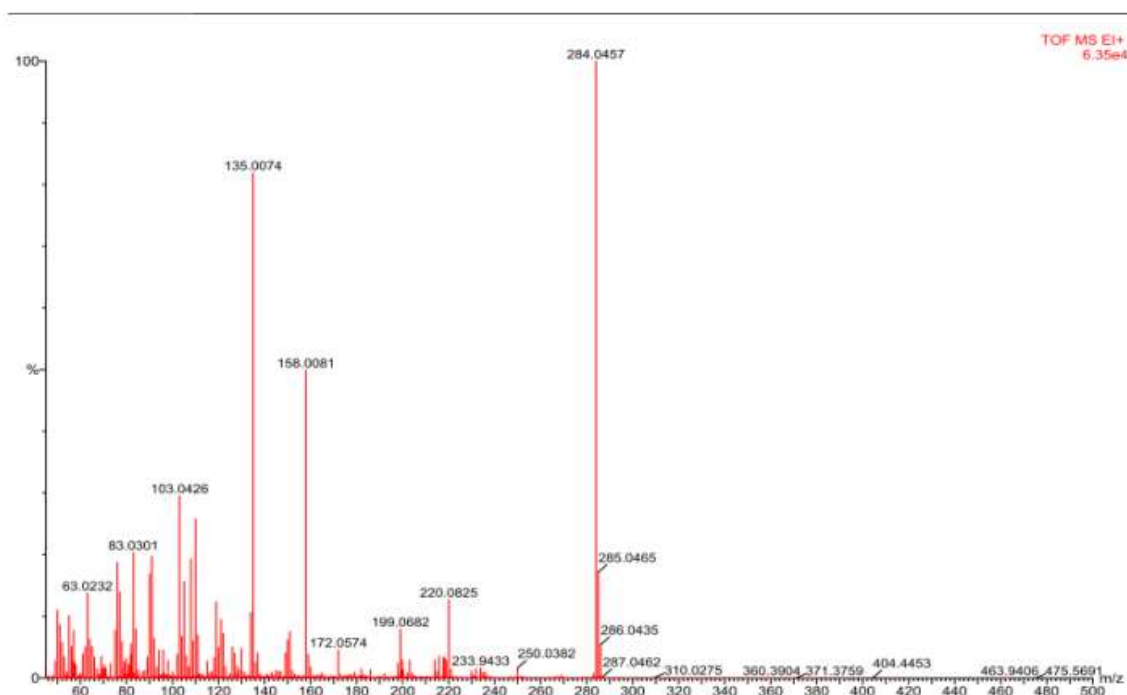
449- Brigas AF, Fonseca CSC, Johnstone RAH. Preparation of 3-chloro-1,2-benzisothiazole 1,1-dioxide (pseudo-saccharyl chloride). *J. Chem. Research (S)*. 2002; 299–300.

450- Correia S. *Estudos solvolíticos em éteres aril-heteroaromáticos*. Relatório de estágio do Curso de Licenciatura em Química, Universidade do Algarve. 2002.

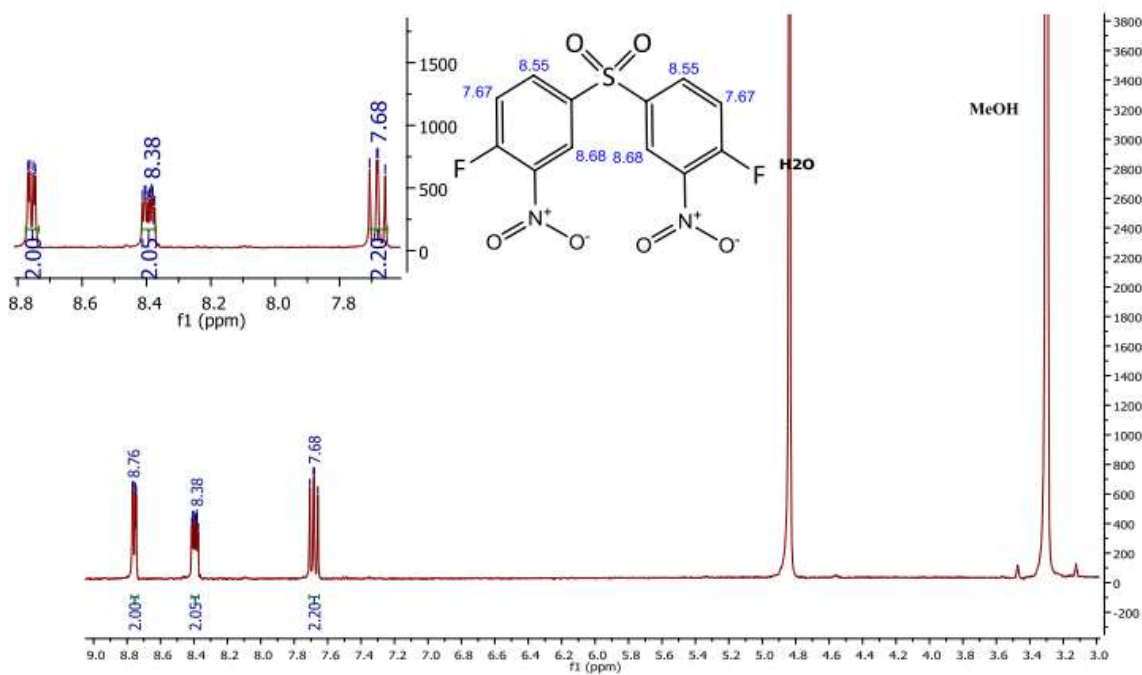
451- Meadoe JR, Reid EE. *Pseudosaccharin chloride, a reagent for the identification of alcohols*. *J. Am. Chem. Soc.* 1943; 65:457-490.

Anexos

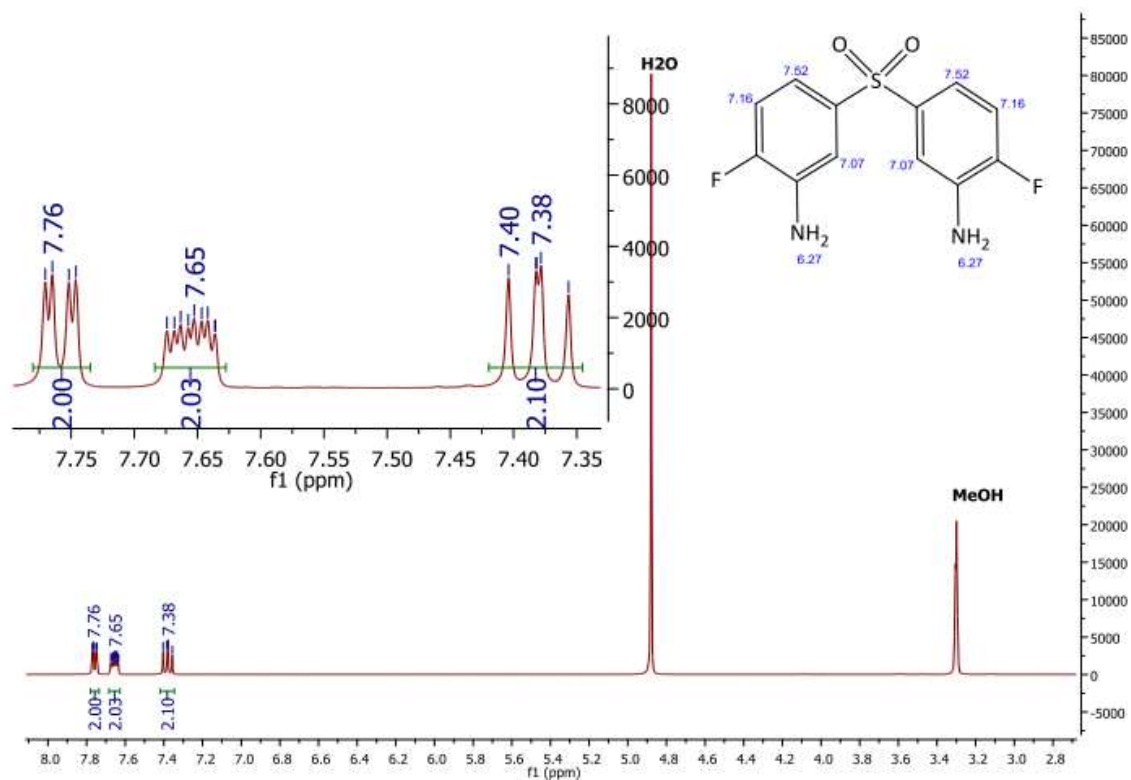
Anexo 1 – Espetro de massa, em modo positivo, resultante da síntese de bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona.



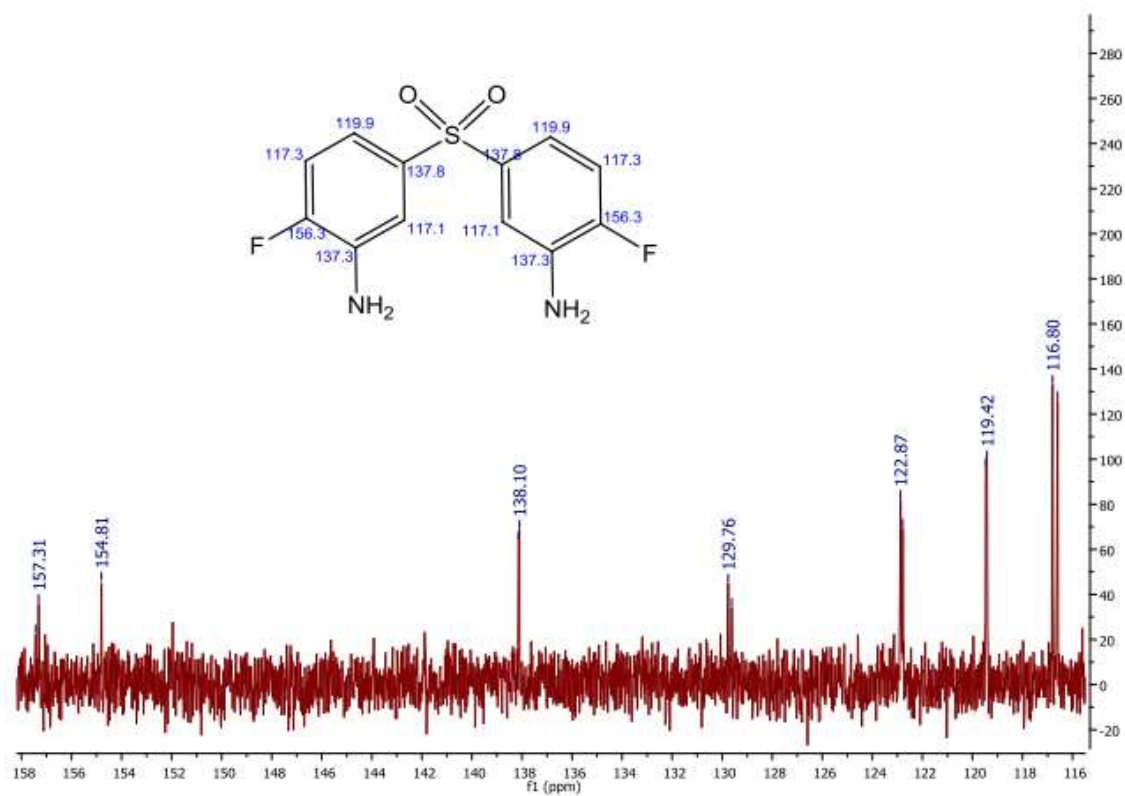
Anexo 2 – Espetro de ^1H RMN, em D-metanol, de bis(4-fluoro-3-nitrofenil)sulfona.



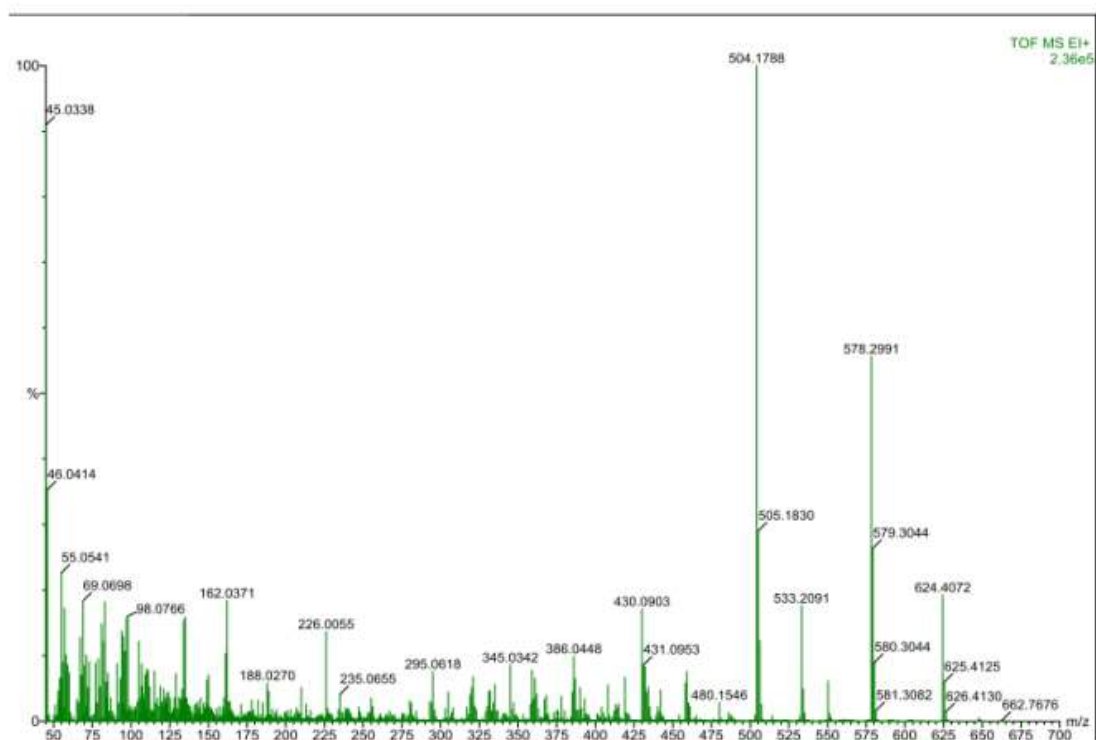
Anexo 3 – Espectro de ^1H RMN, em D-metanol, resultante da síntese de bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona.



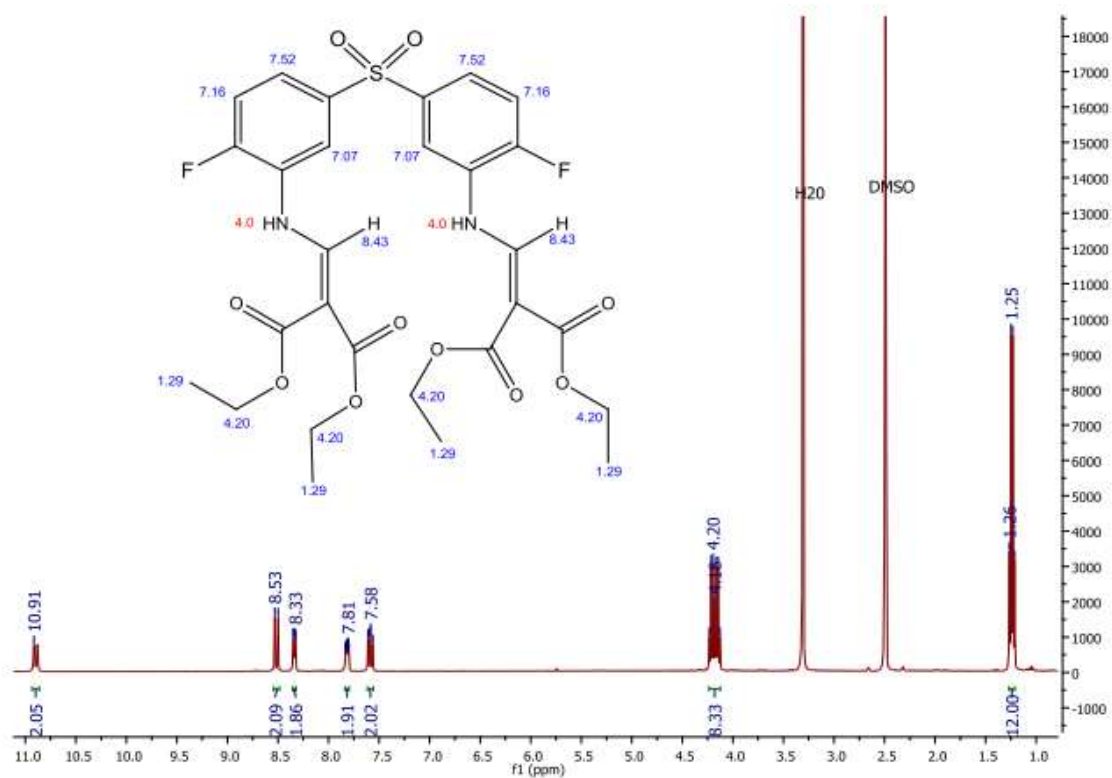
Anexo 4 – Espectro de ^{13}C RMN, em D-metanol, resultante da síntese de bis(4-fluoro-3-aminofenil)sulfona.



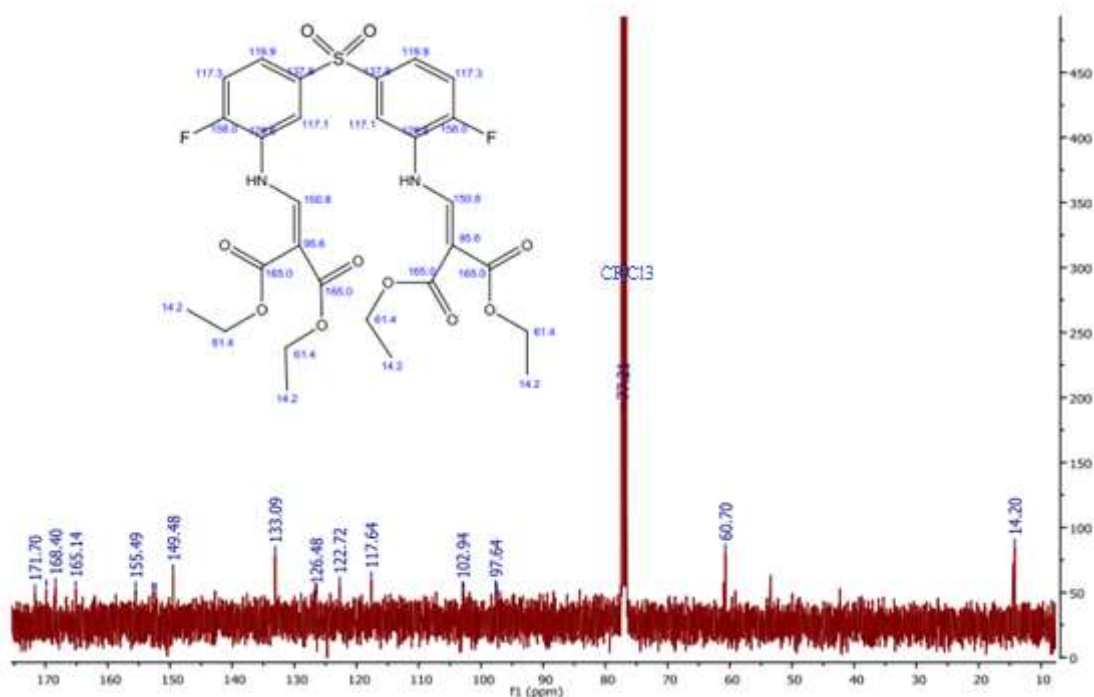
Anexo 5 - Espectro de massa, em modo positivo, resultante da síntese de bis-dietil-2-(((4-fluoro-3-aminofenil)metileno)malonato)sulfona.



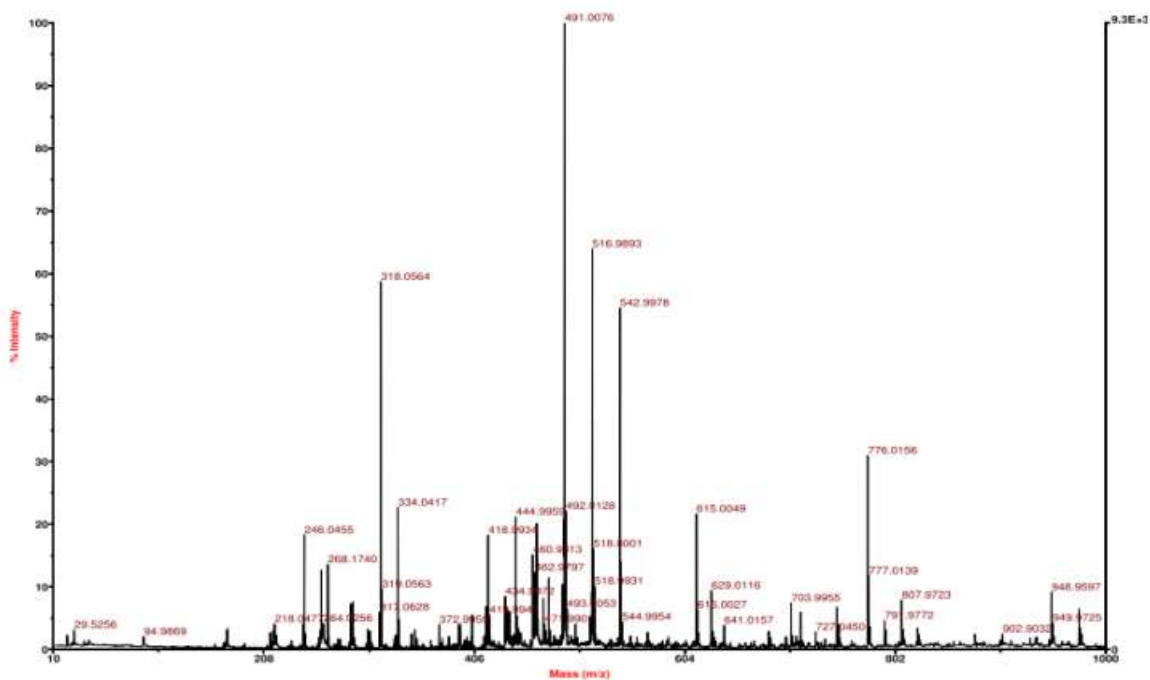
Anexo 6 - Espectro de ^1H RMN, em D6-DMSO, resultante da síntese de bis-dietil-2-(((4-fluoro-3-aminofenil)metileno)malonato)sulfona.



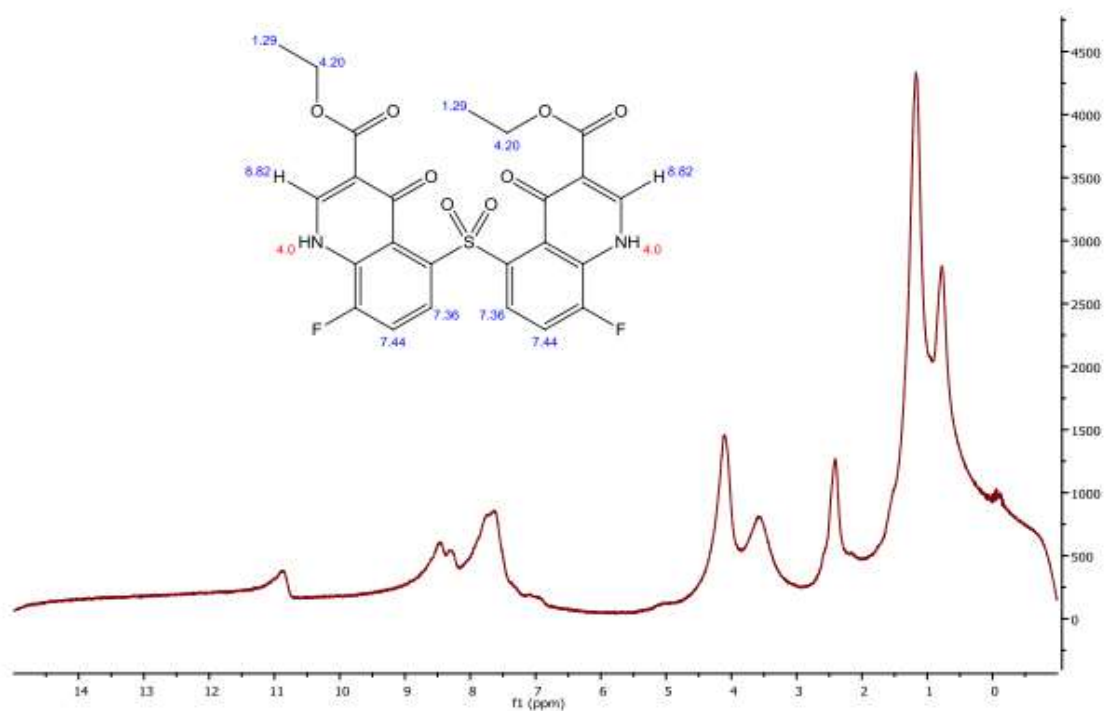
Anexo 7 - Espectro de ^{13}C RMN, em D-clorofórmio, resultante da síntese de bis-dietil-2-(((4-fluoro-3-aminofenil)metileno)malonato)sulfona.



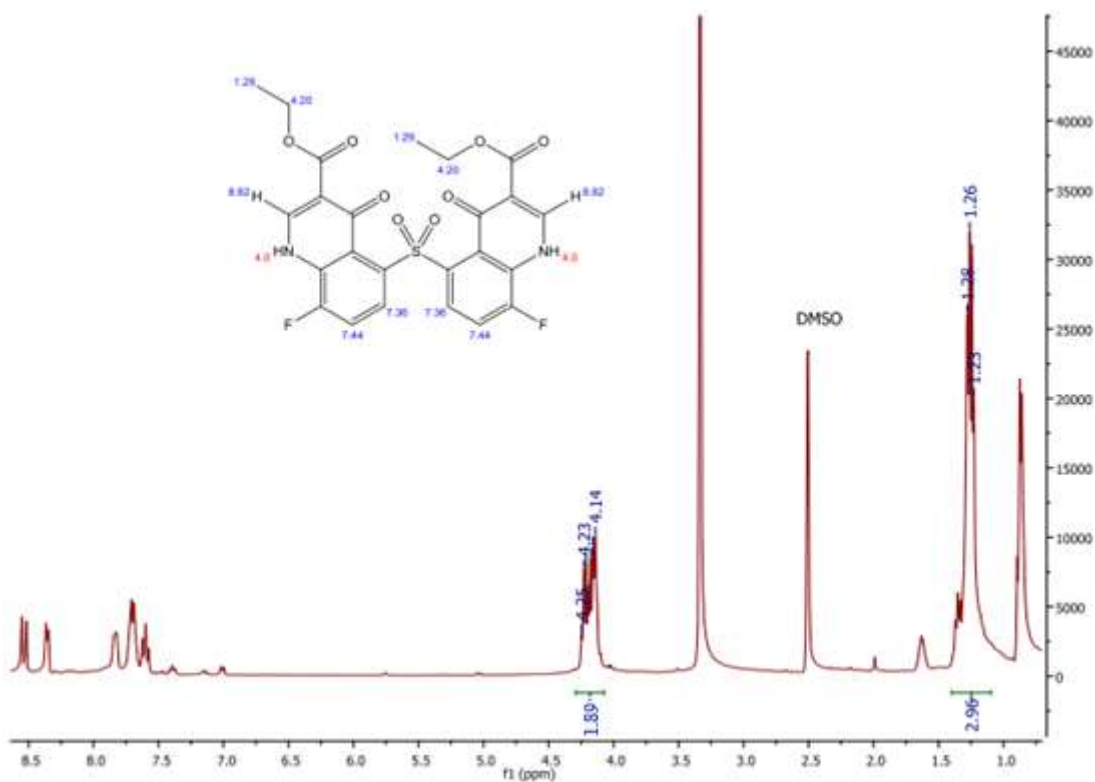
Anexo 8 - Espectro de massa, em modo positivo, resultante da síntese de 5,5'-diethyl sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) através de aquecimento com oxicloreto de fósforo (POCl₃).



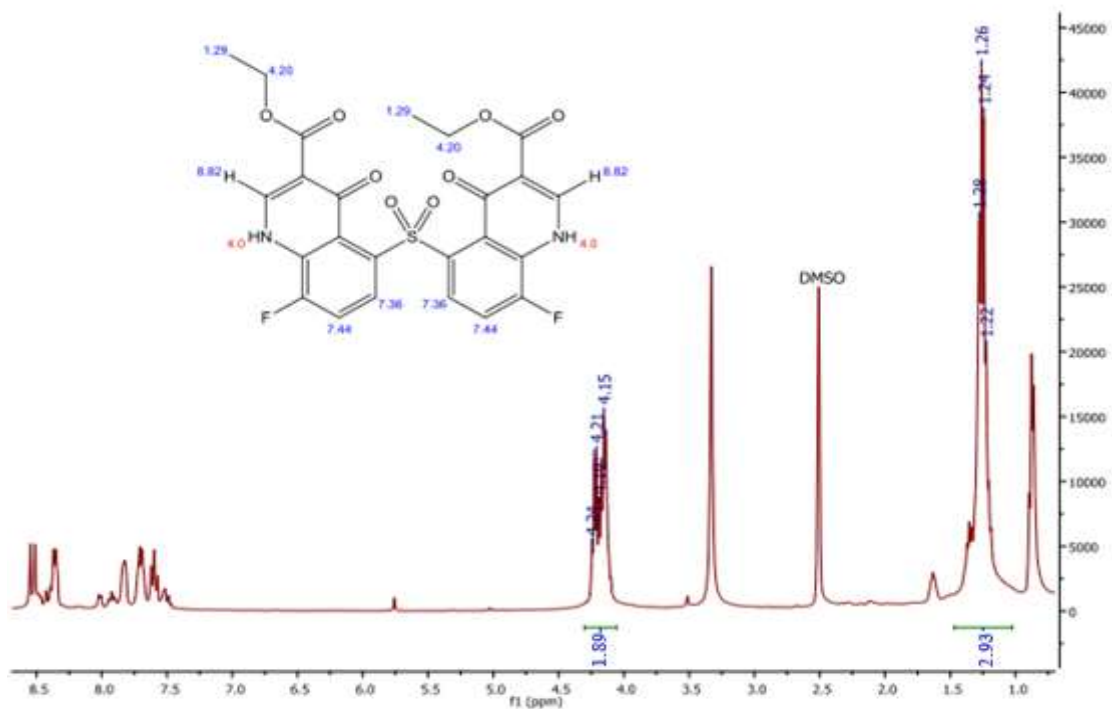
Anexo 11 - Espetro de ^1H RMN da 1ª fração, em D6-DMSO, resultante da síntese de 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) através de aquecimento em dowtherm A.



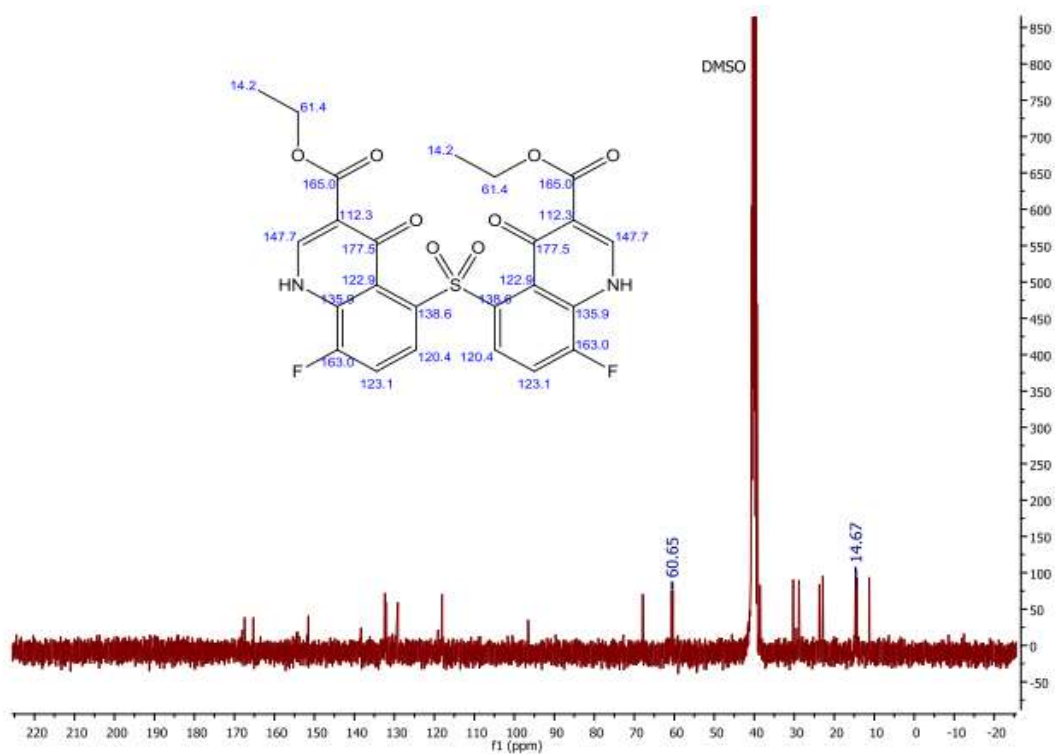
Anexo 12 - Espetro de ^1H RMN da 2ª fração, em D6-DMSO, resultante da síntese de 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) através de aquecimento em dowtherm A.



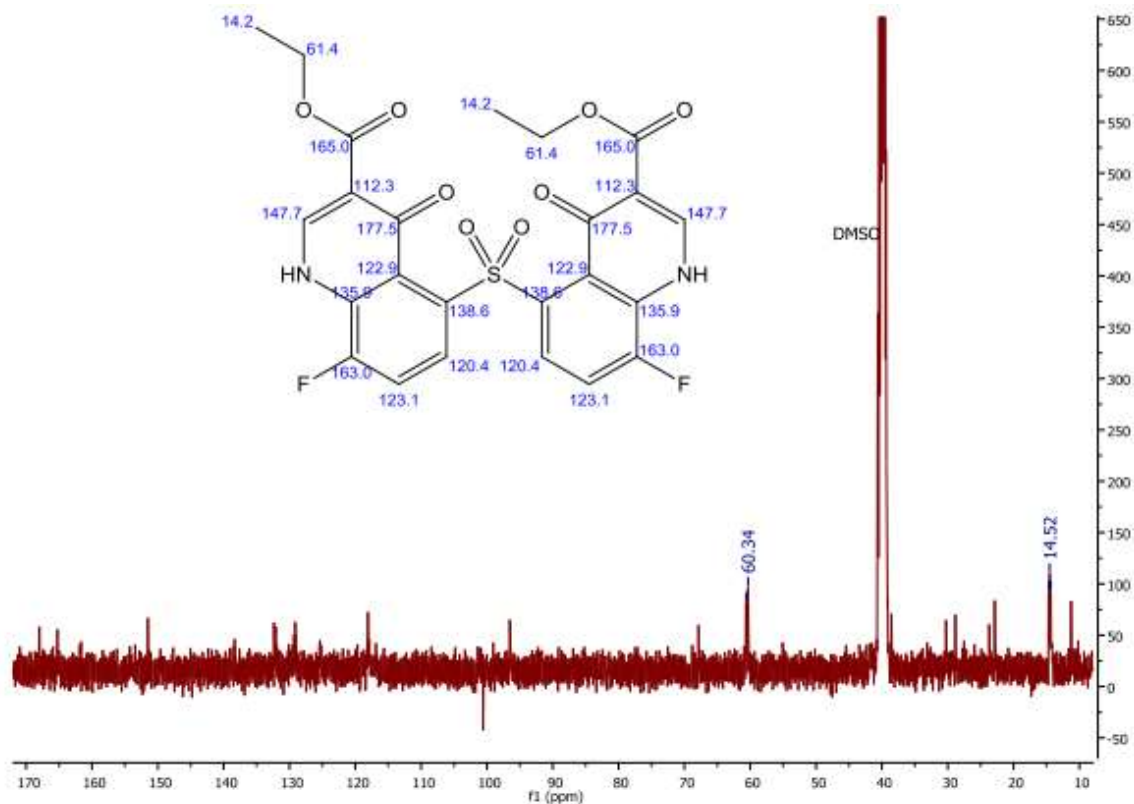
Anexo 13 - Espetro de ^1H RMN da 3ª fração, em D6-DMSO, resultante da síntese de 5,5'-diethyl sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) em dowtherm A.



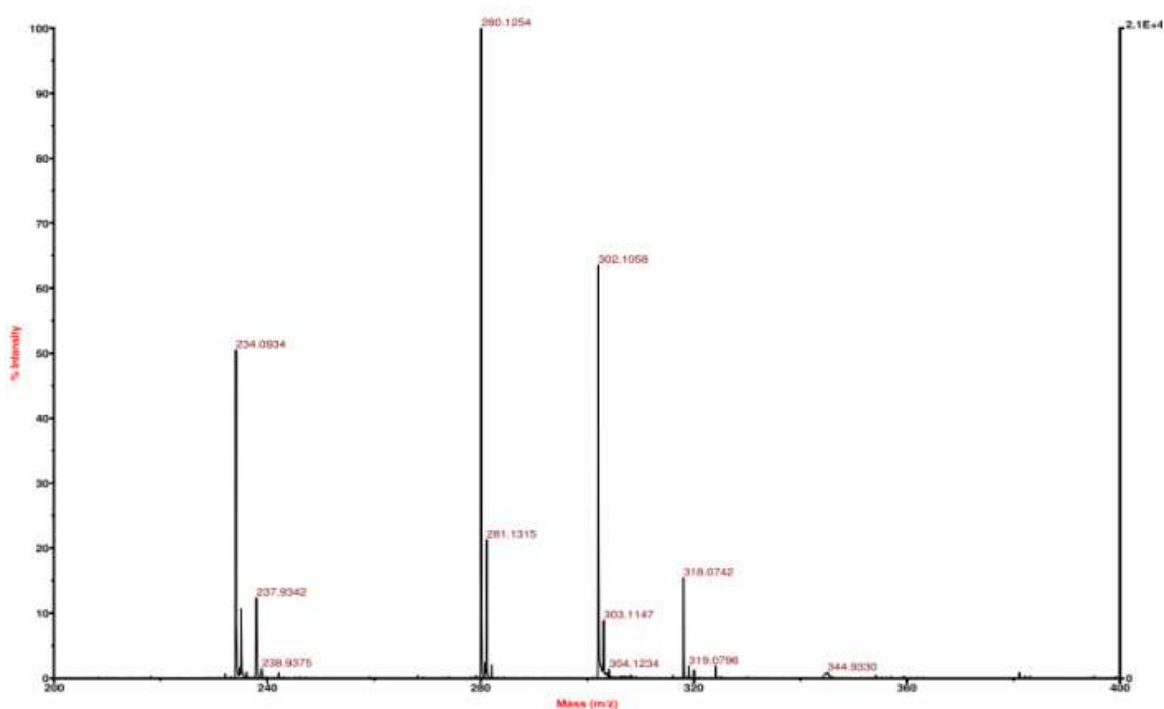
Anexo 14 - Espetro de ^{13}C RMN da 2ª fração, em D6-DMSO, resultante da síntese de 5,5'-diethyl sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) através de aquecimento em dowtherm A.



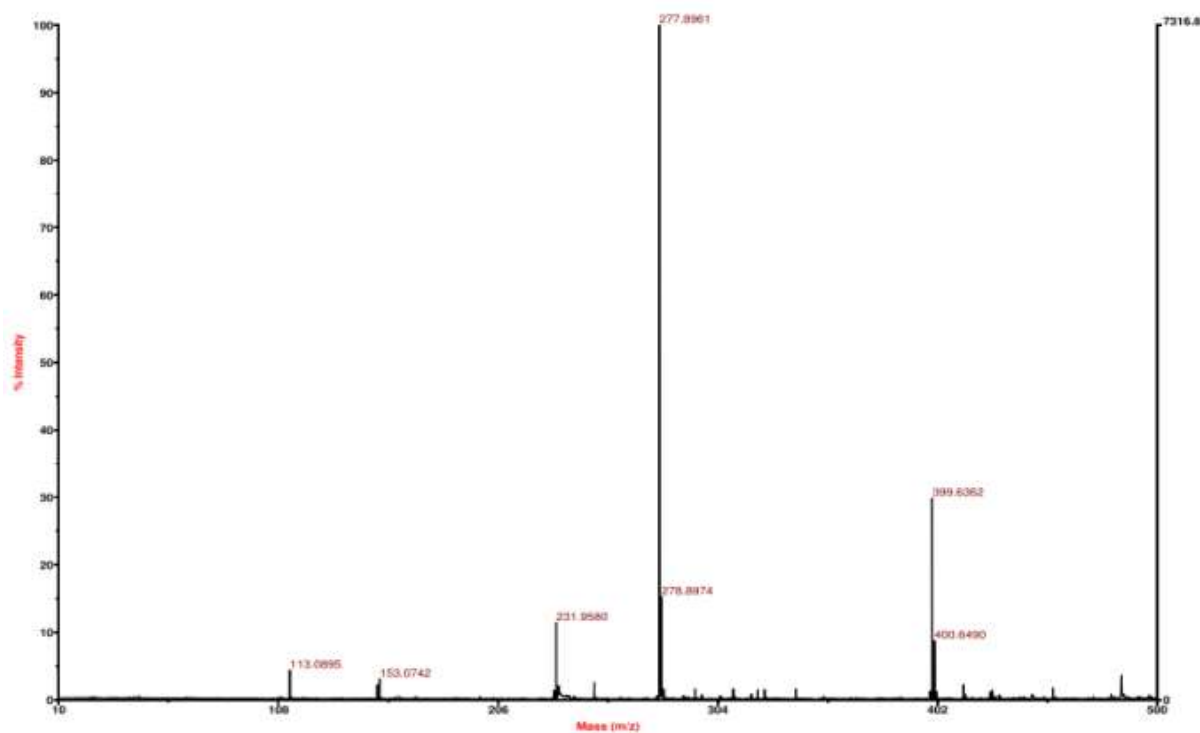
Anexo 15 - Espectro de ^{13}C RMN da 3ª fração, em D6-DMSO, resultante da síntese de 5,5'-dietil sulfonil bis-(8-fluoro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato) através de aquecimento em dowtherm A.



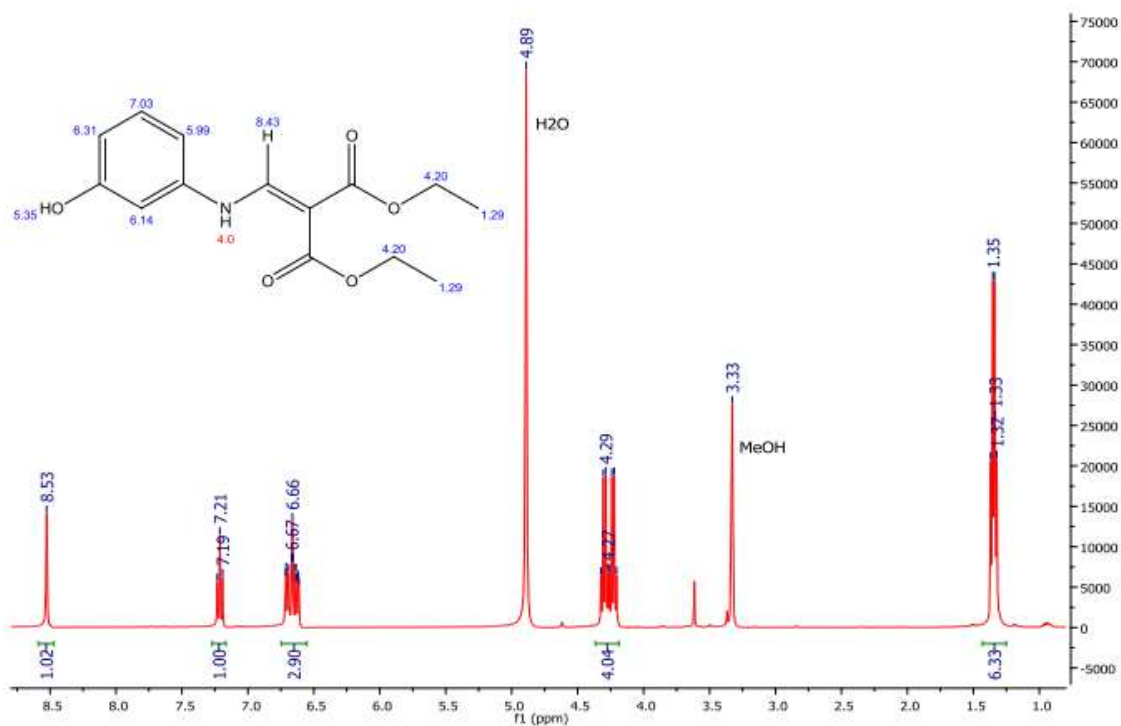
Anexo 16 - Espectro de massa (em modo positivo) resultante da síntese de 2-(((3-hidroxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo.



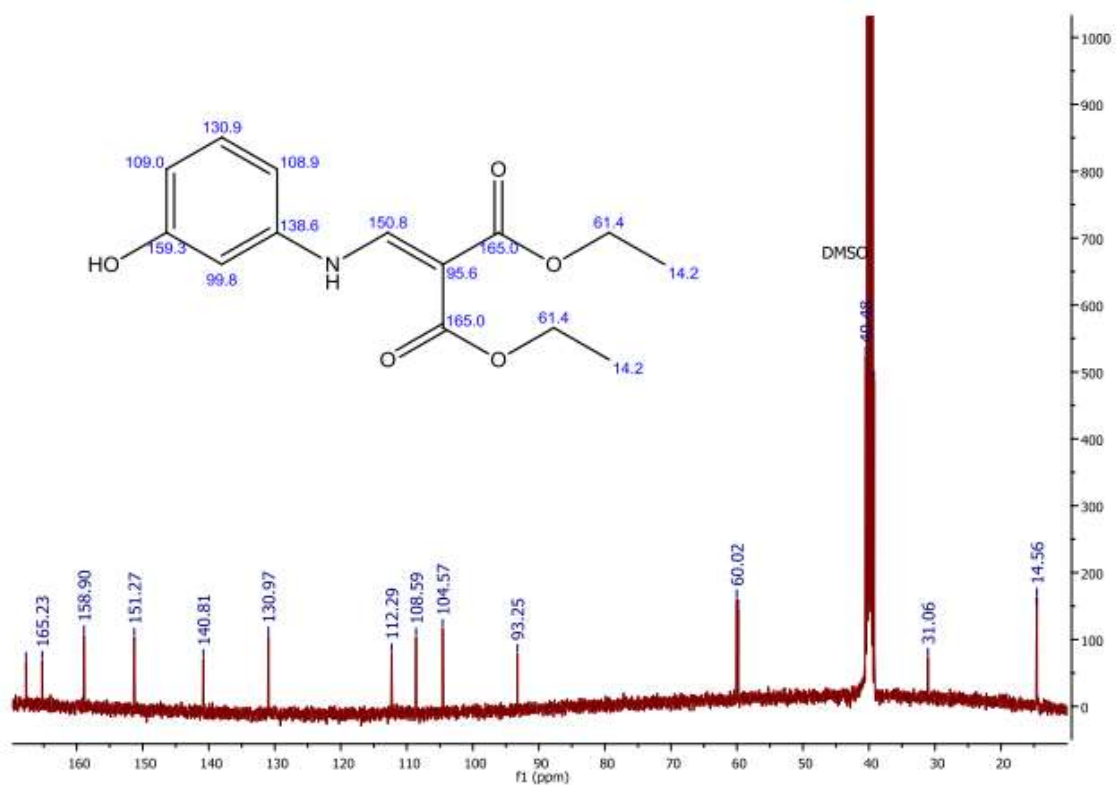
Anexo 17 - Espectro de massa (em modo negativo) resultante da síntese de 2-(((3-hidroxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo.



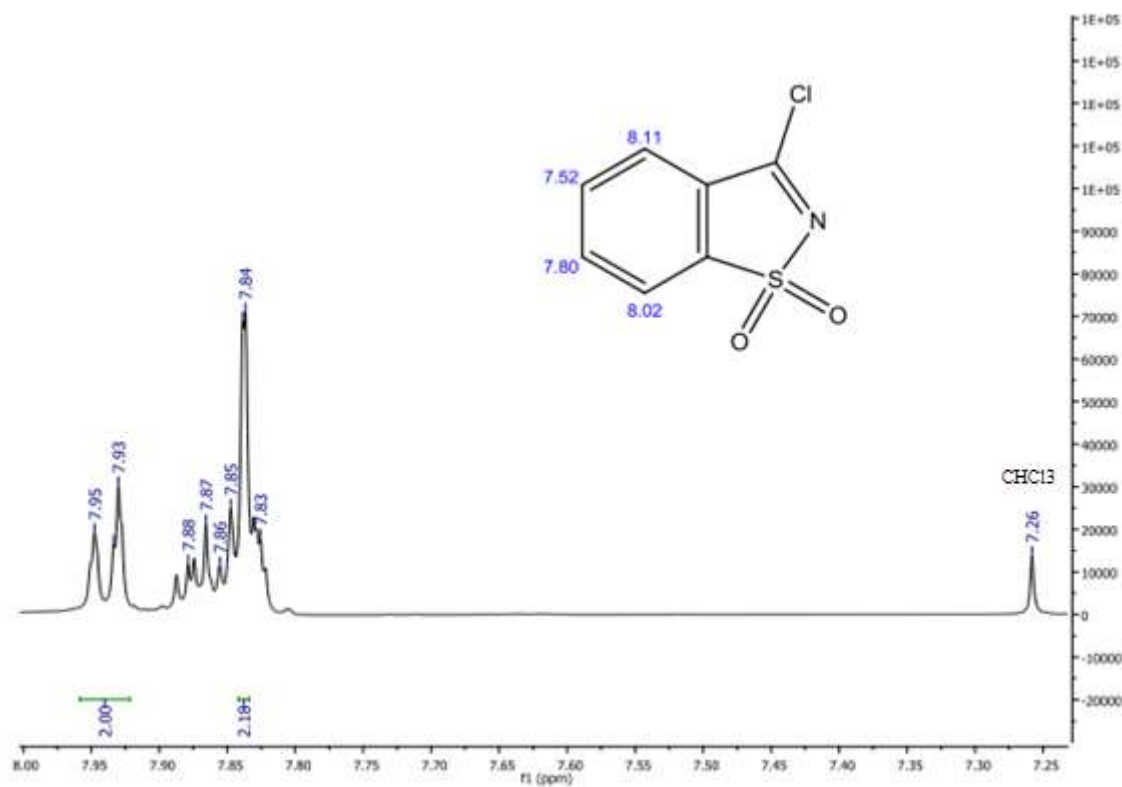
Anexo 18 - Espectro de ^1H RMN, em D-metanol, resultante da síntese de 2-(((3-hidroxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo.



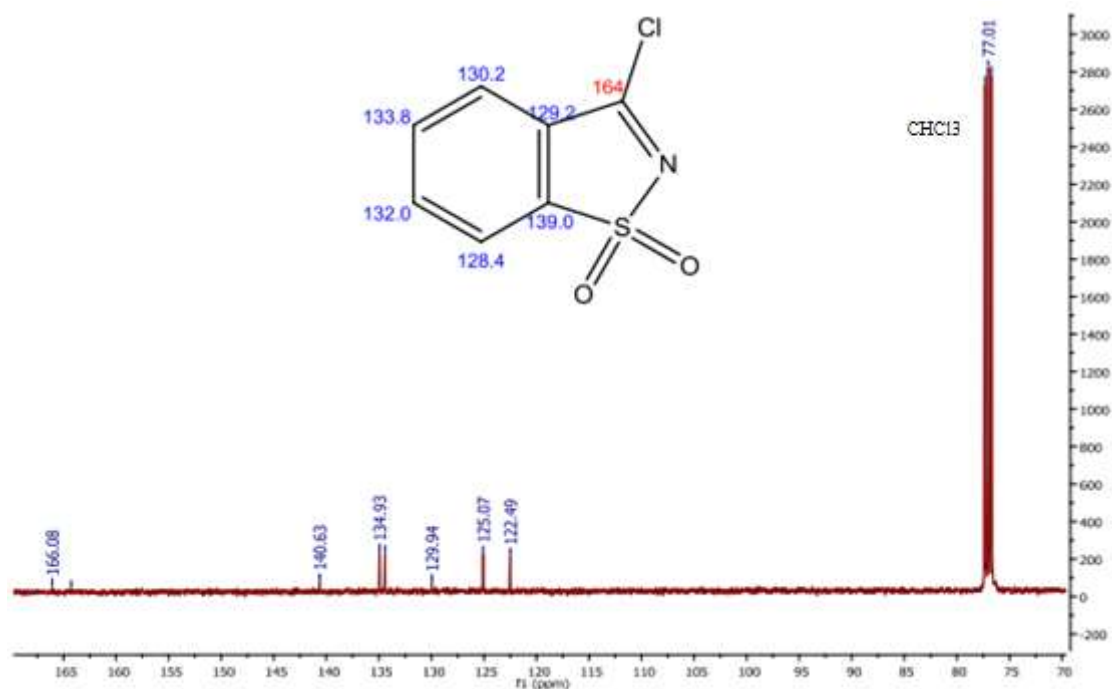
Anexo 19 - Espectro de ^{13}C RMN, em D6-DMSO resultante da síntese de 2-(((3-hidroxifenil)amino)metileno)malonato de dietilo.



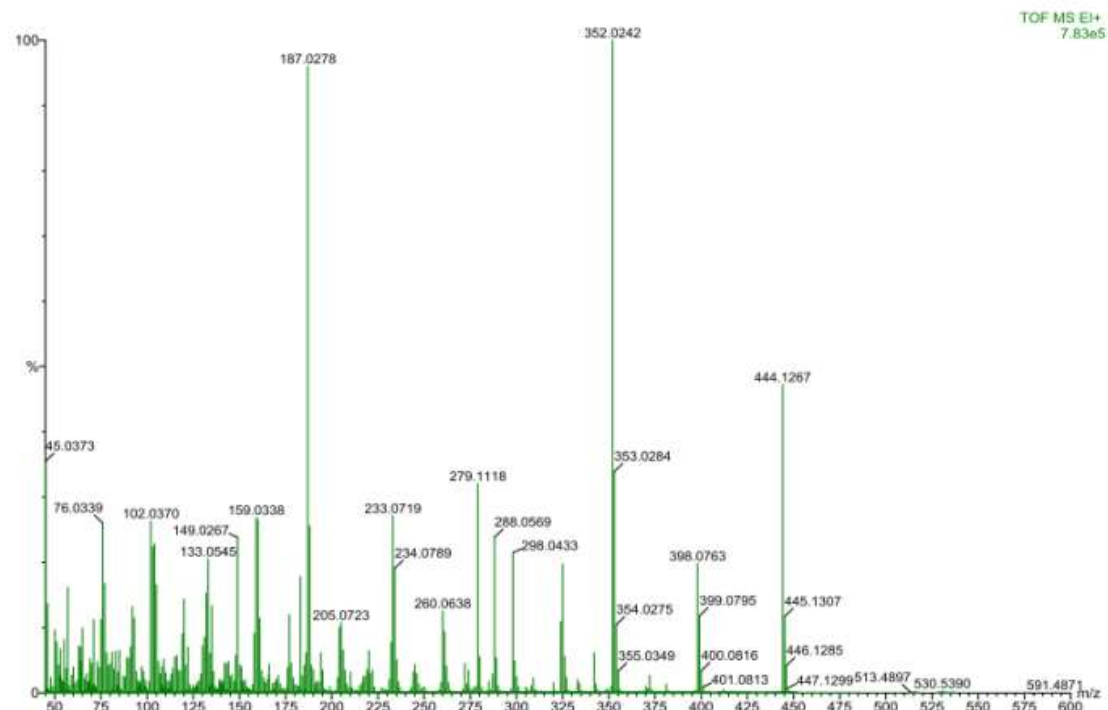
Anexo 20 - Espectro de ^1H RMN, em D-clorofórmio, resultante da síntese de cloreto de pseudo-sacarina.



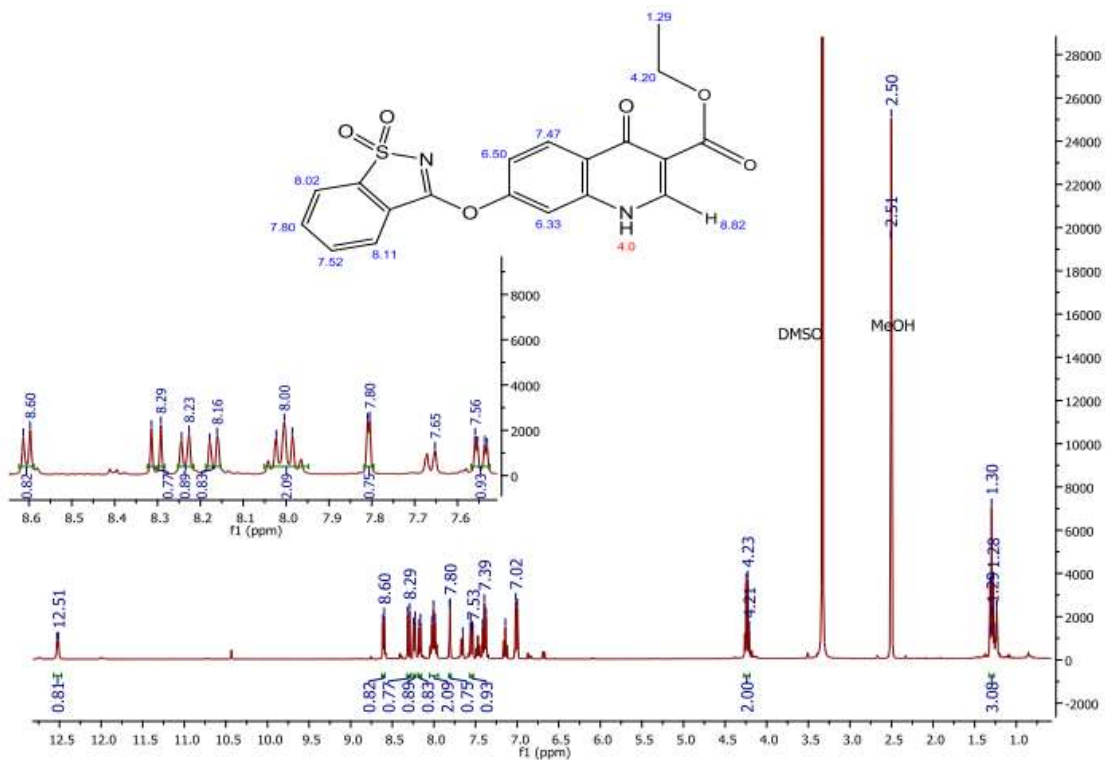
Anexo 21 - Espectro de ^{13}C RMN, em D-clorofórmio, resultante da síntese de cloreto de pseudo-sacarina.



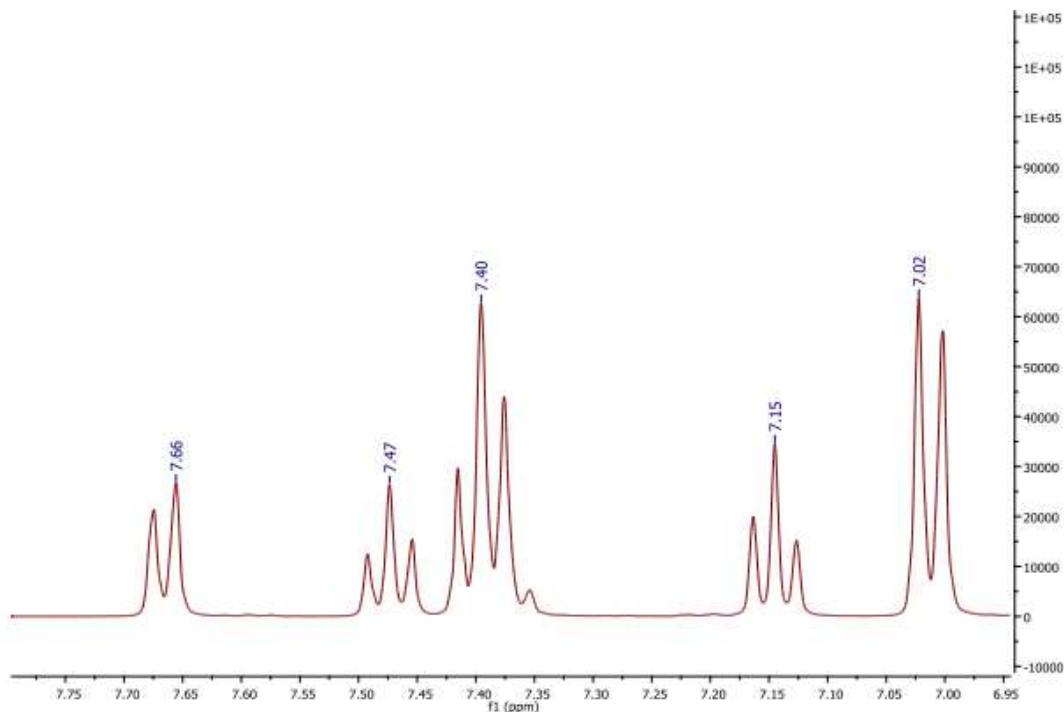
Anexo 22 - Espectro de massa (em modo positivo) resultante da síntese de 2-(((3-(1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)fenilamino)metileno)malonato de dietilo.



Anexo 25 - Espectro de ^1H RMN resultante da síntese de acetato de 7-((1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato.



Anexo 26 - Espectro de ^1H RMN do solvente dowtherm A.



Anexo 27 - Espectro de ^1H RMN resultante da sobreposição dos espectros de ^1H RMN da síntese de acetato de 7-((1,1-dioxidobenzo [d] isotiazol-3-il)oxi)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato (Anexo 25) e de ^1H RMN do solvente dowtherm A (Anexo 26).

