

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO - PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY

UNIGRANRIO

Curso de Biomedicina

ALINE MARCELE VIEIRA DOS SANTOS

**EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATOS DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS
SOBRE A REPLICAÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA E SUA ATIVIDADE
NEURAMINIDASE**

Duque de Caxias

2018

ALINE MARCELE VIEIRA DOS SANTOS

**EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATOS DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS
SOBRE A REPLICAÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA E SUA ATIVIDADE
NEURAMINIDASE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do Grande
Rio - Professor José de Souza Herdy,
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Milene Dias Miranda

Duque de Caxias

2018

TCC
630.28
5237
v.2

93259

S237e Santos, Aline Marcelle Vieira d
Efeito inibitório de extratos
replicação do vírus influenza e
Vírus dos Santos, Durgas d

Santos, Aline Marcelle Vieira dos.

Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Escola de Ciências da Saúde, 2018.
"Orientadora: Profa. Milene Dias Miranda".
Bibliografia: f. 70-79.

CDD - 610

00000000000000000000000000000000

EXEMPLAR

ALINE MARCELE VIEIRA DOS SANTOS

**EFEITO INIBITÓRIO DE EXTRATOS DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS
SOBRE A REPLICAÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA E SUA ATIVIDADE
NEURAMINIDASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade do Grande Rio - Professor José de Souza Herdy, como parte dos
requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em 22 de Novembro de 2018.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Wallace Pacienza Lima


Prof.(a) Dra. Gisele Aparecida Fagundes Silva


Dra. Cristiana Couto Garcia

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo cuidado, por iluminar minha mente, por ter sido sempre fiel às minhas orações, obrigada Senhor!

À minha família, meus pais e filhos, em especial o meu marido Jorge Junior, que sempre me apoiou, e me aturou nos períodos de provas;

À minha mãe Angélica, por sempre me apoiar, por suas orações, e especialmente por tomar conta dos meus filhos, sempre que precisei;

À minha sogra Miriam, por suas fervorosas orações;

À minha irmã Ariane, que sempre teve uma palavra de ânimo e força, quando em muitos momentos, pensei em desanimar;

Aos meus pastores Márcia Duarte e Orlando Antônio Duarte, por suas orações e incentivos;

Aos meus queridos amigos da faculdade, Bruno Parreira, Catherine Savaget, Mattheus Braga, Micheline Lopes, Paulo Victor, que trilharam esse caminho junto a mim. Vencemos juntos a mais esta etapa, com a plena certeza de que chegaríamos até aqui unidos e vitoriosos;

À minha orientadora Dra. Milene Dias Miranda, que muito contribuiu para a realização deste trabalho, sempre me apoiando, e acreditando em mim;

Aos docentes que tive o imenso prazer de conhecer, ao longo de toda a minha graduação, em especial agradeço à docente Natália Moraes, que sempre estava disposta a me ajudar e me orientar;

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), ao Instituto Oswaldo Cruz (IOC), e a todos os integrantes do Laboratório de Vírus Respiratório e do Sarampo (LVRS), em especial a Dra. Marilda Siqueira, que abriram as portas para que eu pudesse fazer meu estágio não obrigatório, contribuindo muito para o meu desenvolvimento, acadêmico e científico;

Ao Programa de Estágio Curricular (PEC) que me concedeu a bolsa de estudos;

A todos que de alguma forma, contribuíram para o meu sucesso; o meu sincero, muito obrigada!

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota."

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Os vírus Influenza causam infecções sazonais com sintomas leves a graves, circulam em todo o mundo, e podem afetar pessoas em qualquer faixa etária. Portanto, esta infecção é um grave problema em saúde pública, que causa doenças graves e morte, principalmente em populações de alto risco. Todos os anos, 0,5% da população mundial é infectada por esse patógeno. Esta porcentagem pode aumentar até dez vezes durante as pandemias. A vacinação contra influenza é a maneira mais eficaz de prevenir a doença. Além disso, os medicamentos anti-influenza são essenciais para intervenções profiláticas e terapêuticas. O oseltamivir (OST, um inibidor da neuraminidase viral) é o principal antiviral usado em clínicas durante surtos. No entanto, tem sido detectado vírus resistentes ao OST, que surgem naturalmente ou devido à pressão antiviral, com uma prevalência de 1-2% em todo o mundo. Assim, a busca por novos medicamentos anti-influenza é extremamente importante. Atualmente, vários grupos vêm desenvolvendo estudos descrevendo o potencial biotecnológico de microalgas e cianobactérias, incluindo a atividade antiviral de seus extratos. No Brasil, esse potencial é pouco conhecido e explorado. Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre o tema, 38 extratos de microalgas e cianobactérias isolados de biomas marinhos e de água doce no Brasil foram testados contra: toxicidade celular; replicação de vírus influenza sensíveis e resistentes ao OST; e atividade neuraminidase viral. Para este propósito, células MDCK (Madin-Darby canine kidney - células de rim de cão) infectadas foram tratadas com 200 µg/mL de cada extrato. Um total de 17 extratos (45%) inibiu a replicação do vírus influenza A, com 7 deles resultando em mais de 80% de inibição. Além disso, ensaios funcionais realizados com a neuraminidase viral revelaram 2 extratos em acetato de etila (obtidos a partir de *Leptolyngbya* sp. e *Chlorellaceae*) com $IC_{50} < 210$ µg/mL para influenza A e B de linhagens sensíveis e resistentes ao OST. Verificamos também que as células MDCK expostas a 1 mg/mL de todos os extratos apresentaram viabilidade superior a 80%. Nossos resultados sugerem que extratos de microalgas e cianobactérias têm propriedades promissoras anti-influenza. Logo, suas pesquisas químicas devem ser otimizadas para isolar os compostos ativos, com a finalidade de desenvolver novos medicamentos anti-influenza. Os dados gerados neste trabalho contribuem para o conhecimento do potencial biotecnológico dos biomas brasileiros, que ainda são pouco explorados para esta finalidade.

Palavras-chave: Extratos de microalgas. Antiviral. Influenza A

ABSTRACT

The influenza virus can cause seasonal infections with mild to severe symptoms, circulating worldwide, and it can affect people in any age group. Therefore, this infection is a serious public health problem that causes severe illness and death in high risk populations. Every year, 0.5% of the world's population is infected by this pathogen. This percentage can increase up to ten times during pandemics. Influenza vaccination is the most effective way to prevent disease. In addition, anti-influenza drugs are essential for prophylactic and therapeutic interventions. The oseltamivir (OST, a neuraminidase inhibitor) is the primary antiviral used in clinics during outbreaks. However, OST resistant viruses may emerge naturally or due to antiviral pressure, with a prevalence of 1-2% worldwide. Thus, the search for new anti-influenza drugs is extremely important. Currently, several groups have been developing studies describing the biotechnological potential of microalgae and cyanobacteria, including antiviral activity of their extracts. In Brazil, this potential is poorly known and explored. With the aim of increasing the knowledge on this topic, 38 extracts from microalgae and cyanobacteria isolated from marine and freshwater biomes in Brazil were tested against: cellular toxicity; OST-sensitive and resistant influenza replications; and neuraminidase activity. For this purpose, Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-infected cells were treated with 200 µg/mL of each extract. A total of 17 extracts (45%) inhibited influenza A replication, with 7 of them resulting in more than 80% inhibition. Moreover, functional assays performed with viral neuraminidase revealed 2 extracts (from *Leptolyngbya* sp. and *Chlorellaceae*) with IC₅₀ mean < 210 µg/mL for influenza A and B, and also OST-sensitive and resistant strains. Furthermore, MDCK cells exposed to 1 mg/mL of all the extracts showed viability higher than 80%. Our results suggest that extracts of microalgae and cyanobacteria have promising anti-influenza properties. Further chemical investigation should be conducted to isolate the active compounds for the development of new anti-influenza drugs. The data generated contribute to the knowledge of the biotechnological potential of Brazilian biomes that are still little explored for this purpose.

Key-words: Extracts of microalgae. Antiviral. Influenza A.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VÍRUS INFLUENZA A.** AS GLICOPROTEÍNAS HA E NA ENCONTRAM-SE INSERIDAS NO ENVELOPE LIPÍDICO, BEM COMO A PROTEÍNA M2, QUE FORMA O CANAL IÔNICO DO VÍRUS. ABAIXO DO ENVELOPE ENCONTRA-SE A PROTEÍNA DE MATRIZ M1 E, INTERNAMENTE À MATRIZ ESTÃO OS SEGMENTOS DE RNAV FITA SIMPLES. FONTE: ADAPTADO DE KAISER, J. SCIENCE, 2006..... 19
- FIGURA 2 - ESQUEMA MOSTRANDO COMO SURTEM O NOVO SUBTIPO DE VÍRUS INFLUENZA A E CEPAS DE SUBTIPOS EXISTENTES.** FONTE: ADAPTADO DE VDU'S BLOG - INFLUENZA VIRUSES (IFVs) - IAN M. MACKAY. PHD. 2013..... 24
- FIGURA 3 - LINHA DO TEMPO DEMONSTRANDO AS PANDEMIAS OCASIONADAS PELOS VÍRUS INFLUENZA A OCORRIDAS NOS SÉCULOS XX E XXI.** FONTE: ADAPTADO DE WHO. 25
- FIGURA 4 - FASES QUE CARACTERIZAM UMA PANDEMIA DE INFLUENZA.** FONTE: ADAPTADO DE WHO (2015). 28
- FIGURA 5 - FIGURA ESQUEMÁTICA DA REPLICAÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA A E OS SÍTIOS DE AÇÃO DOS INIBIDORES DE NEURAMINIDASE, ANTIVIRAIS UTILIZADOS NO CONTROLE DESTES VÍRUS.** FONTE: ADAPTADO DE VON ITZSTEIN (2007)..... 30
- FIGURA 6 - PROCEDIMENTO PARA COLETA DE SECREÇÃO DE NASOFARINGE, UTILIZANDO SWAB COMBINADO NASAL (A) OU OROFARÍNGEO (B) E ASPIRADO DE NASOFARINGE (C).** FONTE: ADAPTADO DE SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (2009). 35
- FIGURA 7 - DESCRIÇÃO DAS CEPAS UTILIZADAS NAS VACINAS INFLUENZA TRIVALENTES, RESOLUÇÃO - RE Nº 2.696.** FONTE: DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO (DOU) DO DIA 9 DE OUTUBRO A RE 2.696/2017. 39
- FIGURA 8 - CICLO REPLICATIVO DO INFLUENZA A E ETAPAS DE ATUAÇÃO DOS PRINCIPAIS INIBIDORES.** AMANTADINA INIBE O CANAL M2 DE PRÓTONS E OS NAI INIBEM A ENZIMA SIALIDASE. OS ANTIVIRAIS ESTÃO DESTACADOS EM RETÂNGULOS COR LARANJA, AS PROTEÍNAS ALVO ESTÃO SUBLINHADAS E O RESULTADO DA ATIVIDADE ANTI-INFLUENZA ESTÁ MOSTRADO COM UM X EM VERMELHO. FONTE: ADAPTADO DE VON ITZSTEIN (2007). 40
- FIGURA 9 - COMPARAÇÃO ESTRUTURAL ENTRE O ÁCIDO SIÁLICO E OS NAI.** ESTRUTURAS QUÍMICAS DO ÁCIDO SIÁLICO, ZANAMIVIR E OSELTAMIVIR. A PRINCIPAL DIFERENÇA ENTRE

ELAS SÃO OS GRUPOS GLICEROL (MARCADOS COM CÍRCULOS VERMELHOS) E L-ETHYLPROPOXY (MARCADO COM CÍRCULOS VERMELHOS) E L-ETHYLPROPOXY (MARCADO COM CÍRCULO AZUL) (A). FONTE: DAS E COL., 2010. 42

FIGURA 10 - PAPEL RESTRITIVO DAS IFITM SOBRE A INFECÇÃO POR INFLUENZA A. OS VÍRUS INFLUENZA A UTILIZAM O ÁCIDO SIÁLICO (EM COR LARANJA) DA CÉLULA COMO RECEPTOR. APÓS A ENDOCITOSE, OCORRE A FUSÃO DO ENVELOPE LIPÍDICO VIRAL COM A MEMBRANA DA CÉLULA HOSPEDEIRA. O RNA VIRAL É LIBERADO NO CITOPLASMA E TRANSPORTADO ATÉ O NÚCLEO, ONDE OCORRE A SÍNTESE DE RNA MENSAGEIRO VIRAL E RNA GENÔMICO, PROSSEGUINDO DESTA FORMA A REPLICAÇÃO VIRAL. AS IFITM (MOSTRADAS NAS CORES ROXA, VERMELHA E AMARELA) ATUAM IMPEDINDO A FUSÃO DO ENVELOPE VIRAL A MEMBRANA DO ENDOSSOMA, O QUE INTERROMPE TODO O PROCESSO DE REPLICAÇÃO DO INFLUENZA. FONTE: STEPHEN ELLENDGE/HHMI AT BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL 44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROTEÍNAS DO VÍRUS INFLUENZA A E RESPECTIVAS FUNÇÕES.....	22
TABELA 2 - DESCRIÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRATOS, FONTE, PONTO E DATA DE COLETA.	50
TABELA 3 - VIABILIDADE CELULAR E INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA (SCREENING) APÓS EXPOSIÇÃO AOS EXTRATOS EM SOLVENTE ACETATO DE ÉTILA (AcOEt) OU N-BUTANOL (N-BuOH).	59
TABELA 4 - VALORES DE EC50, CC50 E SI PARA OS EXTRATOS QUE INIBIRAM A REPLICAÇÃO DO INFLUENZA A ACIMA DE 80% NO ENSAIO DE TRIAGEM.	62
TABELA 5 - OS VALORES DE EC50 E IC50 DOS EXTRATOS QUE INIBIRAM A ATIVIDADE DA NEURAMINIDASE DOS VÍRUS INFLUENZA A E B SENSÍVEIS E RESISTENTES AO OSELTAMIVIR (OST).	64

LISTA DE SIGLA E ABREVIATURAS

a.C	Antes de Cristo
AcOEt	Acetato de Etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC ₅₀	Concentração necessária para reduzir a viabilidade celular não infectada normal em 50%.
CCMR	Coleção de Culturas de Microalgas da UFRJ
CDC	Centro para controle de doenças e prevenção (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CGPNI	Coordenação-Geral do Programa Nacional de Imunizações
CO ₂	Gás carbônico
CTL	Controle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBV	Vírus Epstein-Barr
EC ₅₀	Concentração necessária para reduzir a inibição da citopatogenicidade induzida por infecção viral em 50%.
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPI	Equipamento de proteção individual
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro fetal bovino
EDA	Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HA	Hemaglutinina

Hpi	Horas após infecção
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática da neuraminidase.
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFITM	Proteínas transmembranas induzidas por interferon
IFN	Interferon
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LVRS	Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo
MDCK	Madin-Darby canine kidney
mL	Mililitro
mg	Miligrama
MS	Ministério da Saúde
NA	Neuraminidase
NAI	Inibidores da neuraminidase
n-BuOH	n-Butanol
NI	Não inibiu
nm	Nanômetro
NP	Nucleoproteína
NP*	Não produziu
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OST	Oseltamivir
OST-car	Oseltamivir carboxilato
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDM	Pandêmico
pH	potencial Hidrogeniônico
RE	Resolução
RAR	Receptor de ácido retinóico
RIDTs	Rapid Influenza Diagnostic Tests
RIG-I	Gene induzido por retinoide I
RNA	Ácido ribonucleico
RNAv	Ácido ribonucleico viral
RNPs	Ribonucleoproteínas
RT	Transcriptase reversa
RT-PCRreverse	Transcription polymerase chain reaction
rRTPCRreverse	Transcription polymerase chain reaction real-time
SG	Síndrome gripal
SI	Índice seletivo
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
Sivep-Gripe	Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Influenza
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UTI	Unidade de terapia intensiva
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide
WHO	World Health Organization
µm	Micrômetro

μM

Micromolar

μL

Microlitro

μg

Micrograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 O VÍRUS INFLUENZA.....	19
1.1.1 PANDEMIAS OCASIONADAS PELOS VÍRUS INFLUENZA	25
1.1.2 CICLO REPLICATIVO.....	29
1.1.3 TRANSMISSÃO	31
1.1.4 ASPECTOS CLÍNICOS.....	32
1.1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	33
1.1.6 EPIDEMIOLOGIA	35
1.1.7 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA.....	36
1.2 PREVENÇÃO E INIBIÇÃO	38
1.2.1 VACINAS.....	38
1.2.2 ANTIVIRAIS.....	40
1.2.3 INIBIDORES DO CANAL M2	41
1.2.4 INIBIDORES DA NEURAMINIDASE (NAI).....	41
1.2.5 RESPOSTA IMUNE INATA À INFECÇÃO POR INFLUENZA A.....	42
1.2.6 BUSCA POR NOVOS ANTIVIRAIS	45
1.2.7 MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS	45
2 JUSTIFICATIVA	47
3 OBJETIVO.....	48
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4 METODOLOGIA.....	49
4.1 ORIGEM DAS MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS.....	49
4.2 CULTIVO DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS	53
4.3 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS.....	53
4.4 CÉLULAS E VÍRUS	53
4.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	54
4.6 SCREENING DE EXTRATOS NA REPLICAÇÃO VIRAL	55

4.7 DETERMINAÇÃO DO EC ₅₀	55
4.8 ENSAIO ANTIVIRAL FUNCIONAL - DETERMINAÇÃO IC ₅₀	56
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5 RESULTADOS	57
5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS.....	57
5.2 OS EXTRATOS INIBEM A REPLICAÇÃO DA GRIPE EM MAIS DE 80%	57
5.3 DETERMINAÇÃO DO EC ₅₀ E AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (SI).....	61
5.4 INIBIÇÃO DA NEURAMINIDASE E DETERMINAÇÃO DO IC ₅₀	63
5.5 DETERMINAÇÃO DE EC ₅₀ E IC ₅₀ DOS VÍRUS INFLUENZA A E B SENSÍVEIS E RESISTENTES AO OSELTAMIVIR (OST)	63
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÃO.....	68
8 PERSPECTIVAS	69
9 REFERÊNCIAS	70
ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INDEXADA PEERJ.....	80

1 INTRODUÇÃO

Comumente conhecida como gripe, a influenza, é uma doença infecciosa aguda do trato respiratório causada pelo vírus Influenza, que pode atingir anualmente cerca de 5 milhões de pessoas e causar cerca de 250 a 650 mil mortes em todo o mundo (IULIANO et al., 2018a). Crianças, idosos portadores de doenças crônicas e pacientes imunossuprimidos, são considerados um grupo de risco, e podem desenvolver complicações mais sérias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). O vírus Influenza está distribuído globalmente, ocorrendo geralmente na forma sazonal ou epidêmica (TUMPEY; BELSER, 2009). O vírus Influenza, possui uma capacidade de sofrer mutações frequentes, sendo assim, as epidemias e pandemias podem ocorrer quando a população entra em contato com uma nova variante desses vírus (ALIJA, 2009). A elevada capacidade de propagação do vírus Influenza, pode repercutir sobre a morbidade e a mortalidade do grupo de risco (BADIA LLACH et al., 2006). A infecção por Influenza pode apresentar-se assintomática ou com variados sintomas, com evolução benigna e autolimitada, ou até mesmo, causar mortes. As diferenças geográficas e condições sazonais, podem alterar a gravidade da doença. Essa gravidade pode variar também, em função da adaptação ou não do vírus ao seu novo hospedeiro (PEIRIS; POON; GUAN, 2009). O intenso comprometimento respiratório, é a principal causa de mortalidade, elevando a gravidade clínica do paciente que se encontra no grupo de risco. Esse intenso comprometimento respiratório associado aos quadros graves de influenza é descrito como síndrome respiratória aguda grave (SRAG) (RESTREPO; MAZO; ANZUETO, 2010).

No Brasil, as infecções por influenza ocorrem durante todo o ano, porém são mais frequente nos meses mais frios como o outono e o inverno, quando as temperaturas caem, principalmente no sul e sudeste do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.1 O VÍRUS INFLUENZA

O vírus Influenza pertence à família *Orthomyxoviridae* e de acordo com perfis antigênicos característicos, são subdivididos em quatro gêneros: A, B, C e D, comumente referidos como influenza “tipos” A, B, C e D (BUSH, 2007), entretanto, apenas os tipos A e B têm relevância clínica em humanos (FLYNN et al., 2018). Os principais determinantes antigênicos dos vírus da Influenza A e da Influenza B são as glicoproteínas de superfície, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) (PALESE; SHAW, 2007). Representação esquemática da partícula viral pode ser vista na Figura 1.

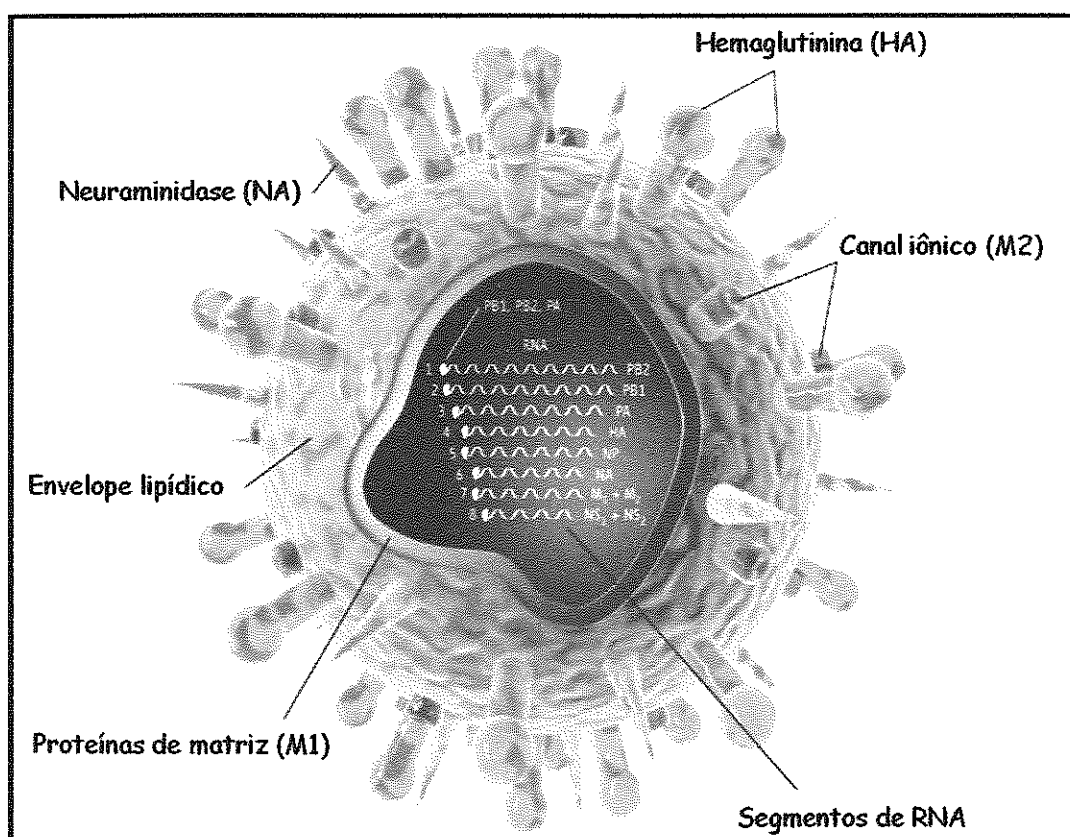


Figura 1 - Representação esquemática do vírus Influenza A. As glicoproteínas HA e NA encontram-se inseridas no envelope lipídico, bem como a proteína M2, que forma o canal iônico do vírus. Abaixo do envelope encontra-se a proteína de matriz M1 e, internamente à matriz estão os segmentos de RNA. Fonte: Adaptado de Kaiser, J. Science, 2006.

Os vírus Influenza A são classificados de acordo com as glicoproteínas (HA e NA). Até o momento foram descritas 18 HA (H1 a H18) e 11 NA (N1 a N11). Sua

completa nomenclatura inclui o tipo do vírus, o hospedeiro de origem (exceto quando humano), o local onde foi isolado, o número da cepa e o ano do isolamento, seguido do subtipo antigênico de HA e NA entre parênteses. Como exemplo pode ser citado o vírus Influenza A/Califórnia/4/2009 (H1N1). Subtipos antigênicos de Influenza B,C e D não têm sido descritos (FLYNN et al., 2018). As partículas virais são constituídas de 0,8 a 1% de RNA, 70% de proteína, 20% de lipídios, 5 a 8% de carboidratos. Seu genoma é constituído de RNA de fita simples, polaridade negativa, segmentado, envolvido por um capsídeo proteico de simetria helicoidal, composto pela proteína matriz e por um envelope lipoprotéico (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Pela sua composição química é sensível ao calor (56°C durante 30 minutos), pH ácido (3,0) e solventes lipídicos (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). Os vírus Influenza são pleomórficos e, geralmente, se apresentam sob a forma de partículas esféricas com um diâmetro de cerca de 100 nm, mas partículas filamentosas têm sido frequentemente observadas, com mais de 300 nm (PALESE; SHAW, 2007).

As partículas do vírus Influenza A possuem as espículas HA e NA com comprimento em torno de 10 a 14 nm respectivamente. Estas glicoproteínas são encontradas no vírion numa proporção de quatro HA para cada NA. Embora a HA seja o principal alvo para anticorpos neutralizantes, anticorpos contra a NA também podem reduzir a ocorrência e gravidade da doença, e possivelmente, prevenir a infecção, se presente em altos títulos (BUSH, 2007). A hemaglutinina é o principal antígeno viral que promove a adsorção da partícula aos resíduos de ácido siálico das células do sistema respiratório e após a endocitose da partícula, induz a fusão do envelope viral à membrana interna do endossoma, permitindo a liberação do genoma viral no citoplasma celular. A neuraminidase é outra glicoproteína de superfície e tem atividade de sialidase (cliva o ácido siálico), sendo fundamental ao brotamento do vírus da superfície celular para infectar novas células.

O genoma do vírus da Influenza A possui 10 genes em 8 segmentos (BUSH, 2007; BEHRENS et al., 2006). Cada segmento codifica importantes proteínas, cujas funções encontram-se descritas na Tabela 1. As proteínas básicas 1 e 2 (PB1 e PB2) são componentes do complexo polimerase, tendo como função o reconhecimento do iniciador 7-metil guanina do RNA mensageiro celular, atividade endonucleásica e extensão da cadeia, respectivamente. A proteína ácida (PA)

completa o complexo polimerase. A nucleoproteína (NP) tem função de proteção e importação do RNA para o núcleo celular. A proteína de matriz (M1) tem função estrutural, interage com as RNPs e glicoproteínas de superfície. M2 é uma proteína de membrana, tem função de canal iônico e montagem. A NS1 é uma proteína não estrutural multifuncional e a NEP/NS2 atua na exportação nuclear dos RNPs virais. Mais recentemente, outra proteína foi descoberta, a PB1-F2 (PALESE; SHAW, 2007). A maioria das proteínas virais desempenha um papel direto na virulência. Atualmente, as proteínas mais relacionadas ao potencial patogênico são a HA, PB1, PB2 e NS1. As mais associadas com o desenvolvimento de resistência a drogas antivirais são NA e M2 (ARIAS et al., 2009).

Tabela 1 - Proteínas do vírus Influenza A e respectivas funções.

Seguimento	Proteína	Função
1	PB2	Componente da RNA polimerase, reconhecimento
2	PB1	Componente da RNA polimerase; atividade de endonuclease; e alongamento
3	PA	Componente da RNA polimerase
4	HA	Glicoproteína de superfície; receptor de ligação; atividade de fusão; e maior antígeno
5	NP	Ligação e síntese de RNA
6	NA	Glicoproteína de superfície; e atividade de sialidase
7	M1	Proteína de matriz e membrana; e interação com as RNPs virais e glicoproteínas
	M2	Proteína de membrana; e canal iônico
8	NS1	Proteína não estrutural multifuncional. Inibidora da resposta imune inata
	NS2	Proteína de exportação nuclear das RNPs virais do núcleo para o citoplasma celular

Fonte: Adaptado de Palese e Shaw (2007).

Dois aspectos do genoma do vírus Influenza permitem uma grande flexibilidade de evolução: 1- o vírus tem um genoma segmentado, favorecendo o rearranjo de segmentos; 2- o complexo polimerase viral não possui nenhum mecanismo de revisão para corrigir erros de replicação (BUSH, 2007).

Os vírus Influenza estão sujeitos a dois tipos de variações antigênicas, as menores ou *Antigenic drift* e as variações maiores, também chamadas de *Antigenic shift*.

Variações antigênicas menores (*Antigenic drift*): durante a replicação viral, mutações decorrentes da baixa fidelidade do complexo polimerase ocorrem gerando mutações pontuais no genoma da progênie. Tais mutações pontuais podem resultar em mudanças nos aminoácidos que compõem as glicoproteínas de superfície, particularmente da hemaglutinina. Surgem então, novas variantes capazes de escapar da imunidade estimulada por infecção ou vacinação prévia.

Variações antigênicas maiores (*Antigenic shift*): são consequência de rearranjos gênicos caracterizados pela completa substituição de um ou mais segmentos do genoma viral. Essas alterações se devem ao reagrupamento entre vírus humanos e vírus que infectam outras espécies animais. Quando ocorrem rearranjos antigênicos entre amostras humanas e animais, a maioria da população não tem imunidade para os novos vírus e a doença se dissemina rapidamente, podendo afetar indivíduos de todas as faixas etárias. As grandes pandemias foram consequência de variações antigênicas maiores (FORLEO-NETO et al., 2003). Na Figura 2, podemos observar como pode ocorrer variações antigênicas do vírus Influenza A.

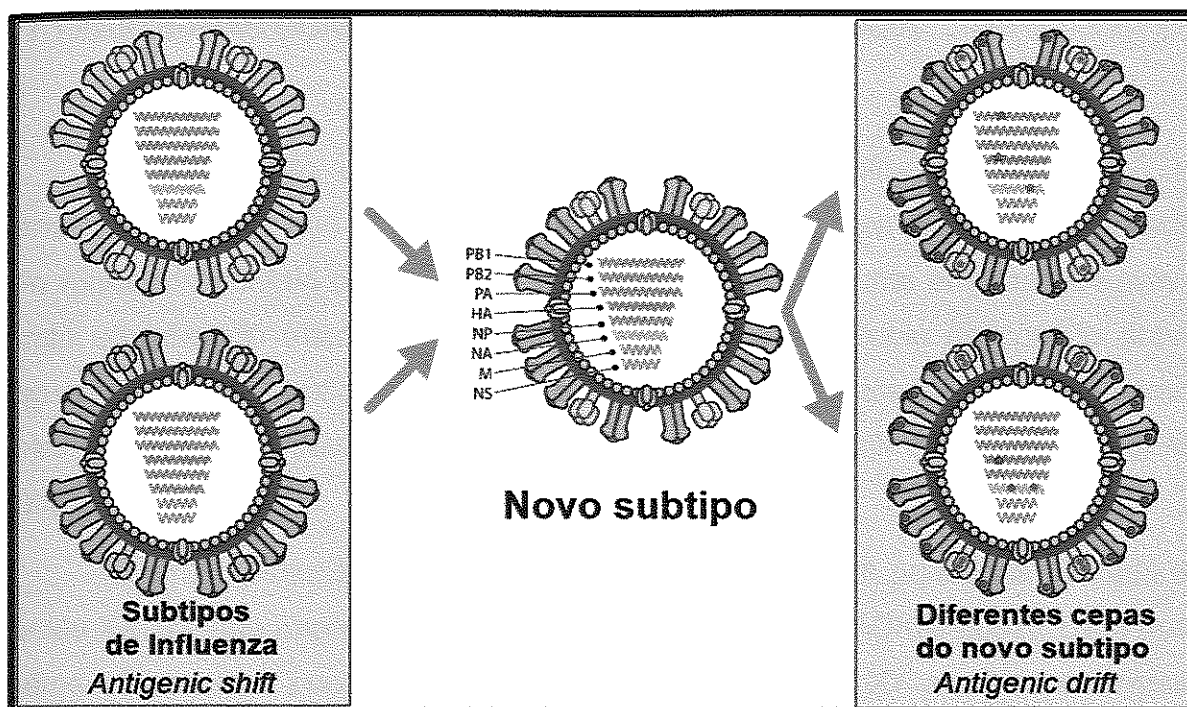


Figura 2 - Esquema mostrando como surgem o novo subtipo de vírus Influenza A e cepas de subtipos existentes. Fonte: Adaptado de VDU's blog - Influenza viruses (IFVs) - Ian M. Mackay. PhD. 2013.

Os vírus Influenza do tipo A infectam humanos, suínos, equinos, aves, focas, baleias (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008) e caninos (DESHPANDE et al., 2009); os do tipo B infectam humanos (MARGARET HUNT; HUNT, 2016) e focas (OSTERHAUS, 2000) e os do tipo C infectam humanos, suínos (BRASIL, 2009a) e caninos (MANUGUERRA et al., 1993). Apenas um subtipo de HA e um de NA são reconhecidos no Influenza B (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007).

O primeiro relato de transmissão interespecíes envolvendo porcos ocorreu em 1938, quando Shope apresentou evidência sorológica de transmissão de um vírus humano a porcos. Maior evidência de transmissão de vírus entre estas duas espécies ocorreu em 1976, quando um vírus suíno (H1N1) foi isolado de um soldado que tinha morrido de infecção por influenza em Nova Jersey. Posteriormente este vírus foi isolado de outros cinco soldados e estudos sorológicos sugeriram que mais de 500 pessoas foram infectadas (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007).

1.1.1 PANDEMIAS OCASIONADAS PELOS VÍRUS INFLUENZA

O surgimento de um novo subtipo do vírus Influenza, ocasionou as pandemias de gripe nos últimos dois séculos. Estes vírus, com os quais a população não havia tido contato prévio, foram capazes de provocar uma enfermidade grave, tendo um elevado índice de morbidade e mortes. A ausência de contato prévio sugere que estes subtipos virais emergentes sejam produtos de rearranjo gênico entre os vírus que infectam o homem e os que infectam animais (OKAZAKI et al., 2000).

O vírus Influenza A/H1N1 foi o causador da primeira pandemia relatada do século XX, a Gripe Espanhola (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007). Logo após outros três eventos pandêmicos ocorreram, dois no século XX e um recentemente no século XXI. A Figura 3 mostra esquematicamente os períodos pandêmicos e os vírus que circularam durante estes períodos.

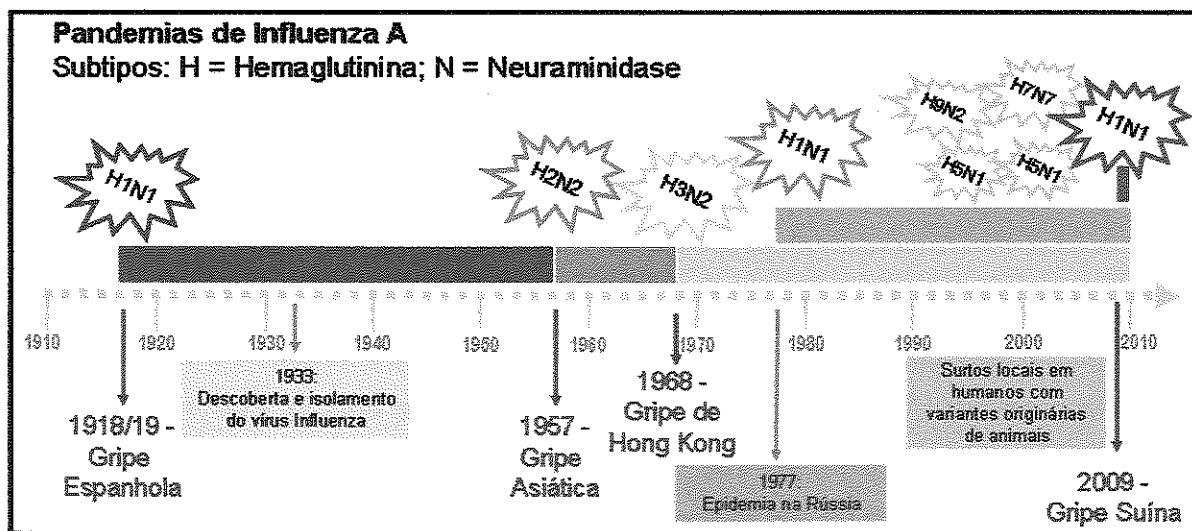


Figura 3 - Linha do tempo demonstrando as pandemias ocasionadas pelos vírus Influenza A ocorridas nos séculos XX e XXI. Fonte: Adaptado de WHO.

Entre os anos de 1957 e 1958, uma nova estirpe de Influenza A/H2N2 foi identificada na província de Yunan, na China (SCHOLTISSEK et al., 1978). Rapidamente, esta cepa dispersou-se para Hong Kong, atingindo também Singapura, Taiwan e Japão. Em apenas seis meses, o vírus espalhou-se por todo o

mundo, dando origem à pandemia chamada Gripe Asiática. Os indivíduos idosos e muito jovens, foram os mais atingidos; a maioria das mortes ocorreu devido à pneumonia bacteriana secundária (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007). Após rearranjo entre os segmentos gênicos de HA e PB1 (constituente da RNA polimerase viral), advindos de patos selvagens, e os outros seis segmentos gênicos do próprio subtipo H2N2, o subtipo de Influenza A/H2N2 foi substituído pelo subtipo A/H3N2, no ano de 1968 (SCHOLTISSEK et al., 1978). Esta nova pandemia ficou conhecida como Gripe de Hong Kong, e foi caracterizada por apresentar baixos índices de mortalidade, quando comparada com as duas pandemias anteriores, possivelmente, em decorrência de modificação em apenas uma estrutura na superfície viral, o segmento gênico hemaglutinina (HA) e também pela presença de anticorpos nos indivíduos com mais de sessenta anos (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007). O subtipo H1N1 reapareceu na Rússia em 1977, tornando-se epidêmico (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007). Porém, não sendo substituído pelo subtipo H3N2; o vírus Influenza B, juntamente com esses dois subtipos de Influenza A, passaram a circular mundialmente entre a população. Sendo possível um destes vírus sazonais, torna-se epidêmico em determinado ano (HILLEMANN, 2002).

Um surto de gripe provocado pelo subtipo de Influenza A/H5N1 de origem aviária aconteceu em Hong Kong no ano de 1997, com 18 pessoas sendo infectadas, levando seis delas ao óbito (HIROMOTO et al., 2000). Surtos em vários países da Ásia vêm sendo reportados e monitorados constantemente desde então (Centers for Disease Control and Prevention, 2009). Com este evento, a população mundial ficou em alerta para ocorrência de uma possível pandemia de influenza causada por H5N1, planos de preparação para pandemia logo foram desenvolvidos, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e por diversos países (WHO, 2009a BRASIL, 2006;). Devido à baixa transmissibilidade entre humanos, este subtipo não se tornou epidêmico (BENDER et al., 1999). A celeridade na obtenção dos resultados permitiu a rápida identificação e eliminação das aves contaminadas, especialmente nos países do continente asiático, onde os mercados de animais vivos costumam ser comuns, sendo uma ótima oportunidade para o rearranjo entre diferentes subtipos de Influenza. A transmissão direta da cepa circulante de Influenza A/H5N1 entre galinhas para o homem, foi comprovada, eliminando, neste caso, a etapa intermediária da adaptação viral em suínos (WEBSTER, 1998).

Outros subtipos incomuns para o homem, como A/H9N2 (XU et al., 2004) e A/H7N7 (KOOPMANS et al., 2004), transmitidos a partir de aves já foram identificados em humanos. Entretanto tais infecções foram pontuais, sem maior importância epidemiológica, quando comparadas aos demais subtipos.

A primeira pandemia do século XXI, ocorreu em 2009, com o surgimento da nova linhagem de Influenza A/H1N1, e ficou conhecida como A(H1N1) pdm09. O vírus teve a sua circulação iniciada no México e Canadá, e espalhou-se rapidamente por todo o mundo. Este novo vírus foi produto de um rearranjo gênico entre as linhagens suínas, clássica norte-americana e euroasiática, uma linhagem aviária norte-americana, e uma linhagem sazonal de H3N2. Com uma taxa de transmissibilidade elevada entre humanos, o vírus A(H1N1) pdm09 passou a circular na população juntamente com o H3N2, logo após a pandemia, tornando-se assim, um Influenza sazonal, e foi incluído nas vacinas de 2010 até 2018. Estima-se que esse vírus tenha sido introduzido na população mexicana e norte-americana, em um único evento (JAIN et al., 2013), com uma alta taxa de transmissibilidade entre humanos.

O domínio mais variável da molécula hemaglutinina HA viral é a porção HA1 (WILEY; SKEHEL, 1987). Uma rápida mudança antigênica nesta glicoproteína de superfície e novos sítios de glicosilação, são encontrados mais frequentemente em humanos (SETTEMBRE; DORMITZER; RAPPUOLI, 2010). Ao contrário do que já vinha sendo observado com a circulação do vírus Influenza A/H1N1 sazonal, os jovens foram os mais acometidos ao longo da pandemia do vírus A (H1N1) pdm09 (JAIN et al., 2013). A não existência de anticorpos contra essa nova cepa entre jovens, explicaria essa inversão na faixa etária acometida pelo vírus Influenza pandêmico de 2009.

Segundo a OMS, para caracterização de um evento pandêmico existem seis fases ou níveis de alerta, como mostra a Figura 4 (WHO, 2015).

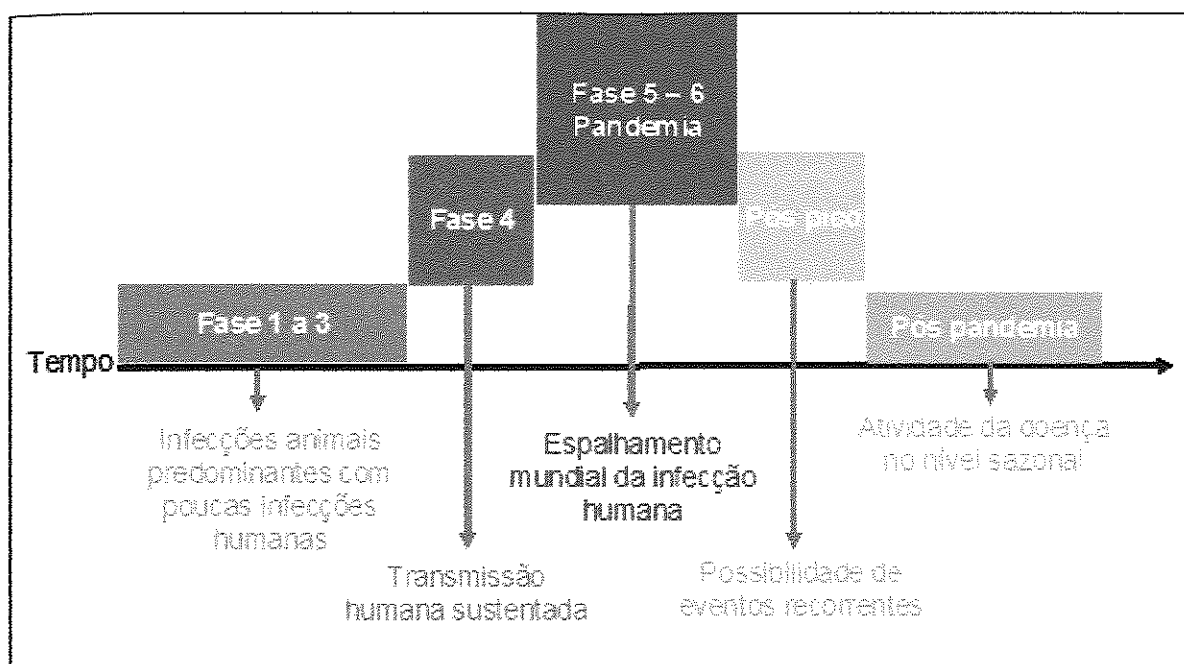


Figura 4 - Fases que caracterizam uma pandemia de Influenza. Fonte: Adaptado de WHO (2015).

Durante a primeira fase, nenhum vírus que circula em animais é detectado em humanos. Sendo encontrados entre a população, apenas os vírus sazonais. A fase dois compreende a circulação de vírus entre animais domésticos ou selvagens, sem infecção em humanos. Contudo, o potencial pandêmico do patógeno circulante é considerado nesta etapa. Na fase três, ocorrem casos esporádicos em humanos, através da transmissão animal-humano. Contudo, esta transmissão é limitada não ocorrendo homem a homem. Durante a fase quatro, a transmissão passa a ser sustentada entre humanos, com surgimento de surtos a nível comunitário. A fase cinco é caracterizada pela propagação do vírus em pelo menos dois países, sendo iminente a ocorrência de uma pandemia. A fase seis caracteriza a pandemia, propriamente dita. Nesta fase, ocorrem surtos em vários países simultaneamente. Após a fase pandêmica, entramos no período pós-pico, no qual há uma redução significativa no número de casos. Entretanto, existe a possibilidade de eventos recorrentes na população. Ao término do período pós-pico, temos o período pós-pandêmico, onde os vírus passam a circular no nível normal, como a gripe sazonal (WHO, 2015). O vírus Influenza A(H1N1) pdm09 passou a circular na população juntamente com o H3N2, logo após a pandemia de 2009, tornando-se assim, um Influenza sazonal que foi incluído nas vacinas de 2010 até 2018 ("WHO |

Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018 southern hemisphere influenza season", 2017).

1.1.2 CICLO REPLICATIVO VIRAL

O principal alvo da infecção por vírus Influenza em humanos são as células ciliadas do trato respiratório, por apresentarem resíduos siálicos nas suas membranas. Esses resíduos permitem a interação com a glicoproteína de superfície HA, possibilitando a penetração viral por endocitose (PALESE; SHAW, 2007).

A clivagem da HA e fusão da membrana endossomal com o envelope viral acontece apenas na presença de baixo pH. A acidificação ocorre pelo fluxo de prótons H^+ do citoplasma para o interior da partícula viral através dos canais iônicos formados pelas proteínas M2 (PINTO; LAMB, 2006). O pH ácido, entre cinco e seis, provoca uma mudança conformacional na HA, deixando expostos os domínios hidrofóbicos da proteína HA2, o que resulta na fusão do envelope viral com o endossoma. O pH ácido no endossoma também facilita a migração das RNPs para o citoplasma, devido à dissociação ácido dependente da proteína M1 (NAYAK; HUI; BARMAN, 2004).

As RNPs livres no citoplasma migram do citoplasma para o núcleo celular através de poros na membrana nuclear. Então, no núcleo, pela atividade do complexo da polimerase viral é iniciada a transcrição e a replicação do RNA viral (RNAv). No núcleo são produzidos os segmentos do genoma que entrarão na composição da progênie viral (PALESE; SHAW, 2007).

As proteínas virais como, a NP, o complexo RNA-polimerase e a M1 possuem sequência sinal de distribuição nuclear, enquanto as proteínas M2, NA e HA são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e passam pelo complexo de Golgi. No núcleo, as nucleoproteínas (NPs) e as proteínas do complexo RNA-polimerase associam-se aos ácidos ribonucleicos virais (RNAv) recém-sintetizados, formando as RNPs. As proteínas M1 interagem com as RNPs e migram para o citoplasma, sabe-se que a proteína NS2 tem um papel importante na saída das RNPs do núcleo para o citoplasma (NAYAK; HUI; BARMAN, 2004).

No citoplasma, ocorre a migração das RNPs protegidas pela proteína M1 até a membrana celular, onde são recobertas por um envelope lipídico contendo as glicoproteínas da superfície viral e a proteína M2 (PALESE; SHAW, 2007).

A NA é responsável pelo brotamento do vírus recém sintetizado, pois como citado, cliva o ácido siálico da superfície da membrana, impedindo assim a sua aglomeração ou retenção na superfície da célula, devido à interação da HA com os resíduos siálicos (NAYAK; HUI; BARMAN, 2004).

A replicação viral e o sítio de ação dos inibidores de neuraminidase (NAI) encontram-se esquematicamente representados na Figura 5 (VON ITZSTEIN, 2007).

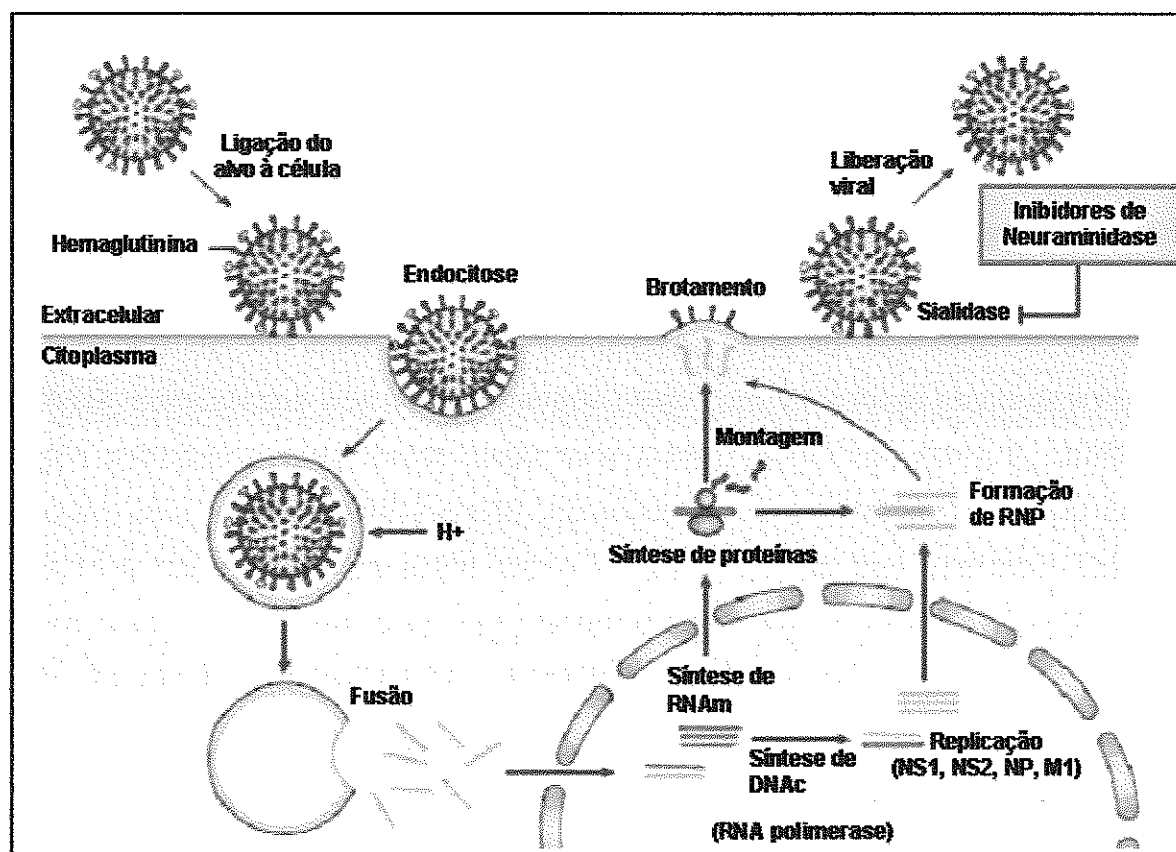


Figura 5 - Figura esquemática da replicação do vírus Influenza A e os sítios de ação dos inibidores de neuraminidase, antivirais utilizados no controle destes vírus. Fonte: Adaptado de Von Itzstein (2007).

1.1.3 TRANSMISSÃO

A transmissão do vírus ocorre por transmissão direta (pessoa/pessoa) através de pequenas gotículas de aerossol, que são expelidas por indivíduos infectados, a outros indivíduos suscetíveis ao falar, espirra e tossir. Ocasionalmente a transmissão pelo ar pode ocorrer, pela inalação de pequenas partículas residuais em ambientes fechados ou com maior aglomeração de pessoas, que podem ser levadas à distância maiores que um metro. Há evidências da transmissão pelo modo indireto, por meio de contato com as mãos às secreções dos indivíduos infectados, levando a introdução de partículas virais diretamente nas mucosas nasal, oral e ocular. A eficiência da transmissão indireta, depende da carga viral, e de fatores ambientais (temperatura e umidade), e do tempo transcorrido entre contaminação e contato com a superfície contaminada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Segundo o CDC (CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016), na influenza sazonal o indivíduo infectado pode transmitir o vírus um dia antes, até cinco a sete dias após o início dos sintomas. Pessoas com elevado grau de imunodepressão podem excretar vírus por semanas ou meses. As crianças, comparadas aos adultos, também excretam vírus mais precocemente, por longos períodos e com maior carga viral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Na infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09, observou-se que a transmissão de adultos infectados ocorria um dia antes até o 7º dia do início dos sintomas. Crianças menores de 12 anos de idade transmitiam o vírus um dia antes até o 14º dia de início dos sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A transmissão entre humanos é a mais comum, porém, já foram documentados casos revelando a transmissão do vírus Influenza A entre espécies diferentes, especialmente aves e suínos para o homem (DONATELLI et al., 2016). Os vírus estão presentes principalmente em fezes, sangue e secreções de aves infectadas, portanto a contaminação humana, ainda que rara pode ocorrer por meio da inalação dessas secreções (inclusive durante limpeza e manutenção de criadouros, sem equipamento de proteção individual - EPI) ou durante abate e manuseio de aves infectadas (DONATELLI et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.1.4 ASPECTOS CLÍNICOS

A frequência de infecções graves, com necessidade de hospitalização ocasionadas pelos vírus Influenza B, é cerca de quatro vezes menor que para as infecções pelo vírus Influenza A (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007). A influenza é uma infecção viral aguda do sistema respiratório e pode manifestar-se sob diferentes formas clínicas, causando desde infecções assintomáticas até pneumonia viral primária, com rápida evolução para o óbito (COX; SUBBARAO, 1999a; ECCLES, 2005). O período de incubação do vírus pode variar de 24 horas a 4-5 dias, sendo dependente do estado imunológico do hospedeiro e da carga viral (COX; SUBBARAO, 1999a; ECCLES, 2005).

O quadro clínico da influenza tem início repentino, com febre acima de 38°C, calafrios e tosse seca, cefaleia, seguido por mialgia e artralgia, mal-estar, prostração. A inflamação da conjuntiva também pode ocorrer, com excessivo lacrimejamento. Os sintomas sistêmicos costumam ser muito intensos nos primeiros dias da doença, a alta taxa de morbidade desta virose é caracterizada pela tosse e prostração que podem persistir por 1 a 2 semanas adicionais (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007). Porém, a doença é autolimitada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Algumas manifestações adicionais podem ser observadas em crianças, como: bronquite e bronquiolite; febre; acompanhado por convulsões; vômitos e dor abdominal, especialmente naquelas menores de três anos (COX; SUBBARAO, 1999; PRICE et al., 1976). Em recém-nascidos a infecção pode manifestar-se clinicamente com febre alta súbita, podendo levar ao óbito (MEIBALANE et al., 1977).

A alta taxa de mortalidade é devida por complicações pulmonares e pneumonia viral primária (COX; SUBBARAO, 1999b) e por um elevado número de internações hospitalares no Brasil. Estas complicações do trato respiratório inferior podem acometer tanto adultos quanto crianças, sendo mais frequente em idosos (WRIGHT et al., 2007). Sendo mais comuns as pneumonias bacterianas secundárias, sendo geralmente provocadas por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus* e *Haemophilis influenzae*. Nos imunocomprometidos, o quadro

clínico é geralmente mais demorado e, muitas vezes, mais grave. Gestantes com quadro de influenza no segundo ou terceiro trimestre de gravidez costumam ser mais propensas à internação hospitalar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A presença de vírus no sangue é rara nas infecções por Influenza. Em reduzidas quantidades, o vírus já foi isolado no sangue de pacientes no quarto dia de infecção. Na infecção natural ou experimental, o vírus pode ser detectado no sangue durante os três primeiros dias de infecção, nunca após este período. A viremia costuma ser mais comum nas infecções por Influenza A/H5N1 (JOHN H. BEIGEL et al., 2005).

As situações declaradamente de risco para as infecções por Influenza incluem doença pulmonar crônica (asma e doença pulmonar obstrutiva crônica – DOPC), doença metabólica crônica, cardiopatias, imunodeficiência ou imunodepressão, gestação, e doenças metabólicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

É muito importante para o diagnóstico laboratorial que a amostra seja de qualidade, devendo ser coletada de preferencialmente até o 4º ou 5º dia do início dos sintomas. Habitualmente, o aspirado de nasofaringe é mais adequado do que amostras se swab combinado de orofaringe e nasofaringe (Figura 6). Também podem ser utilizados, lavado brônquico e secreção traqueal, em pacientes que se encontram entubados (ZYL, 2006).

O diagnóstico laboratorial inclui a reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), imunofluorescência e hemaglutinação/inibição da hemaglutinação, isolamento viral, ensaios imunoenzimático (ELISA) e testes rápidos para o diagnóstico de influenza (RIDTs) para detecção de antígenos. A sensibilidade e a especificidade dos testes variam entre os diferentes métodos, o tipo de amostra usada e os resultados devem ser avaliados no contexto das informações clínicas e epidemiológicas. Testes sorológicos com uma única amostra de sangue não são recomendáveis para o diagnóstico de Influenza. Geralmente são realizados em

pesquisas de saúde pública utilizando amostras pareadas de sangue, uma na fase aguda da doença e outra na fase convalescente. A reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e o isolamento do vírus, são os testes padrão para confirmação da infecção pelo vírus Influenza (CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; ZYL, 2006).

O isolamento viral pode ser feito em ovos embrionados de galinha e em células de rim canino (MDCK - *Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells*). Os efeitos citopáticos são inespecíficos e vírus Influenza A podem ser detectados e subtipados do sobrenadante de cultura de células através das reações de RT-PCR, de imunofluorescência ou de inibição da hemaglutinação (VAN ZYL, 2006).

Em 2009, foi desenvolvido um protocolo de RT-PCR em tempo real (rRTPCR) para detecção do vírus Influenza A(H1N1) pdm09, pelo "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) de Atlanta.

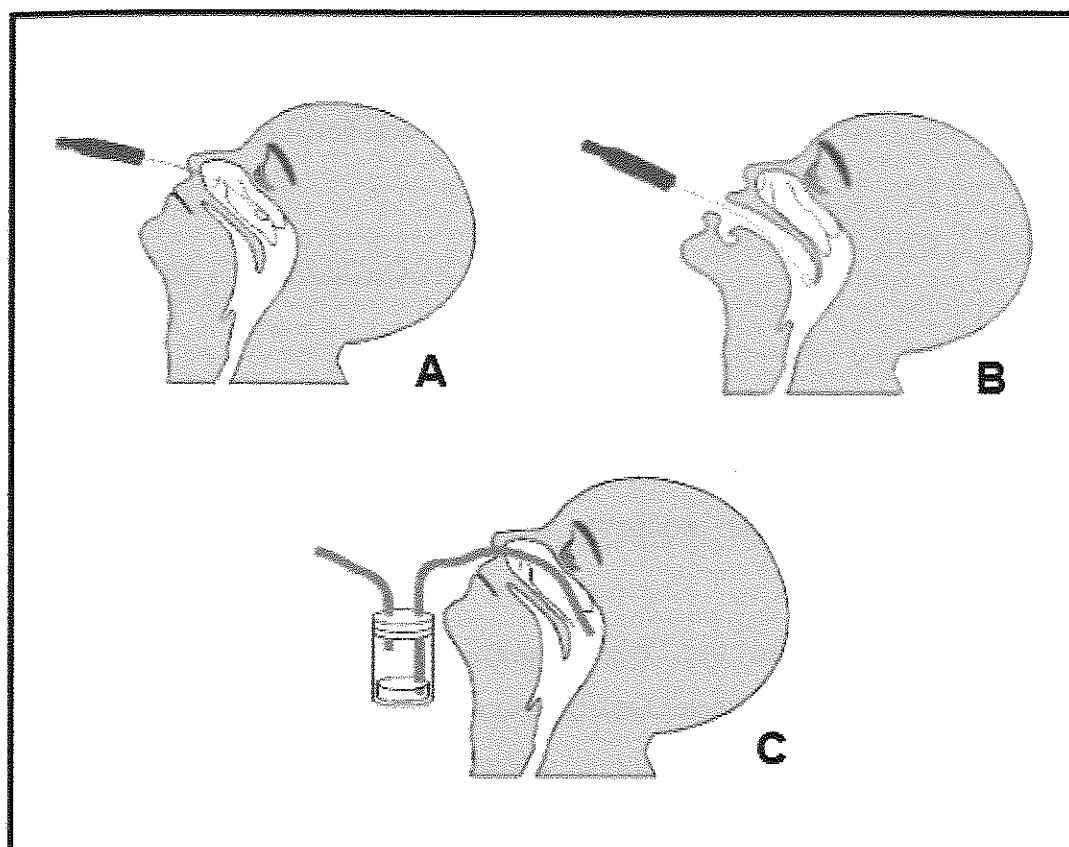


Figura 6 - Procedimento para coleta de secreção de nasofaringe, utilizando swab combinado nasal (A) ou orofaríngeo (B) e aspirado de nasofaringe (C). Fonte: Adaptado de Secretaria de vigilância em Saúde (2009).

1.1.6 EPIDEMIOLOGIA

O impacto das epidemias de influenza é reflexo da interação entre o shift ou drift antigênico, o nível de proteção da população para as cepas circulantes e o grau de virulência dos vírus (FORLEO-NETO et al., 2003).

A influenza é mais frequente nos meses do outono e inverno, quando as temperaturas caem, principalmente no sul e sudeste do país, mas ocorre durante todo o ano. Durante uma epidemia sazonal de influenza, cerca de 5% a 15% da população é infectada, resultando em aproximadamente 3 a 5 milhões de casos graves por ano e de 250 a 650 mil mortes no mundo, principalmente entre idosos e portadores de doenças crônicas (IULIANO et al., 2018b).

Anualmente, a mortalidade quanto a morbidade por influenza pode variar, dependendo do grau de imunidade da população geral e da população susceptível, e das cepas circulantes (CHEN; HOLMES, 2008).

1.1.7 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

Os vírus Influenza possuem características evolutivas e epidemiológicas (A. J. et al., 1999; CHEN; HOLMES, 2008), sendo assim, a rápida identificação de cepas mutantes, com potencial pandêmico e a constante vigilância, é de fundamental importância.

Na década de 40, já se compreendia que os vírus Influenza sofriam mutações, que as aves funcionavam como seus reservatórios, e que eles não eram estável, com isso, tornou-se necessário o monitoramento contínuo do agente etiológico da gripe (NICHOLSON; WOOD; ZAMBON, 2003).

No ano de 1947, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu uma rede de vigilância para o monitoramento da atividade dos vírus Influenza; que consiste em cinco principais centros de referência. Os centros estão localizados em Londres (Inglaterra), Melbourne (Austrália), Atlanta (EUA), Beijing (China) Tóquio (Japão) e são responsáveis por identificar e caracterizar novas cepas virais, enviadas por 142 centros nacionais em 115 países do mundo ("WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza - VIDRL", 2018). Segundo os dados informados por estes centros, a definição da composição anual das vacinas para influenza passou a variar.

No Brasil, a vigilância epidemiológica da influenza é composta por: vigilância sentinela de síndrome gripal (SG), vigilância universal de síndrome respiratória aguda grave (SRAG), e pela síndrome respiratória aguda grave (SRAG) em pacientes internados em UTI (Unidade de Terapia Intensiva). As unidades são distribuídas em todas as regiões do país com o objetivo de identificar os vírus respiratórios circulantes, permitindo assim o monitoramento dos atendimentos por essa doença. Estão ativas atualmente 247 Unidades Sentinelas, sendo 137 de SG; 110 de SRAG em UTI; e 17 sentinelas mistas de ambos os tipos (MINISTÉRIO DA

SAÚDE MS, 2018). A vigilância universal de SRAG é responsável pelo monitoramento dos casos de hospitalização e de óbitos, ela identifica o comportamento da influenza no país, e orienta na tomada de decisão em situações que possam requerer um posicionamento tanto Secretarias de Saúde Estaduais e Municipais, quanto do Ministério da Saúde. As informações sobre a vigilância sentinela de Influenza, são baseadas nos dados inseridos no Sivep-Gripe pelas unidades sentinelas espalhadas por todo Brasil. Os dados são coletados por meio de formulários padronizados e inseridos nos sistemas de informação online: SIVEP-Gripe e SINAN Influenza Web (MINISTÉRIO DA SAÚDE MS, 2018).

A Síndrome Gripal (SG) é caracterizada por: indivíduo com febre, mesmo que referida, acompanhada de tosse ou dor de garganta e com início dos sintomas nos últimos 07 dias; já a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), caracteriza-se por: indivíduo hospitalizado com febre, mesmo que referida, acompanhada de tosse ou dor de garganta e que apresente dispneia. Também podem ser observados os seguintes sinais: saturação de O₂ menor que 95% ou desconforto respiratório ou aumento da frequência respiratória.

Fazem parte da Rede nacional de vigilância do vírus Influenza para OMS e para o Ministério da Saúde (MS), o Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo (LVRS) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), localizado no Rio de Janeiro, o Instituto Adolfo Lutz (IAL), localizado em São Paulo e o Instituto Evandro Chagas (IEC), localizado em Belém (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.2 PREVENÇÃO E INIBIÇÃO

Atualmente, além da vigilância epidemiológica dos vírus Influenza, são adotadas mais duas estratégias para o controle da circulação viral no mundo, sendo elas, a utilização de drogas antivirais e a vacinação anual anti-influenza.

1.2.1 VACINAS

Os mecanismos evolutivos dos vírus Influenza os tornam capazes de escapar da resposta imune do hospedeiro, o que leva à formulação anual da vacina que é mundialmente (WHO, 2009).

As vacinas inativadas são particuladas e compostas, basicamente, pelas glicoproteínas de superfície HA e NA. Estas vacinas são trivalentes, conferindo imunidade para os três vírus Influenza de maior importância epidemiológica: A/H1N1, A/H3N2 e B (WHO, 2018a).

Em 1999, foi incorporada no Programa Nacional de Imunizações do Brasil, uma estratégia de vacinação contra a influenza, com o propósito de reduzir internações, complicações e mortes na população alvo para a vacinação (crianças menores de 5 anos de idade, gestantes, adultos com 60 anos ou mais, portadores de doenças crônicas não transmissíveis e outras condições clínicas especiais).

O Ministério da Saúde em 2018, por meio da Coordenação-Geral do Programa Nacional de Imunizações (CGPNI), do Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde, lança a 20ª Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza, no período de 23 de abril a 1 de junho, sendo 12 de maio, o dia de mobilização nacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A composição e a formulação das vacinas influenza utilizadas neste ano de 2018 no Brasil, estão descritas na RE 2.696/2017. As vacinas influenza trivalentes que serão utilizadas deverão conter obrigatoriamente, três tipos de cepas de vírus em combinação que foram descritas na Figura 7.

As vacinas influenza quadrivalentes deverão conter cepas do vírus Influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09, vírus Influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), vírus Influenza B/Phuket/3073/2013; além de uma cepa do vírus similar ao vírus Influenza B/Brisbane/60/2008 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

RESOLUÇÃO - RE Nº 2.696, DE 6 DE OUTUBRO DE 2017

O Gerente-Geral Substituto de Medicamentos e Produtos Biológicos no uso das atribuições que lhe foram conferidas pela Portaria No- 600, de 10 de abril de 2017, aliado ao disposto no art. 54, I, § 1º da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 61, de 3 de fevereiro de 2016 e no parágrafo único do art. 1º da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 151, de 20 de abril de 2017, resolve:

Art. 1º As vacinas influenza a serem comercializadas ou utilizadas no Brasil no ano de 2018 deverão estar em conformidade com o disposto nesta Resolução.

Art. 2º As vacinas influenza trivalentes a serem utilizadas no Brasil a partir de fevereiro de 2018 deverão conter, obrigatoriamente, três tipos de cepas de vírus em combinação, e deverão estar dentro das especificações abaixo descritas:

- um vírus similar ao vírus influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09;
- um vírus similar ao vírus influenza A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2); e
- um vírus similar ao vírus influenza B/Phuket/3073/2013.

Art. 3º As vacinas influenza quadrivalentes contendo dois tipos de cepas do vírus influenza B deverão conter um vírus similar ao vírus influenza B/Brisbane/60/2008, adicionalmente aos três tipos de cepas especificadas no Art. 1º.

Art. 4º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

Figura 7 - Descrição das cepas utilizadas nas vacinas influenza trivalentes, Resolução - RE Nº 2.696. Fonte: Diário Oficial da União (DOU) do dia 9 de outubro a RE 2.696/2017.

Anualmente, são feitas modificações nas vacinas influenza sazonais contra as cepas virais em circulação. A Organização Mundial da Saúde (OMS), recomenda as cepas virais que deverão ser utilizadas na produção das vacinas no hemisfério sul, essa recomendação é geralmente feita no mês de setembro de cada ano. A Anvisa publica uma Resolução (RE) onde define a composição das vacinas influenza que serão utilizadas no país no ano seguinte (Figura: 7), em conformidade com as determinações da OMS (Governo do Brasil, com informações da Anvisa).

1.2.2 ANTIVIRAIS

Existem duas classes de antivirais utilizadas para o tratamento das infecções por Influenza, aprovadas pela agência reguladora americana, *Food and Drug Administration* (FDA). São eles: inibidores do canal de prótons M2 e inibidores de neuraminidase (Figura 8).

Um novo inibidor da endonuclease cap-dependente recebeu aprovação global em 23 de fevereiro de 2018, para o tratamento de infecções por vírus Influenza A e B no Japão. O baloxavir marboxil (XofluzaTM; baloxavir) ao contrário dos inibidores da neuraminidase que impedem a liberação viral das células hospedeiras infectadas, bloqueia a proliferação do vírus inibindo a iniciação da síntese de mRNA (HEO, 2018).

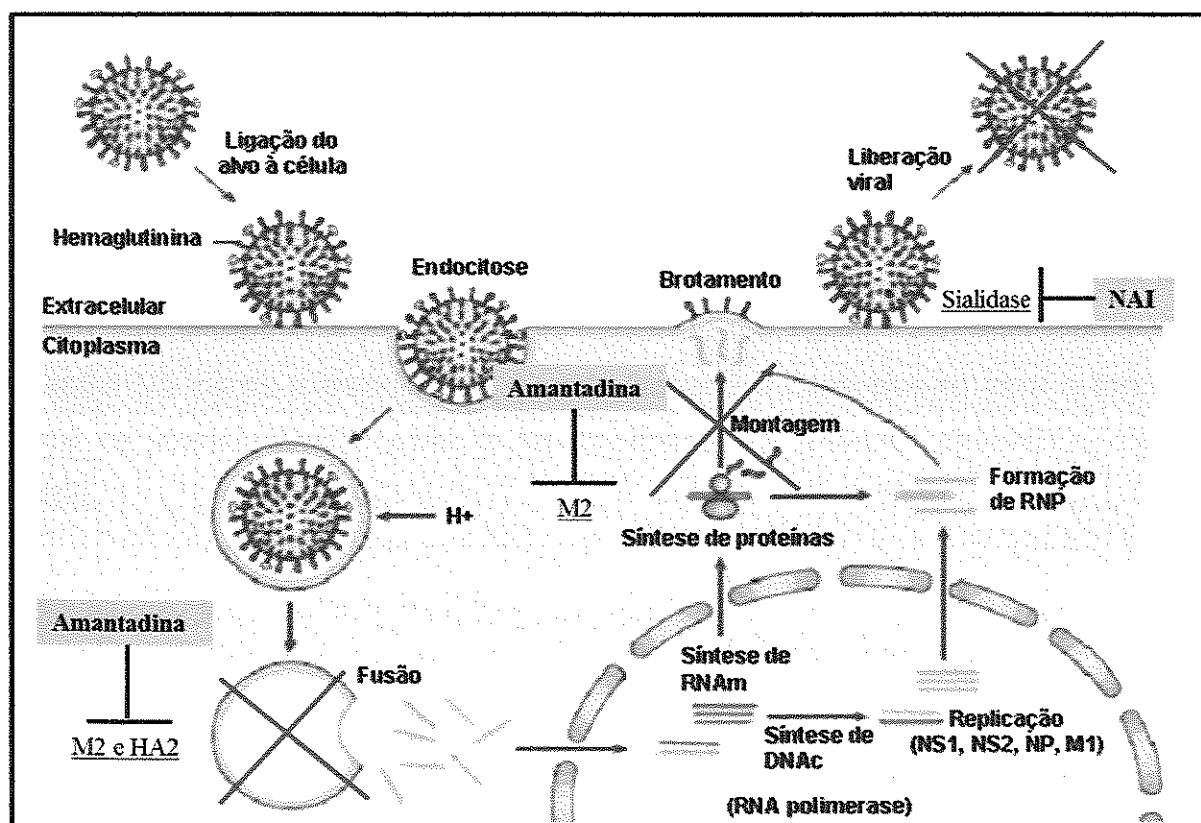


Figura 8 - Ciclo replicativo do Influenza A e etapas de atuação dos principais inibidores. Amantadina inibe o canal M2 de prótons e os NAI inibem a enzima sialidase. Os antivirais estão destacados em retângulos cor laranja, as proteínas alvo estão sublinhadas e o resultado da atividade anti-influenza está mostrado com um X em vermelho. Fonte: Adaptado de von Itzstein (2007).

1.2.3 INIBIDORES DO CANAL M2

Os adamantanos (Amantadina e Rimantadina) foram a primeira classe de droga anti-influenza utilizada e atuam bloqueando os canais de prótons M2, inseridos no envelope lipídico dos vírus Influenza A. Estes canais são importantes para o influxo de prótons em dois momentos da replicação viral. O primeiro deles é a fusão do envelope lipídico viral à membrana do endossoma, através da modificação da subunidade HA2 (Figura 8) (VENKATARAMAN; LAMB; PINTO, 2005). O segundo é a síntese de proteínas no golgi, que depende do gradiente de pH entre o lúmen desta organela e o citoplasma da célula, para prevenir mudanças conformacionais prematuras na hemaglutinina durante seu transporte para a membrana plasmática (Figura 8) (VENKATARAMAN; LAMB; PINTO, 2005). A emergência de cepas de Influenza A resistentes a estas drogas têm sido observadas em diversos países. Os vírus A(H1N1) pdm09 são naturalmente resistentes a esta classe de drogas (DEYDE et al., 2010; SAITO; LI; SUZUKI, 2007). Além do problema da resistência, os adamantanos são neurotóxicos, pois também impedem o influxo de íon no sistema nervoso central.

Devido ao tipo de interação que ocorre entre M2 e os adamantanos, a proteína M2 pode sofrer uma mutação que a torna resistente a estas drogas sem perder sua atividade. A mutação mais frequente é a S31N. Com esta mudança, a proteína M2 perde a estabilidade quando fechada e consegue se abrir e formar o canal de prótons mesmo como a Amantadina ligada (PIELAK; SCHNELL; CHOU, 2009).

1.2.4 INIBIDORES DA NEURAMINIDASE (NAI)

Desde 1999/2000, os NAI (Oseltamivir; Tamiflu®, Roche e Zanamivir; Relenza®, GlaxoSmithKline) têm sido utilizados para o tratamento de infecções pelos vírus Influenza dos gêneros A e B (FORLEO-NETO et al., 2003). No Brasil, o antiviral Oseltamivir (administrado oralmente) é vendido apenas sob prescrição médica (ANVISA), sendo indicado apenas para os pacientes que apresentam

Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) ou pacientes com comorbidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Estes inibidores ligam-se de forma competitiva ao sítio ativo da enzima viral neuraminidase, impedindo que ocorra a clivagem do ácido siálico e consequente liberação do vírus influenza no trato respiratório (Figura 8). Este mecanismo de inibição pode ser justificado pela semelhança entre as estruturas químicas dos NAI com o ácido siálico (substrato para a clivagem da NA) (Figura 9).

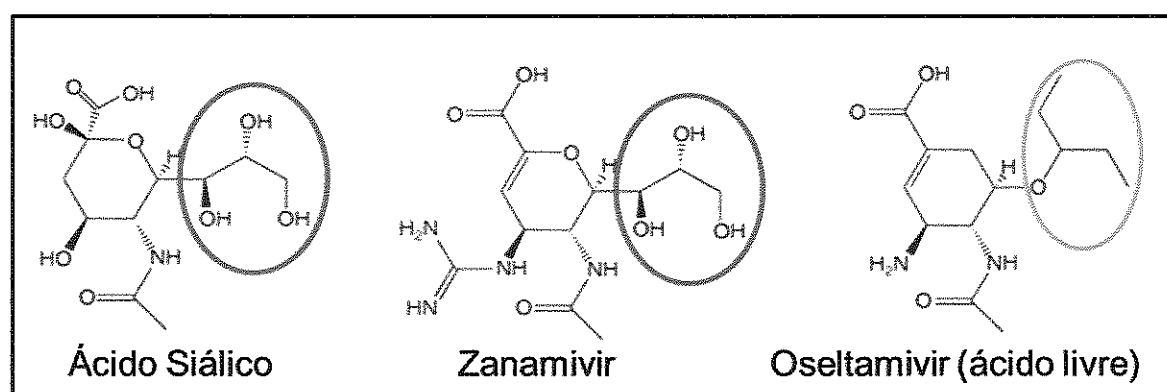


Figura 9 - Comparação estrutural entre o ácido siálico e os NAI. Estruturas químicas do ácido siálico, zanamivir e oseltamivir. A principal diferença entre elas são os grupos glicérol (marcados com círculos vermelhos) e L-ethylpropoxy (marcado com círculos vermelhos) e L-ethylpropoxy (marcado com círculo azul) (A). Fonte: Das e col., 2010.

1.2.5 RESPOSTA IMUNE INATA À INFECÇÃO POR INFLUENZA A

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra as infecções, seus mecanismos são rapidamente ativados pelos microrganismos antes do desenvolvimento de anticorpos específicos. A principal citocina envolvida com a resposta antiviral inata é o interferon tipo I (IFN). Esta molécula induz a expressão de proteínas celulares que atuam na resposta antiviral.

Estudos têm mostrado que os genes codificadores das proteínas transmembranas induzidas por IFN, tipos I e II, são os primeiros a serem estimulados em infecções virais. Estas proteínas são conhecidas como IFITM (interferon inducible transmembrane proteins) (SMITH et al., 2014).

As IFITM são formadas por cerca de 130 aminoácidos que se dividem em duas porções transmembranares variáveis e uma porção citoplasmática conservada. Nos humanos existem 5 genes codificadores para estas proteínas (ifitm1, ifitm2, ifitm3, ifitm5 e ifitm10), todos localizados no cromossomo 11 (SMITH et al., 2014). De forma pioneira, a maior parte destes genes foi primeiramente identificado durante um screening de cDNA em células de neuroblastoma tratado com IFN, em 1984 (FRIEDMAN et al., 1984). Porém, sua participação como inibidores das infecções virais só foi observada em 2004 (MARTENSEN; JUSTESEN, 2004).

Em 2009, as IFITM foram identificadas como importantes fatores restritivos à infecção pelos vírus Influenza A H1N1, West Nile e Dengue (BRASS et al., 2009). Já em 2011, estas proteínas foram descritas como restritivas a entrada na célula hospedeira dos vírus Marburg, Ebola, Coronavírus SARS e Influenza A (HUANG et al., 2011), além de inibir a replicação do HIV-1 (LU et al., 2011).

Em relação ao vírus Influenza A a IFITM do tipo 3, principalmente, é apontada como inibidora de sua penetração na célula hospedeira em ensaios *in vitro*. Além disso, em ensaios de infecção experimental por Influenza A, em camundongos knockout para o gene desta proteína, foi observado que sua expressão é essencial para a proteção do hospedeiro, sendo por tanto, capaz de diminuir a morbidade e a mortalidade (EVERITT et al., 2012) *in vivo*.

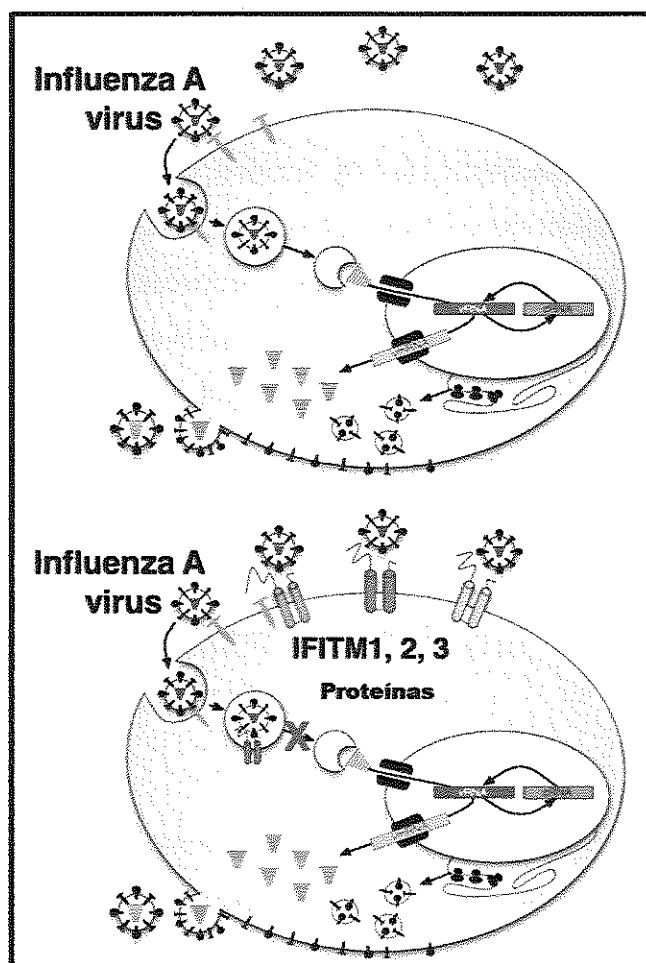


Figura 10 - Papel restritivo das IFITM sobre a infecção por Influenza A. Os vírus Influenza A utilizam o ácido siálico (em cor laranja) da célula como receptor. Após a endocitose, ocorre a fusão do envelope lipídico viral com a membrana da célula hospedeira. O RNA viral é liberado no citoplasma e transportado até o núcleo, onde ocorre a síntese de RNA mensageiro viral e RNA genômico, prosseguindo desta forma a replicação viral. As IFITM (mostradas nas cores roxa, vermelha e amarela) atuam impedindo a fusão do envelope viral a membrana do endossoma, o que interrompe todo o processo de replicação do Influenza. Fonte: Stephen Ellendge/HHMI at Brigham and Women's Hospital

O processo de inibição da fusão do Influenza A pelas IFITM ainda não é totalmente conhecido. Porém, dados da literatura mostram que o efeito destas proteínas não ocorre nas etapas de ligação do vírus ao seu receptor, nem tem influência na redução de pH que precede a fusão, mas sim no momento em que ocorre o início da fusão (hemifusão) entre o envelope e a membrana. Observou-se que quando o processo de hemifusão é abreviado e ocorre rapidamente a fusão completa, a IFITM deixa de ter papel restritivo. Por outro lado, se este processo é prolongado os efeitos restritivos são ainda maiores (LI et al., 2013).

1.2.6 BUSCA POR NOVOS ANTIVIRAIS

O oseltamivir (OST, um inibidor da neuraminidase) é o principal antiviral usado na clínica durante os surtos. No entanto, já foram identificadas cepas de vírus Influenza A(H1N1)pdm09 resistentes a este antiviral em uma prevalência de 1 a 2%, independente do uso desta molécula. Assim, a busca por novos medicamentos anti-influenza é extremamente importante. Atualmente, vários grupos vêm desenvolvendo estudos descrevendo o potencial biotecnológico de microalgas e cianobactérias, incluindo a atividade antiviral de seus extratos. No Brasil, esse potencial é pouco conhecido e explorado.

1.2.7 MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS

Sob a denominação microalgas estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular: estrutura procariótica, com representantes nas Divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta; estrutura celular eucariótica, com representantes nas Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta (DERNER et al., 2006).

As microalgas fazem parte da cadeia trófica aquática, sendo fonte de nutrientes e energia para os demais organismos. Estima-se que existam mais de 50.000 espécies diferentes de algas no mundo e cerca de 30.000 espécies foram identificadas, gerando assim, um grande número de produtos com potencial biotecnológico (FRAC; JEZIERSKA-TYS; TYS, 2010).

As microalgas compõem um diversificado grupo de microrganismos eucariotos fotossintetizantes que são encontrados em ambientes marinho, salobro e de água doce, podendo apresentar diferentes formas e organização celular (unicelular, colônia ou filamentosa), podendo também ser móvel ou não, apresentando diferentes funções ecológicas. Cerca de 90% do peso das microalgas, é composto de proteínas, carboidratos e óleos. Elas também são ricas em vitaminas, pigmentos e compostos biologicamente ativos. Esses compostos descritos podem

ser extraídos e utilizados pelas indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentar (HU, 2013).

Além destas finalidades, dados da literatura mostram que extratos de microalgas geram produtos com atividade antitumoral (SHANAB et al., 2012), anti-histamínica (BAE et al., 2013), o que torna promissor o estudo de moléculas extraídas a partir destes organismos frente a replicação dos vírus Influenza.

2 JUSTIFICATIVA

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que a gripe é uma doença que afeta com gravidade de 3 a 5 milhões de pessoas em todo o mundo promovendo, anualmente, de 290 a 650 mil mortes. A gravidade da doença pode ser ainda maior quando surgem cepas pandêmicas, para as quais a população tem pouca ou nenhuma imunidade, podendo aumentar a taxa de mortalidade em até dez vezes (WHO, 2017). Portanto, os vírus Influenza são considerados os principais agentes virais causadores de infecções respiratórias agudas do trato inferior e tem grande importância epidemiológica.

No Brasil, a vacinação e o uso de antivirais são usados de forma profilática e terapêutica para as infecções por Influenza. O principal agente anti-influenza utilizado na clínica é o oseltamivir (OST), que atua na última etapa do ciclo replicativo viral, e por isso muitas das vezes sua eficácia é sobrepujada por uma falha terapêutica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). É conhecido que 1-2% de cepas virais resistentes ao OST são identificadas mundialmente, relacionadas ou não ao uso deste antiviral. Desta maneira, a busca por novos mecanismos e moléculas capazes de inibir a replicação dos vírus Influenza é uma questão fundamental.

Pouco se conhece sobre o potencial antiviral em extratos e moléculas quimicamente definidas obtidas a partir de microalgas e cianobactérias. Sendo assim, pesquisas que objetivem estes estudos são interessantes do ponto de vista biotecnológico deste grande manancial ainda a ser explorado.

3 OBJETIVO

Assim, o objetivo principal desse estudo é investigar o potencial antiviral em extratos derivados de microalgas e cianobactérias sobre a replicação dos vírus Influenza A e B de linhagens sensíveis e resistentes ao Oseltamivir (OST).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a citotoxicidade dos extratos de diferentes microalgas e cianobactérias;
2. Avaliar os efeitos de extratos sobre a replicação dos vírus Influenza;
3. Determinar a concentração efetiva dos extratos com melhor atividade inibitória da replicação dos vírus Influenza;
4. Avaliar o potencial de inibição dos extratos sobre a atividade enzimática da Neuraminidase (NA) do vírus Influenza sensíveis e resistentes aos OST.

4 METODOLOGIA

4.1 ORIGEM DAS MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS

As linhagens de microalgas e cianobactérias utilizadas neste estudo pertencem à Coleção de Culturas de Microalgas da UFRJ (CCMR, Laboratório de Fitoplâncton Marinho da Universidade Federal do Rio de Janeiro). Estas cepas foram isoladas por triagem unicelular em citômetro de fluxo (FISTAROL et al., 2018) e são mantidas em cultura por meio de sucessivas transferências para meio líquido fresco em intervalos de 3 a 6 semanas, dependendo da espécie. Todas as 26 cepas usadas aqui são originárias dos biomas de água doce (Sistema do Rio Paraguaçu e Lago de Lençóis Maranhenses) e marinhos (estuário da Baía de Guanabara e Recifes de Coral de Abrolhos) no Brasil, e estão descritas na Tabela 2. A coleta dos specimens foi aprovada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBio) e Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), número da aprovação: 35854-2. O acesso ao patrimônio genético foi aprovado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número da aprovação: 010339/2014-0; e pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), número da aprovação: A03D5C4.

Tabela 2 - Descrição da identificação dos extratos, fonte, ponto e data de coleta.

(continua)

Identificação dos Extratos	Microalgas/Cianobactérias	Fonte	Ponto de coleta	Latitude	Longitude	Data da coleta
1	Algas verdes filamentosas não identificadas	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°32'11"S	41°51'10"W	Agosto, 2012
2	<i>Staurastrum</i> sp.	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°30'10"S	42°51'50"W	Agosto, 2012
3	Algas verdes filamentosas não identificadas	água doce	Rio Paraguaçu	12°57'8,48"S	41°16'39,29"W	Novembro, 2012
4	<i>Scenedesmus</i> sp.	água doce	Lago Lençóis Maranhense	12°50'25,91"S	41°19'26,52"W	Novembro, 2012
5	<i>Leptolyngbya</i> sp.*	marinho	Abrolhos	17°59'52,8" S	38°40'15,6" W	Outubro, 2013
6	Algas verdes cocóides não identificadas	água doce	Rio Paraguaçu	12°57'8,48"S	41°16'39,29"W	Novembro, 2012
7	Algas verdes cocóides não identificadas	água doce	Lago Lençóis Maranhense	12°50'25,91"S	41°19'26,52"W	Novembro, 2012
8	<i>Scenedesmus abundans</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°32'11"S	41°51'10"W	Agosto, 2012
9	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°30'10"S	42°51'50"W	Agosto, 2012
10	<i>Chlamydomonas angulosa</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°38'50"S	42°49'43"W	Agosto, 2012
11	<i>Chlorellaceae</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°38'50"S	42°49'43"W	Agosto, 2012

Tabela 2 - Descrição da identificação dos extratos, fonte, ponto e data de coleta.

(continua)

Identificação dos Extratos	Microalgas/Cianobactérias	Fonte	Ponto de coleta	Latitude	Longitude	Data da coleta
12	<i>Desmidiaceae</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°35'08"S	42°48'03"W	Agosto, 2012
13	<i>Chlamydomonas</i> sp.	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°30'10"S	42°51'50"W	Agosto, 2012
14	<i>Selenastrum</i> sp.	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°30'10"S	42°51'50"W	Agosto, 2012
15	<i>Scenedesmaceae</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°33'42"S	42°51'49"W	Agosto, 2012
16	Algas verdes coccídes não identificadas	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°30'10"S	42°51'50"W	Agosto, 2012
17	<i>Leptolyngbya</i> sp.*	marinho	Abrolhos	12°50'25.91"S	41°19'26.52"W	Novembro, 2012
18	<i>Desmodesmus armatus</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°30'10"S	42°51'50"W	Agosto, 2012
19	<i>Symbiodinium</i> sp.	marinho	Abrolhos	17°57'32.7" S	38°30'20.3" W	Março, 2012
20	<i>Chattonella</i> sp.	marinho	Baía da Guanabara	22°50'01.0" S	43°12'29.0" W	Janeiro, 2016
21	<i>Chlorellaceae</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°30'10"S	42°51'50"W	Agosto, 2012
22	<i>Desmodesmus perforatus</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°30'10"S	42°51'50"W	Agosto, 2012

Tabela 2 - Descrição da identificação dos extratos, fonte, ponto e data de coleta.

(conclusão)

Identificação dos Extratos	Microalgas/Cianobactérias	Fonte	Ponto de coleta	Latitude	Longitude	Data da coleta
23	<i>Chlorellaceae</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°32'11"S	41°51'10"W	Agosto, 2012
24	<i>Desmidiaceae</i>	água doce	Lago Lençóis Maranhense	2°30'10"S	42°51'50"W	Agosto, 2012
25	<i>Romeria</i> sp.*	marinho	Abrolhos	18°00'13.0" S	39°14'57.0" W	Fevereiro, 2014
26	<i>Nanofrustulum shiloi</i>	marinho	Abrolhos	17°57'07.0" S	39°13'11.0" W	Fevereiro, 2013

* Cepas de cianobactérias

4.2 CULTIVO DE MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS

As microalgas e cianobactérias foram cultivadas em meio estéril autoclavado a 26 ± 1 °C, com um fluxo de fótons de ca. 300 $\mu\text{moles de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 16h de luz: 8 h de fotoperíodo escuro. Cepas de água doce foram cultivadas em meio ASM-1 (GORHAM et al., 1964) (REYNOLDS; JAWORSKI, 1978), enquanto as cepas marinhas foram cultivadas em meio f/2 (GUILLARD; LORENZEN, 1972). As culturas foram cultivadas em balões de vidro de modo descontínuo com 300 a 500 mL de meio de cultura durante 3 a 6 semanas, dependendo da taxa de crescimento de cada cepa. As células foram armazenadas a -80 °C até a produção dos extratos.

4.3 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS

As culturas de microalgas e cianobactérias foram congeladas, descongeladas e filtradas através de gaze. Cada cultura foi extraída três vezes com Acetato de Etila (AcOEt), (razão de adição 1:1 de volume) e três vezes com n-Butanol (n-BuOH), (razão de adição de 1:1 de volume). As camadas orgânicas foram concentradas sob pressão reduzida para obter um extrato bruto, o qual foi suspenso em Dimetilsulfóxido (DMSO). Foram produzidos 38 extratos, sendo 26 em (AcOEt) e 12 em (n-BuOH). Os extratos foram armazenados a uma concentração de 100 mg/mL a -20 °C até serem utilizados.

4.4 CÉLULAS E VÍRUS

Células MDCK (Madin-Darby canine kidney - células de rim de cão) foram cultivadas em meio de manutenção Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco) e 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ (SZRETTTER; BALISH; KATZ, 2006). Estas células foram utilizadas para análise de citotoxicidade, crescimento

viral e ensaios experimentais com infecção com vírus Influenza. Os vírus foram cultivados de acordo com o manual da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o diagnóstico laboratorial e vigilância virológica da gripe (WHO, 2011). A titulação do vírus foi realizada por ensaio de 50% de dose infecciosa de cultura de tecidos (TCID₅₀) como descrito no manual da OMS (WHO, 2011). Foi analisado o efeito inibitório dos extratos contra linhagens de Influenza A e linhagem B, sensível (tipo selvagem-WT) e resistente (mutante) ao Oseltamivir (OST): A/Califórnia/04/2009(A(H1N1)pdm09-WT); A/Perth/261/2009(A(H1N1)pdm09-H275Y); A/Suíça/9715293/2013 (A(H3N2)-WT); B/Phuket/3073/2013 Yam (WT); B/Brisbane/60/2008Vic(WT); B/Perth/211/2001Yam(WT) e B/Perth/211/2001Yam (D197E).

4.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade foi determinada a partir de ensaios de viabilidade celular em células MDCK, e utilizou-se a técnica de redução do sal de Tetrazol, o XTT 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (Sigma - Aldrich). No ensaio, as células que eram viáveis metabolizam o XTT gerando o Formazan, que é um produto de coloração alaranjada, onde a sua quantidade pode ser medida através de um espectrofotômetro. Sendo assim, quanto mais cor, maior será o número de células viáveis (ROEHM et al., 1991) (SCUDIERO et al., 1988). Amostras de cada extrato foram preparadas como uma solução estoque de 100 mg/mL em DMSO (veículo) e posteriormente diluídas em meio de cultura DMEM, a concentração final de DMSO foi igual a 1,0% (v/v). Os testes foram realizados em triplicata (n=3). Foram adicionados 100 μ L ($2,0 \times 10^4$ células/poço) na placa de cultura de 96 poços (fundo plano) e incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, os extratos foram adicionados em concentrações finais de 1 mg/mL em DMEM. As células de controle (CTL) foram tratadas com 1,0% de DMSO, o que não afetou o seu crescimento. Todas as células foram incubadas com extratos durante 48 horas antes de ser adicionada uma solução de XTT preparada a fresco como especificado pelo fabricante. O efeito citotóxico do tratamento foi determinado como percentagem de viabilidade em comparação com células não tratadas, utilizando a

seguinte fórmula: (absorbância de células tratadas/absorbância de células não tratadas) X100, como descrito (PACIFICO et al., 2016).

4.6 SCREENING DE EXTRATOS NA REPLICAÇÃO VIRAL

Foi realizada uma triagem para avaliar o efeito inibitório dos extratos. As células MDCK foram semeadas em placas de 24 poços ($2,0 \times 10^5$ células/poço) e cultivadas em meio de manutenção. Após atingirem 80% de confluência, o meio foi retirado, as células foram lavadas duas vezes com meio de inoculação e infectadas durante 1 hora a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ com o vírus Influenza A (H1N1) pdm09-WT ou A (H3N2)-WT a 400 TCID₅₀ por poço. Depois, a suspensão viral foi removida e as monocamadas foram tratadas com 200 µg/mL de cada extrato diluído em meio de inoculação. O sobrenadante foi colhido 48 horas após a infecção (hpi), diluído 1:5 em tampão NA-Star™ e a atividade da neuraminidase foi analisada em triplicata pelo kit de análise NA-Star™ (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante. A atividade antiviral dos extratos foi calculada em relação ao controle apenas com vírus.

4.7 DETERMINAÇÃO DO EC50

A concentração média efetiva (EC₅₀) foi determinada para o extrato que foi o melhor para inibir a replicação do vírus Influenza em mais de 80% no ensaio de screening. As células MDCK foram semeadas e infectadas como descrito acima. Após 1 de infecção (hpi), a suspensão viral foi removida e as monocamadas foram tratadas com diferentes concentrações (400 - 12,5 µg/mL) dos extratos. O Oseltamivir Carboxilato foi utilizado como controle nas concentrações (100 - 3,2 µM), (OST-car; gentilmente doado por Hoffman-La Roche Inc., Basileia, Suíça). O sobrenadante foi recolhido 48 hpi, diluído 1:5 em tampão NA-Star™ e a atividade da neuraminidase foi analisada como descrito acima. A regressão não linear das curvas dose-resposta foi realizada para determinar os efeitos inibitórios de 50% na replicação viral (EC₅₀) para os extratos e composto de referência.

4.8 ENSAIO ANTIVIRAL FUNCIONAL - DETERMINAÇÃO IC₅₀

Para os extratos que inibiram mais de 80% da replicação viral no teste de triagem (screening), realizamos o ensaio antiviral funcional para determinar a concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática da Neuraminidase (IC₅₀). Cepas de Influenza A e B do tipo selvagem e resistentes foram testadas contra diferentes concentrações de extratos (200 - 6,25 µg/mL), o OST-car (1000 - 0,01 nM) foi usado como controle. Este ensaio foi realizado utilizando o kit NA-Star™ (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante (SOUZA et al., 2015).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As curvas dose resposta utilizadas para calcular os parâmetros farmacológicos foram geradas utilizando o programa Excel 2010 para Windows (Microsoft) (SOUZA et al., 2007). Todos os experimentos foram feitos em triplicata, e os resultados foram mostrados como a média ou a média ± desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS

A viabilidade das células foi a primeira análise realizada, extratos com toxicidade celular *in vitro* seriam desconsiderados da análise antiviral. Os ensaios foram realizados pelo teste XTT que permite estimar o número de células vivas presentes em cultura e, em seguida, avaliar o efeito do tratamento com um extrato sobre a viabilidade da população celular (ROEHM et al., 1991). Todos os extratos produzidos foram testados em 1 mg/mL em cultura de células MDCK. Como controle, expusemos MDCK a DMSO na mesma proporção que usamos no teste de extratos, 0,01% V/V em meio de cultura, o que não afetou a viabilidade celular. Os resultados mostraram que a atividade mitocondrial redox das células testadas foi inibida no máximo em 20% após 48 horas de exposição. 16 extratos em solvente acetato de Etila (AcOEt) e 7 extratos em n-butanol (n-BuOH) mostraram 90% de viabilidade celular (Tabela 3).

5.2 OS EXTRATOS INIBEM A REPLICAÇÃO DA GRIPE EM MAIS DE 80%

Após análise de citotoxicidade, testamos a atividade anti-influenza com todos os extratos produzidos, AcOEt e n-BuOH. Para este fim, as células infectadas com MDCK foram tratadas com 200 µg/mL de cada extrato. Após 48 horas de infecção (hpi), os sobrenadantes foram recolhidos e a atividade neuraminidase do Influenza foi analisada. Observamos que 17 extratos inibiram a replicação de cepas de Influenza A, sendo 7 (41%) deles com mais de 80% de inibição (Tabela 3). Apenas um extrato de n-BuOH de algas verdes filamentosas foi capaz de inibir a replicação do Influenza, mas em níveis baixos quando comparado ao AcOEt. Em contrapartida, um extrato de AcOEt obtido a partir de outra alga verde filamentosa foi capaz de produzir efeitos inibitórios satisfatórios (Tabela 3). Todos os extratos AcOEt da família *Desmidiaceae* (*Staurostrum* sp.) e quatro dos seis extratos AcOEt da família *Scenedesmaceae* (*Scenedesmus* sp. e *Desmodesmus* sp.) foram capazes de

inibir a replicação do Influenza com diferentes magnitudes (Tabela 3). Além destes, o extrato 21, obtido a partir de microalgas verdes de *Chlorellaceae*, apresentou a maior capacidade de inibir a replicação do Influenza. No entanto, outros da mesma família tinham capacidade limitada ou nula contra este vírus (Tabela 3).

Tabela 3 - Viabilidade celular e inibição da replicação do vírus Influenza (screening) após exposição aos extratos em solvente acetato de Etila (AcOEt) ou n-butanol (n-BuOH).

(continua)

Identificação dos Extratos	Microalga / Cianobactéria	Viabilidade Celular (%)		Screening (%)			
				A(H1N1)pdm09-WT		A(H3N2)-WT	
		AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH
1	Algas verdes filamentosas não identificadas	80 ± 1	80 ± 2	87 ± 2	NI	82 ± 2	NI
2	<i>Staurastrum</i> sp.	90 ± 2	90 ± 2	85 ± 2	NI	82 ± 1	NI
3	Algas verdes filamentosas não identificadas	80 ± 1	80 ± 2	NI	30 ± 4	NI	20 ± 2
4	<i>Scenedesmus</i> sp.	90 ± 2	90 ± 2	83 ± 3	NI	80 ± 3	NI
5	<i>Leptolyngbya</i> sp. *	90 ± 2	90 ± 1	90 ± 2	NI	85 ± 2	NI
6	Algas verdes cocóides não identificadas	90 ± 3	90 ± 1	73 ± 2	NI	70 ± 4	NI
7	Algas verdes cocóides não identificadas	90 ± 1	90 ± 2	NI	NI	NI	NI
8	<i>Scenedesmus abundans</i>	90 ± 3	90 ± 2	70 ± 4	NI	75 ± 1	NI
9	<i>Scenedesmus vacuolatus</i>	80 ± 2	80 ± 2	NI	NI	NI	NI
10	<i>Chlamydomonas angulosa</i>	90 ± 1	90 ± 1	NI	NI	NI	NI
11	<i>Chlorellaceae</i>	80 ± 3	80 ± 4	NI	NI	NI	NI
12	<i>Desmidiaceae</i>	80 ± 1	80 ± 2	60 ± 2	NI	56 ± 2	NI
13	<i>Chlamydomonas</i> sp.	90 ± 3	NP	NI	NP	NI	NP
14	<i>Selenastrum</i> sp.	80 ± 2	NP	NI	NP	NI	NP
15	<i>Scenedesmaceae</i>	90 ± 3	NP	NI	NP	NI	NP

Tabela 3 - Viabilidade celular e inibição da replicação do vírus Influenza (screening) após exposição aos extratos em solvente acetato de Etila (AcOEt) ou n-butanol (n-BuOH).

Identificação dos Extratos	Microalga / Cianobactéria	Viabilidade Celular (%)		Screening (%)				(conclusão)
				A(H1N1)pdm09-WT		A(H3N2)-WT		
		AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH	AcOEt	n-BuOH	
16	Algas verdes cocóides não identificadas	90 ± 4	NP	NI	NP	NI	NP	
17	<i>Leptolyngbya</i> sp.*	90 ± 3	NP	57 ± 2	NP	55 ± 2	NP	
18	<i>Desmodesmus armatus</i>	80 ± 3	NP	94 ± 2	NP	90 ± 2	NP	
19	<i>Symbiodinium</i> sp.	80 ± 2	NP	59 ± 4	NP	62 ± 4	NP	
20	<i>Chattonella</i> sp.	90 ± 1	NP	70 ± 5	NP	65 ± 2	NP	
21	<i>Chlorellaceae</i>	90 ± 4	NP	99 ± 1	NP	95 ± 1	NP	
22	<i>Desmodesmus perforatus</i>	80 ± 3	NP	58 ± 3	NP	50 ± 4	NP	
23	<i>Chlorellaceae</i>	90 ± 3	NP	46 ± 2	NP	38 ± 4	NP	
24	<i>Desmidiaceae</i>	90 ± 1	NP	84 ± 1	NP	82 ± 2	NP	
25	<i>Romeria</i> sp.	80 ± 3	NP	NI	NP	NI	NP	
26	<i>Nanofrustulum shiloi</i>	90 ± 3	NP	66 ± 2	NP	60 ± 2	NP	

NP - não produzido, NI - não inibiu, *Cepas de cianobactérias
O DMSO foi utilizado como controle a 0,01% V / V.

5.3 DETERMINAÇÃO do EC₅₀ E AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (SI)

Determinamos o EC₅₀ de sete extratos marinhos que inibiram a replicação de ambos os vírus Influenza A testados em mais de 80% no ensaio de triagem. O SI é determinado pela razão entre CC₅₀ e EC₅₀ e representa o grau de segurança de se utilizar uma molécula ou extrato *in vitro*. O EC₅₀ de cinco extratos foi menor que 100 µg/mL com índice seletivo (SI) maior que 10,0 (Tabela 4). O Oseltamivir Carboxilato (OST-car) foi utilizado como controle positivo com 177,7 e 66,63 SI para A(H1N1) pdm09-WT e A(H3N2)-WT, respectivamente. Os valores dos índices de seletividade (SI) entre um conjunto de extratos e uma molécula quimicamente definida (OST) são incomparáveis.

Tabela 4 - Valores de EC₅₀, CC₅₀ e SI para os extratos que inibiram a replicação do Influenza A acima de 80% no ensaio de triagem.

Identificação dos Extratos	Microalga / Cianobactéria	EC ₅₀ ^a (µg/mL)		CC ₅₀ ^b (µg/mL)	SI ^c	
		A(H1N1)pdm09-WT	A(H3N2)-WT		A(H1N1)pdm09-WT	A(H3N2)-WT
1	Algas verdes filamentosas não identificadas	130	150	>1000	>7.7	>6.7
2	<i>Staurastrum</i> sp.	70	90	>1000	>14.3	>11.1
4	<i>Scenedesmus</i> sp.	130	130	>1000	>7.7	>7.7
5	<i>Leptolyngbya</i> sp. *	80	85	>1000	>12.5	>11.8
18	<i>Desmodesmus armatus</i>	55	60	>1000	>18.4	>16.7
21	<i>Chlorellaceae</i>	30	40	>1000	>33.3	>25.0
24	<i>Desmidiaceae</i>	50	55	>1000	>20.0	>18.2
OST - car		0.012 µM	0.032 µM	2132 µM	177.7	66.63

^aEC₅₀, a concentração de molécula ou extrato necessária para inibir a replicação do Influenza em 50%. Valores representam a média de amostras de três experimentos independentes.

^bCC₅₀, a concentração de molécula ou extrato necessária para reduzir a viabilidade celular em 50%. Valores representam a média de três experimentos independentes.

^cSI, índice de seletividade é determinado pela razão entre CC₅₀ e EC₅₀.

OST - car, OST Carboxilato

* Cepa de cianobactérias

5.4 INIBIÇÃO DA NEURAMINIDASE E DETERMINAÇÃO DO IC₅₀

Realizamos ensaio funcional para analisar a capacidade inibitória de todos os 7 extratos frente a atividade da NA viral. Neste ensaio acelular buscamos os valores de IC₅₀, que é a concentração necessária para inibir 50% da atividade enzimática da NA. Assim, o valor mais baixo IC₅₀ implica em uma maior atividade de inibição de NA. Os extratos da cianobactéria *Leptolyngbya* sp. (5) e microalgas *Chlorellaceae* (21) inibiram a atividade NA de Influenza A com IC₅₀ menor que 210 e 20 µg/mL, respectivamente (Tabela 5).

5.5 DETERMINAÇÃO DE EC₅₀ E IC₅₀ DOS VÍRUS INFLUENZA A E B SENSÍVEIS E RESISTENTES AO OSELTAMIVIR (OST)

A busca por novos compostos anti-influenza que inibam os vírus Influenza A e B, sensíveis e resistentes ao OST é extremamente importante. Testamos extratos de *Leptolyngbya* sp. (5) e *Chlorellaceae* (21) contra a replicação e atividade NA dos vírus Influenza A e B sensíveis e resistentes ao OST. Ambos os extratos inibiram a replicação viral e a atividade da NA com baixos valores de EC₅₀ e IC₅₀, inclusive para linhagens resistentes ao OST (Tabela 5).

6 DISCUSSÃO

Os vírus Influenza são os mais importantes patógenos virais causadores de infecções respiratórias agudas (WHO, 2018b). O OST, um inibidor da neuraminidase viral, é o principal anti-influenza usado clinicamente, porém cepas resistentes a essa molécula têm sido identificadas em todo o mundo, exigindo o desenvolvimento de novas terapias (DIXIT et al., 2013; SOUZA et al., 2011, 2015).

Microalgas e cianobactérias são enormes fontes naturais de compostos de alto valor nutricional e medicinal. Esses organismos marinhos e de água doce são uma fonte rica de compostos bioativos, como vitaminas, proteínas, aminoácidos essenciais, polissacarídeos, ácidos graxos, minerais, pigmentos fotossintéticos, enzimas e fibras (GOGINENI; HAMANN, 2018; MONTALVÃO et al., 2016).

As cianobactérias são uma fonte promissora, ainda pouco explorada, de novos produtos naturais, inclusive moléculas antivirais. Estudos de triagem identificaram atividades antivirais em sulfoglicolipídeos e lectinas (LOPES et al., 2011; NIEDERMEYER, 2015; ZAINUDDIN et al., 2002). Além destes, grupos quimicamente diferentes de compostos em cianobactérias incluem alcalóides, lipopeptídeos, macrolídeos (atuam como antibióticos) e outros (KIURU., et al 2014). Diversos estudos foram realizados para testar compostos de microalgas contra vírus humanos patogênicos. Compostos antivirais extraídos de microalgas são principalmente polissacarídeos. Além destes, aldeídos poliinsaturados, carotenóides, terpenos e alcalóides são outras moléculas bioativas produzidas por microalgas (FALAISE et al., 2016; MARTÍNEZ ANDRADE et al., 2018; SATHASIVAM; KI, 2018)

Desta forma, visamos neste estudo buscar atividade anti-influenza em extratos derivados de microalgas e cianobactérias coletadas do Rio Paraguaçu, Sistema de Lago dos Lençóis Maranhenses, estuário da Baía de Guanabara e recifes de corais de Abrolhos.

No ensaio de triagem inicial, observamos que 7 extratos foram capazes de inibir a replicação do vírus Influenza A sazonal em mais de 80%, cinco deles com SI superior a 10. Extratos aquosos e metanólicos de cianobactérias cultivadas do gênero *Microcystis* e *Spirulina* inibem a replicação do Influenza com potência

comparável ao extrato em acetato de Etila de *Leptolyngbya* sp. (cianobactérias) (CHEN et al., 2016; ZAINUDDIN et al., 2002). Além disso, um polissacarídeo sulfatado purificado da microalga marinha, *Gyrodinium impudium*, inibe a infecção por Influenza A com SI superior a 200, mas não o Influenza B (Kim et al. 2012).

(Kim et al. 2012).

Além disso, os compostos relacionados com a *aplysiatoxina* do *Trichodesmium erythraeum* (Cianobactéria), debromoaplysiatoxina e 3-metoxidbromoaplysiatoxina apresentaram efeitos anti-CHIKV em concentrações que resultaram em citotoxicidade mínima (GUPTA et al., 2014). A atividade contra o Influenza A foi encontrada para os depsipeptídeos cíclicos chamados ictiopeptinas A e B isolados da cianobactéria *Microcystis ichthyolabe* (ZAINUDDIN et al., 2007). *Nostoc ellipsosporum* (Cianobactéria) lectina chamada Cyanovirin-N (CV-N) é um potente anti-Influenza A, bem como anti-Influenza B. O CV-N vincula-se diretamente aos vírus, inativando-os (SINGH et al., 2017). As algas verdes e plantas terrestres formam uma linhagem monofilética chamada clorofíceas, a primeira é um ancestral da segunda (DELAUX et al., 2015). Portanto, é possível que eles apresentem metabólitos primários e secundários semelhantes (CHEYNIER et al., 2013; IWAI; YOKONO, 2017). Um amplo espectro de extratos de plantas inibe a replicação do Influenza, incluindo extratos em solvente acetato de etila, com SI comparável ao observado nos extratos 2, 4, 18, 21 e 24, obtidos a partir das microalgas verdes *Staurastrum* sp., *Scenedesmus* sp., *Desmodesmus armatus*, *Chlorellaceae* e *Desmidiaceae*, respectivamente (HOUR et al., 2013; WU et al., 2010).

A família *Chlorellaceae*, principalmente o gênero *Chlorella*, produz um amplo espectro de carotenóides com diferentes atividades anti-angiogênicas, cardioprotetoras, anti-cancerígenas, anti-diabéticas, anti-inflamatórias, anti-oxidantes e outras (SATHASIVAM; KI, 2018). Além disso, os retinoides, produtos do metabolismo dos carotenoides, inibem a replicação do vírus da caxumba prevenindo a infecção de células saudáveis pela indução de um gene induzido por retinoide I (RIG-I), receptor do ácido retinóico (RAR) e interferon (SOYE et al., 2013). As proteínas transmembrana induzidas por interferon (IFITMs) inibem a infecção de diversos vírus encapsulados, como o West Nile (Vírus da Febre do Nilo), Dengue, Zika e Influenza, bloqueando a fusão vírus-endossomo (BRASS et al., 2009; DESAI

et al., 2014; MESQUITA et al., 2014; SAVIDIS et al., 2016). Assim, é possível que o extrato de *Chlorellaceae* (microalga) promova o aumento de proteínas celulares restritivas a replicação viral, sugerindo um mecanismo de ação para o efeito inibitório da replicação do Influenza.

Além disso, dois extratos de *Leptolyngbya* sp. (cianobactéria) e *Chlorellaceae* (microalga) inibiram a replicação e a atividade neuraminidase dos vírus Influenza A e B de linhagens sensíveis e resistentes ao OST. Estes resultados foram semelhantes aos observados para um extrato aquoso de *Taxodium distichum* (família *Cupressaceae*), que apresentou excelente eficácia contra ambos os vírus Influenza, particularmente isolados clínicos resistentes ao OST e cepas de Influenza de origem suína (HSIEH et al., 2016). Estes dados indicam que microalgas e cianobactérias são uma fonte promissora de produtos naturais anti-influenza.

Como mencionado anteriormente, existem vários fatores celulares descritos como restritivos a replicação do vírus Influenza (VILLALÓN-LETELIER et al., 2017). Além disso, apesar do efeito inibitório sobre a atividade da neuraminidase viral, os extratos podem conter moléculas capazes de inibir diferentes estágios do ciclo replicativo viral, e/ou podem ativar fatores de restrição da célula hospedeira, mas esses efeitos ainda serão investigados. Logo, podemos dizer que microalgas e cianobactérias são importantes microrganismos marinhos e de água doce para bioprospecção em pesquisas antivirais. Os microrganismos avaliados neste estudo foram coletados no Brasil, mas não são exclusivamente brasileiros, o que torna interessante comparar a produção de metabólitos dos mesmos grupos taxonômicos coletados em diferentes partes do mundo.

7 CONCLUSÃO

1. Os extratos de diferentes gêneros de microalgas e cianobactérias não apresentaram alta toxicidade sobre a célula de linhagem testada, independente do solvente utilizado, AcOEt ou n-BuOH;
2. Dos 38 extratos avaliados, 7 (18%) foram capazes de inibir a replicação do vírus influenza A H1N1pdm09-WT e H3N2-WT em mais de 80% no ensaio de screening;
3. 2 extratos apresentaram atividade inibitória sobre a replicação viral e a NA dos vírus Influenza A e B sensíveis e resistentes ao OST;
4. Os extratos em AcOEt apresentaram melhor efeito inibitório que os em n-BuOH, indicando que provavelmente este efeito ocorre devido a frações mais polares como, por exemplo, os carotenoides e terpenos;
5. Extratos de microalgas e cianobactérias, coletadas em lagos e na costa brasileira, apresentam moléculas capazes de inibir a replicação de um importante vírus do ponto de vista da Saúde Pública, o que os tornam interessantes no que diz respeito a busca por novos antivirais (bioprospecção).

8 PERSPECTIVAS

1. Realizar o fracionamento químico dos extratos mais promissores buscando as moléculas quimicamente ativas como antivirais;
2. Testar o potencial antiviral destas diferentes frações;
3. Buscar o mecanismo de ação das moléculas mais promissoras.

9 REFERÊNCIAS

- A. J., M. et al. Influenza B virus encephalitis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 4, p. 898–900, 1999.
- ALIJA, F. J. R. La gripe. **Revista Médica de Homeopatia**, v. 2, n. 3, p. 127–136, 1 set. 2009.
- ARIAS, C. F. et al. Molecular Anatomy of 2009 Influenza virus A (H1N1). **Archives of Medical Research**, v. 40, n. 8, p. 643–654, 2009.
- BADIA LLACH, X. et al. Estudio de costes de la gripe. **Atención Primaria**, v. 38, n. 5, p. 260–267, set. 2006.
- BAE, M.-J. et al. Inhibitory effect of unicellular green algae (*Chlorella vulgaris*) water extract on allergic immune response. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 12, p. 3133–3136, 2013.
- BENDER, C. et al. Characterization of the Surface Proteins of Influenza A (H5N1) Viruses Isolated from Humans in 1997–1998. **Virology**, v. 254, n. 1, p. 115–123, 1 fev. 1999.
- BRASIL. Plano Brasileiro de Preparação para uma Pandemia de Influenza. **Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde**, p. 241, 2006.
- BRASS, A. et al. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. **Physiological significance of polyploidization in mammalian cells**, v. 139, n. 7, p. 1243–1254, 2009.
- BUSH, R. M. **Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labrolesprocedures.htm>>. Acesso em: 18 jul. 2018.
- CHEN, R.; HOLMES, E. C. The evolutionary dynamics of human influenza B virus. **Journal of Molecular Evolution**, v. 66, n. 6, p. 655–663, 2008.

CHEN, Y. H. et al. Well-tolerated Spirulina extract inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced mortality. **Sci Rep**, v. 6, p. 24253, 2016.

CHEYNIER, V. et al. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1–20, 2013.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Influenza. **The Lancet**, v. 354, n. 9186, p. 1277–1282, 1999a.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Influenza. **The Lancet**, v. 354, n. 9186, p. 1277–1282, 9 out. 1999b.

DELAUX, P.-M. et al. Algal ancestor of land plants was preadapted for symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 43, p. 13390–13395, 2015.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

DESAI, T. M. et al. IFITM3 Restricts Influenza A Virus Entry by Blocking the Formation of Fusion Pores following Virus-Endosome Hemifusion. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 4, 2014.

DESHPANDE, M. S. et al. Evaluation of the efficacy of a canine influenza virus (H3N8) vaccine in dogs following experimental challenge. **Vet Ther**, v. 10, n. 3, p. 103–112, 2009.

DEYDE, V. M. et al. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1102–1110, 2010.

DIXIT, R. et al. Emergence of oseltamivir resistance: control and management of influenza before, during and after the pandemic. **Infectious disorders drug targets**, v. 13, n. 1, p. 34–45, 2013.

DONATELLI, I. et al. Human–Animal Interface: The Case for Influenza Interspecies Transmission. In: **Emerging and Re-emerging Viral Infections, Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 6**. [s.l.] Springer International Publishing Switzerland, 2016. v. 6p. 17–33.

- ECCLES, R. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 11, p. 718–725, 2005.
- EVERITT, A. R. et al. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. **Nature**, v. 484, n. 7395, p. 519–523, 2012.
- FALAISE, C. et al. Antimicrobial compounds from eukaryotic microalgae against human pathogens and diseases in aquaculture. **Marine Drugs**, v. 14, n. 9, p. 1–27, 2016.
- FISTAROL, G. O. et al. Rapid isolation of culturable microalgae from a tropical shallow lake system. **Journal of Applied Phycology**, n. February, p. 1–13, 2018.
- FLYNN, O. et al. Influenza D virus in cattle, Ireland. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 389–391, 2018.
- FORLEO-NETO, E. et al. Influenza. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 27, p. 267–274, 2003.
- FRAC, M.; JEZIERSKA-TYS, S.; TYS, J. Microalgae for biofuels production and environmental applications: A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 54, p. 9227–9236, 29 dez. 2010.
- FRIEDMAN, R. L. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. **Cell**, v. 38, n. 3, p. 745–755, 1984.
- GOGINENI, V.; HAMANN, M. T. Marine natural product peptides with therapeutic potential: Chemistry, biosynthesis, and pharmacology. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1862, n. 1, p. 81–196, 2018.
- GORHAM, P. R. et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. **SIL Proceedings, 1922-2010**, v. 15, n. 2, p. 796–804, fev. 1964.
- GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. YELLOW-GREEN ALGAE WITH CHLOROPHYLLIDE C². **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, p. 10–14, 1 mar. 1972.
- GUPTA, D. K. et al. Anti-Chikungunya viral activities of aplysiatoxin-related compounds from the marine cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum*. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 115–127, 2014.
- HEO, Y. A. Baloxavir: First Global Approval. **Drugs**, v. 78, n. 10, p. 1049–1055,

2018.

HILLEMANN, M. R. Realities and enigmas of human viral influenza: Pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*, v. 20, n. 25–26, p. 3068–3087, 2002.

HIROMOTO, Y. et al. Phylogenetic analysis of the three polymerase genes (PB1, PB2 and PA) of influenza B virus. *Journal of General Virology*, v. 81, n. 4, p. 929–937, 2000.

HOUR, M. J. et al. Baicalein, Ethyl Acetate, and Chloroform Extracts of *Scutellaria baicalensis* Inhibit the Neuraminidase Activity of Pandemic 2009 H1N1 and Seasonal Influenza A Viruses. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2013, p. 750803, 2013.

HSIEH, C. F. et al. An extract from *Taxodium distichum* targets hemagglutinin- and neuraminidase-related activities of influenza virus in vitro. *Scientific Reports*, v. 6, n. April, p. 1–13, 2016.

HU, A. R. Q. *The Microalgal Cell. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 2. ed. Oxford: Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013., 2013.

HUANG, I. C. et al. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 1, 2011.

IULIANO, A. D. et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*, v. 391, n. 10127, p. 1285–1300, 31 mar. 2018a.

IULIANO, A. D. et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet (London, England)*, v. 391, n. 10127, p. 1285–1300, 31 mar. 2018b.

IWAI, M.; YOKONO, M. Light-harvesting antenna complexes in the moss *Physcomitrella patens*: implications for the evolutionary transition from green algae to land plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 37, p. 94–101, 2017.

JAIN, V. K. et al. Vaccine for Prevention of Mild and Moderate-to-Severe Influenza in Children. *New England Journal of Medicine*, v. 369, n. 26, p. 2481–2491, 26 dez. 2013.

- JOHN H. BEIGEL, M. D. et al. Avian Influenza A (H5N1) Infection in humans. **N Engl J Med**, v. 353, n. 13, p. 1374–1385, 2005.
- KOOPMANS, M. et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. **The Lancet**, v. 363, n. 9409, p. 587–593, 2004.
- LI, K. et al. IFITM Proteins Restrict Viral Membrane Hemifusion. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, 2013.
- LOPES, V. R. et al. Cytotoxicity in L929 fibroblasts and inhibition of herpes simplex virus type 1 Kupka by estuarine cyanobacteria extracts. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 4, p. 944–950, 2011.
- LU, J. et al. The IFITM Proteins Inhibit HIV-1 Infection. **Journal of Virology**, v. 85, n. 5, p. 2126–2137, 2011.
- MANUGUERRA, J. C. et al. Natural infection of dogs by influenza C virus: a serological survey in Spain. **The new microbiologica**, v. 16, n. 4, p. 367–71, out. 1993.
- MARGARET HUNT; HUNT, R. **Microbiology and Immunology On-line University of South Carolina School of Medicine**. Disponível em: <<http://www.microbiologybook.org/mhunt/flu.htm>>. Acesso em: 27 set. 2018.
- MARTENSEN, P. M.; JUSTESEN, J. Small ISGs Coming Forward. **JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH** 24:1–19, v. 24, p. 1–19, 2004.
- MARTÍNEZ ANDRADE, K. et al. Marine Microalgae with Anti-Cancer Properties. **Marine Drugs**, v. 16, n. 5, p. 165, 2018.
- MEIBALANE, R. et al. Outbreak of influenza in a neonatal intensive care unit. **The Journal of Pediatrics**, v. 91, n. 6, p. 974–976, 1977.
- MESQUITA, M. et al. HIV-1 and its gp120 inhibits the influenza A(H1N1)pdm09 life cycle in an IFITM3-dependent fashion. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–14, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7ª ed. [s.l.] MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe técnico: Campanha Nacional de Vacinação contra

a Influenza. p. 43, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE MS. **Informe Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde -Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 31 de 2018.** [s.l: s.n.].

MONTALVÃO, S. et al. Large-scale bioprospecting of cyanobacteria, micro- and macroalgae from the Aegean Sea. **N Biotechnol**, v. 33, n. 3, p. 399–406, 2016.

NAYAK, D. P.; HUI, E. K. W.; BARMAN, S. Assembly and budding of influenza virus. **Virus Research**, v. 106, n. 2 SPEC.ISS., p. 147–165, 2004.

NICHOLSON, K. G.; WOOD, J. M.; ZAMBON, M. Influenza. **Lancet (London, England)**, v. 362, n. 9397, p. 1733–45, 2003.

NIEDERMEYER, T. H. ORST J. Anti-infective Natural Products from Cyanobacteria. **Planta medica**, v. 81, n. 15, p. 1309–1325, 2015.

OKAZAKI, K. et al. Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. **Arch Virol**, v. 145, n. 5, p. 885–893, 2000.

OSTERHAUS, A. D. Influenza B Virus in Seals. **Science**, v. 288, n. 5468, p. 1051–1053, 2000.

PACIFICO, S. et al. Influence of harvest season on chemical composition and bioactivity of wild rue plant hydroalcoholic extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 90, p. 102–111, 1 abr. 2016.

PALESE, P.; SHAW, M. L. Orthomyxoviruses. Fields virology. In: DAVID M. KNIPE, PETER M. HOWLEY; ASSOCIATE EDITORS, D. E. G. (Ed.). **Fields virology**. [s.l.] Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1647–1690.

PAULA KIURU, M. VALERIA D'AURIA, CHRISTIAN D. MULLER, PÄIVI TAMMELA, HEIKKI VUORELA, J. Y.-K. Blue Growth. **Integrated Maritime Policy**, p. 1–6, 2014.

PEIRIS, J. S. M.; POON, L. L. M.; GUAN, Y. Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. **Journal of Clinical Virology**, v. 45, n. 3, p. 169–173, 1 jul. 2009.

PIELAK, R. M.; SCHNELL, J. R.; CHOU, J. J. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 18, p. 7379–7384, 2009.

PINTO, L. H.; LAMB, R. A. Influenza virus proton channels. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 629, 2006.

PRICE, D. A.; POSTLETHWAITE, R. J.; LONGSON, M. Influenzavirus A2 infections presenting with febril convulsions and gastrointestinal symptoms in young children. **Clin Pediatr (Phila)**, v. 15, n. 4, p. 361–367, 1976.

RESTREPO, M. I.; MAZO, M.; ANZUETO, A. Gripe A (H1N1). Experiencia de Estados Unidos. **Archivos de Bronconeumología**, v. 46, p. 13–18, jan. 2010.

REYNOLDS, C. S.; JAWORSKI, G. H. M. Enumeration of natural *Microcystis* populations. **British Phycological Journal**, v. 13, n. 3, p. 269–277, 1978.

ROEHM, N. W. et al. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. **Journal of immunological methods**, v. 142, n. 2, p. 257–65, 13 set. 1991.

SAITO, R.; LI, D.; SUZUKI, H. Amantadine-resistant influenza A (H3N2) virus in Japan, 2005–2006. **The New England journal of medicine**, v. 356, n. 3, p. 312–3, 2007.

SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2008.

SATHASIVAM, R.; KI, J. S. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. **Mar Drugs**, v. 16, n. 1, 2018.

SAVIDIS, G. et al. The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication. **Cell Reports**, v. 15, n. 11, p. 2323–2330, 2016.

SCHOLTISSEK, C. et al. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. **Virology**, v. 87, n. 1, p. 13–20, 1978.

SCUDIERO, D. A et al. Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human an. p. 4827–4833, 1988.

SETTEMBRE, E. C.; DORMITZER, P. R.; RAPPUOLI, R. H1N1: Can a pandemic cycle be broken? **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 24, p. 1–4, 2010.

SHANAB, S. M. M. et al. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 608–615, 2012.

SINGH, R. S. et al. Cyanobacterial lectins characteristics and their role as antiviral agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 475–496, 2017.

SMITH, S. E. et al. IFITM proteins - Cellular inhibitors of viral entry. **Current Opinion in Virology**, v. 4, p. 71–77, 2014.

SOUZA, T. M. L. et al. The alkaloid 4-methylaaptamine isolated from the sponge *Aaptos aaptos* impairs Herpes simplex virus type 1 penetration and immediate-early protein synthesis. **Planta Medica**, v. 73, n. 3, p. 200–205, 2007.

SOUZA, T. M. L. et al. Antiviral resistance surveillance for influenza A virus in Brazil: Investigation on 2009 pandemic influenza A (H1N1) resistance to oseltamivir. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 1, p. 98–99, 2011.

SOUZA, T. M. L. et al. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm2009 strains found in Brazil are endowed with permissive mutations, which compensate the loss of fitness imposed by antiviral resistance. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 101–105, fev. 2015.

SOYE, K. J. et al. In vitro inhibition of mumps virus by retinoids. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 1, 2013.

SZRETTER, K. J.; BALISH, A. L.; KATZ, J. M. Influenza: Propagation, Quantification, and Storage. In: **Current Protocols in Microbiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006. v. Chapter 15p. Unit 15G.1.

TUMPEY, T. M.; BELSER, J. A. Resurrected Pandemic Influenza Viruses. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 79–98, out. 2009.

VENKATARAMAN, P.; LAMB, R. A.; PINTO, L. H. Chemical rescue of histidine selectivity filter mutants of the M2 ion channel of influenza A virus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 22, p. 21463–21472, 2005.

VILLALÓN-LETELIER, F. et al. Host cell restriction factors that limit influenza a infection. **Viruses**, v. 9, n. 12, p. 1–18, 2017.

VON ITZSTEIN, M. The war against influenza: Discovery and development of sialidase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 12, p. 967–974, 2007.

WEBSTER, R. G. Influenza: An emerging disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 436–441, 1998.

WHO. Pandemic Influenza Preparedness and Response: A WHO Guidance Document. **Pandemic Influenza Preparedness and Response: A WHO Guidance Document**, p. 64, 2009.

WHO. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. **World Health Organization 2011**, p. 153, 2011.

WHO. Current WHO phase of pandemic alert for Pandemic (H1N1) 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/phase/en/>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

WHO. WHO | News release. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/seasonal-flu/en/>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

WHO. Key Facts About Seasonal Flu Vaccine. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/protect/keyfacts.htm>>. Acesso em: 18 jul. 2018a.

WHO. WHO | News release. Disponível em: <[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))>. Acesso em: 6 out. 2018b.

WHO | Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018 southern hemisphere influenza season. **WHO**, 2017.

WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza - VIDRL. Disponível em: <http://www.influenzacentre.org/centre_gisrs.htm>. Acesso em: 29 nov. 2018.

WILEY, D. C.; SKEHEL, J. J. Infl1Jenza Virus. **Structure**, 1987.

WRIGHT, P. F.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Orthomyxoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 2p. 1691–1730.

WU, Q. et al. Antiviral flavonoids from *Mosla scabra*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 5, p. 429–433, 2010.

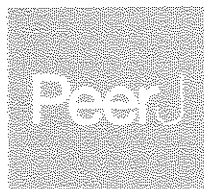
XU, X. et al. Reassortment and evolution of current human influenza A and B viruses. **Virus Research**, v. 103, n. 1–2, p. 55–60, 2004.

ZAINUDDIN, E. N. et al. Cyanobacteria a potential source of antiviral substances against influenza virus. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 191, n. 3–4, p. 181–182, 2002.

ZAINUDDIN, E. N. et al. Cyclic depsipeptides, ichthyopeptins A and B, from *Microcystis ichthyoblabe*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 7, p. 1084–1088, 2007.

ZYL, G. VAN. Laboratory Findings. In: KAMPS, B. S.; HOFFMANN, C.; PREISER, W. (Eds.). . **Influenza Report 2006**. Paris, Cagliari, Wuppertal, Sevilla: Flying Publisher, 2006. p. 150–159.

ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INDEXADA PEERJ



Inhibitory effect of microalgae and cyanobacteria extracts on influenza virus replication and neuraminidase activity

Thauane Silva¹, Paulo S. Salomon², Lidilhone Hamerski³, Juline Walter⁴, Rafael B. Menezes⁵, José Edson Siqueira⁶, Aline Santos⁷, Jessica Aparecida Moraes Santos⁸, Natália Ferme⁹, Thaise Guimaraes¹⁰, Giovana O. Fistarol¹¹, Paulo I. Hargreaves¹², Cristiane Thompson¹³, Fabiano Thompson¹⁴, Thiago Moreno Souza¹⁵, Marilda Siqueira¹⁶ and Milene Miranda¹⁷

¹Laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratório de Fitoplâncton Marinho, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Laboratório de Microbiologia Marinha, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁶Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT

Background. The influenza virus can cause seasonal infections with mild to severe symptoms, circulating worldwide, and it can affect people in any age group. Therefore, this infection is a serious public health problem that causes severe illness and death in high-risk populations. Every year, 0.5% of the world's population is infected by this pathogen. This percentage can increase up to ten times during pandemics. Influenza vaccination is the most effective way to prevent disease. In addition, anti-influenza drugs are essential for prophylactic and therapeutic interventions. The oseltamivir (OST, a neuraminidase inhibitor) is the primary antiviral used in clinics during outbreaks. However, OST resistant viruses may emerge naturally or due to antiviral pressure, with a prevalence of 1–2% worldwide. Thus, the search for new anti-influenza drugs is extremely important. Currently, several groups have been developing studies describing the biotechnological potential of microalgae and cyanobacteria, including antiviral activity of their extracts. In Brazil, this potential is poorly known and explored.

Methods. With the aim of increasing the knowledge on this topic, 38 extracts from microalgae and cyanobacteria isolated from marine and freshwater biomes in Brazil were tested against: cellular toxicity; OST-sensitive and resistant influenza replications; and neuraminidase activity.

Results. For this purpose, Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-infected cells were treated with 200 µg/mL of each extract. A total of 17 extracts (45%) inhibited influenza A replication, with seven of them resulting in more than 80% inhibition. Moreover, functional assays performed with viral neuraminidase revealed two extracts (from *Leptolyngbya* sp. and *Chlorellaceae*) with IC₅₀ mean < 210 µg/mL for influenza A and B, and also OST-sensitive and resistant strains. Furthermore, MDCK cells exposed to 1 mg/mL of all the extracts showed viability higher than 80%.

Submitted 23 April 2018
Accepted 10 September 2018
Published 26 October 2018

Corresponding author
Milene Miranda,
mmiranda@ioc.fiocruz.br,
milenedasmiranda@gmail.com

Academic editor
Petroneg /iao

Additional Information and
Declarations can be found on
page 13

DOI 10.7717/peerj.5716

© Copyright
2018 Silva et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS