Sonia Tatsumi Sakata

"ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE ORGANISMOS MARINHOS UTILIZANDO COMO MODELO OS VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE E METAPNEUMOVIRUS AVIÁRIO"

CAMPINAS

2013

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SONIA TATSUMI SAKATA

"ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE ORGANISMOS MARINHOS UTILIZANDO COMO MODELO OS VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE E METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO"

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Sonia Tatsumi Sakata e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Weis Arns
Coorientadora: Dra. Luciana Konecny Kohn

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Sa29a

Sakata, Sonia Tatsumi, 1978-
Atividade antiviral de extratos de organismos marinhos utilizando como modelo os vírus da doença de Newcastle e Metapneumovirus aviário / Sonia Tatsumi Sakata. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Clarice Weis Arns.
Coorientador: Luciana Konecny Kohn.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Agentes antivirais. 2. Organismos marinhos. 3. Vírus da doença de Newcastle. 4. Metapneumovírus aviário. I. Arns, Clarice Weis, 1956-. II. Kohn, Luciana Konecny. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Antiviral activity of marine organisms extracts using as model Newcastle disease virus and avian Metapneumovirus
Palavras-chave em Inglês:
Antiviral agents
Marine organisms
Newcastle disease virus
Avian metapneumovirus
Área de concentração: Microbiologia
Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular
Banca examinadora:
Clarice Weis Arns [Orientador]
Paulo Eduardo Brandão
Luciana Maria de Hollanda
Data da defesa: 27-02-2013
Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 27 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Clarice Weis Arns (orientadora) _____
Assinatura

Dra. Luciana Maria De Hollanda _____
Assinatura

Dra. Carmen Lucia Queiroga _____
Assinatura

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud _____
Assinatura

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão _____
Assinatura

A G R A D E C I M E N T O S

Primeiramente, agradeço imensamente minha família por todo o apoio, apesar da enorme e dolorosa distância.

Nada disso seria possível, se não fosse a Profª Dra Clarice Arns abrir as portas de seu laboratório e me dar o prazer e orgulho de ter feito parte da equipe LVA.

Obrigada, Profa. Luciana Kohn, por todo o aprendizado.

Ao Prof. Dr. Roberto Berlinck e sua equipe do Instituto de Química de São Carlos da USP pelo fornecimento dos extratos.

Colegas e amigos do LVA, especialmente a Profa Márcia Mercês, Matheus, Paulo Anselmo, Marina e Juliana pela competência dentro do laboratório e amizade fora dele.

Obrigada também aos funcionários Paula e Geneci por toda a sabedoria e simpatia compartilhada.

Agradeço à Doutora Maria Ângela e Professora Helena Lage pelo suporte profissional.

Agradecimento especial para o Prof. Dr. Paulo Brandão, Profª Dra. Luciana Maria de Hollanda, Prof. Dr. Marcelo Lancellotti, Profª Dra. Carmen Queiroga e Profª Dra Liana Verinaud pela paciência, sugestões para o trabalho e incentivos.

A todos da secretaria de pós graduação do Instituto de Biologia da Unicamp pela solicitude.

Agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação de Desenvolvimento da Unicamp (Funcamp) pelo suporte financeiro.

Aos eternos amigos, Clarice Y., Diogo, Jacaré, Ricardo Agum, Maurício, Rods, Cássio, dona Luíza, Shirley, Jú, Anna, Elaine, Vivi e muitos outros não menos importantes, agradeço por todo o companheirismo nos melhores e piores momentos!

Sou enormemente grata ao Júlio por toda a paciência, além de tornar minha vida mais feliz.

À Mia, Marie, Saburo, Turtles e Ronaldo por cada minuto de alegria juntos.

Lista de acrônimos e siglas

AcOEt	Acetato de etila
aMPV	Metapneumovírus aviário
APMV-1	Paramixovírus aviário do Tipo 1
ºC	Graus Celsius
CC50%	Concentração citotóxica a 50%
CER	*Chicken Embryo Related cells*
CMNT	Concentração máxima não tóxica
Ct	*Cycle threshold*
DI	Doses infectantes
DMSO	Dimetilsulfóxido de sódio
DRMA06	Pirocinina A
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
F	Proteína de fusão
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
fwd	*Primer forward*
h	Horas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HN	Hemaglutinina Neuraminidase
HSV-1	Vírus da herpes simples do tipo-1
IQSC-USP	Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo
kb	Kilobase
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LVA	Laboratório de Virologia Animal
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM	Meio essencial mínimo
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro

µm	Micrometro
mg	Miligrama
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo
NDV	Vírus da doença de Newcastle
nm	Nanometro
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polymerase quantitativa
rev	*Primer reverse*
RNA	Ácido ribonucleic
SCI	Síndrome da cabeça inchada
SFB	Soro fetal bovino
SHS	*Swollen head syndrome*
SI	Índice de seletividade
TRT	Rinotraqueíte em perus

SUMÁRIO

RESUMO ..... **viii**

ABSTRACT ..... **x**

1. INTRODUÇÃO **1**

2. OBJETIVOS **11**

2.1. Geral 11
2.2. Específicos 11

3. MATERIAL E MÉTODOS **12**

3.1. Amostras virais 12
3.2. Linhagem celular 12
3.3. Preparo dos extratos 13
3.4. Padronização da concentração do extrato 15
3.5. Titulação viral 16
3.6. Triagem da atividade antiviral 16
3.7. Avaliação do mecanismo de ação antiviral 18
3.8. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real de extrato puro 20

4. RESULTADOS **23**

4.1. Triagem da atividade antiviral 23
4.2. Avaliação do Mecanismo de Ação 28
4.3. PCR em tempo real para extrato puro 29

5. DISCUSSÃO **32**

6. CONCLUSÕES **36**

7. REFERÊNCIAS BILBIOGRÁFICAS **37**

RESUMO

Produtos naturais isolados a partir de invertebrados e organismos marinhos têm sido objeto de pesquisas contínuas ao longo dos últimos cinquenta anos, principalmente devido à sua complexidade estrutural e potentes atividades biológicas.

O presente trabalho teve como proposta ampliar e aprofundar a investigação de substâncias bioativas em extratos de organismos marinhos, junto ao IQSC-USP/Projeto temático, realizando bioensaios de atividade antiviral no laboratório de virologia da Unicamp.

Com o objetivo de realizar uma triagem para pesquisar substâncias com ação antiviral, foram eleitas duas espécies de vírus de destaque na avicultura, o Metapneumovirus aviário (aMPV) e o vírus da Doença de Newcastle (NDV), representantes da família Paramyxoviridae.

As propriedades em comum dos vírus dentro das respectivas subfamílias, como a organização genômica, sequências das proteínas e suas atividades biológicas, permitem a utilização do aMPV como modelo de estudo para importantes agentes infecciosos da subfamília Pneumovirinae, e o NDV da subfamília Paramyxovirinae.

Para a triagem de compostos antivirais foi realizada a avaliação *in vitro* na linhagem celular Chicken Embryo Related (CER) para a propagação dos vírus e analisar os resultados de inibição viral frente a diferentes extratos e substâncias. Dos cento e vinte e cinco extratos testados frente ao aMPV, sete demonstraram ser ativos, e seis com alto potencial antiviral. Inicialmente, cento e quarenta e sete extratos foram testados frente ao NDV, porém, o resultado foi inconclusivo devido a problema com o título da amostra viral. Assim, os sete extratos ativos e os seis com alto potencial antiviral contra o aMPV foram testados quanto à capacidade de inibição do NDV. Apesar das similaridades dos vírus da família Paramyxoviridae, os extratos não tiveram atividade contra o NDV, como ocorreu frente ao aMPV.

As amostras ativas foram estudadas em três tipos de tratamento a fim de determinar os possíveis mecanismos de ação dos extratos: Pré-tratamento, fases de adsorção e/ou penetração do vírus na célula; Pós-tratamento, etapas intracelulares de replicação do vírus; e Inativação Viral. Pela análise visual do efeito citopático, os sete extratos ativos contra aMPV, quatro interrompem as etapas intracelulares de replicação

do vírus, dois agem nas fases de adsorção e/ou penetração do vírus à célula, e um não tinha quantidade suficiente para realizar o teste.

Com a finalidade de avaliar os possíveis mecanismos de ação com maior objetividade, menor risco de contaminação e alta especificidade, testou-se a metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Utilizando um composto puro (pirocina A) frente ao aMPV em CER, a metodologia se demonstrou eficiente. Esse dado foi confirmando pela diminuição de RNA viral quando ocorre a atividade antiviral, dando indícios de atuação do composto em etapas intracelulares de replicação do aMPV.

A detecção de extratos com atividade antiviral nas situações testadas neste trabalho corrobora o valor da biodiversidade marinha como fonte de produtos promissores na terapêutica de enfermidades virais. Portanto, a necessidade de estudos sobre esses vírus e do desenvolvimento de novos insumos a serem utilizados nos seus controles é de grande importância ponderado a crescente projeção da indústria avícola brasileira no comércio mundial.

Palavras-chave: Antiviral; organismos marinhos; vírus da doença de Newcastle; Metapneumovirus aviário.

ABSTRACT

Natural products isolated from invertebrates and marine organisms have been studied over the past fifty years, mainly due to their structural complexity and potent biological activities.

This project was proposed to broaden and deepen the research of bioactive substances in extracts of marine organisms, with the IQSC-USP group, performing bioassays antiviral activity in the laboratory of virology at Unicamp.

In order to perform a screening to search antiviral substances were elected two species prominent in poultry, the avian Metapneumovirus (aMPV) and Newcastle disease virus (NDV), representatives of the family Paramyxoviridae.

The common properties of the virus within their respective subfamilies, such as genomic organization, sequences of proteins and their biological activities, allow the use of aMPV as a study model for important infectious agents of Pneumovirinae subfamily, and NDV Paramyxovirinae subfamily.

For antiviral screening, compounds were tested *in vitro* using Chicken Embryo Related (CER) cell lineage for the propagation of the virus and analyze the results of viral inhibition against various substances. Among one hundred twenty five extracts tested against aMPV, seven were actives and six have been shown high antiviral potential against the virus. Initially, one hundred fourty seven extracts were tested against NDV. However, the result was inconclusive due to problems with the titer of the viral sample. Thus, the seven active extracts and six extracts with high antiviral potential against the aMPV were tested for the ability to inhibit NDV. Despite the similarities of viruses of the family Paramyxoviridae, the extracts had no activity against NDV, as occurred against aMPV.

The active samples were studied in three types of treatment in order to determine the possible mechanisms of action of the extracts: Pre-treatment, stages of adsorption and / or penetration of the virus into the cell; Post-treatment, intracellular steps of virus replication; and Viral Inactivation. At visual analysis of cytopathic effect, from all 7 extracts active against aMPV, 4 disrupt intracellular steps of virus replication, 2 act on adsorption and / or penetration stages of the virus into the cell, and 1 was not enough to perform the test.

In order to assess the possible mechanisms of action more objectively, lower contamination risk and high specificity, the polymerase chain reaction (PCR) in real time methodology was tested. Using a pure compound (pirocina A) against aMPV in CER cell lineage, the methodology is demonstrated efficient. This was confirmed by the decrease of viral RNA when occurs antiviral activity, an evidence of compound's action on intracellular steps of aMPV replication.

The detection of extracts with antiviral activity in this study confirms the value of marine biodiversity as a source of promising products in the viral diseases therapeutic. Therefore, the primordiality for more studies and the development of new inputs to control these viruses is extremely important to increasing of Brazilian poultry industry in world trade.

Key words: Antiviral agents; marine organisms; Newcastle disease vírus; avian Metapneumovirus.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de produtos naturais com propriedades terapêuticas é uma prática antiga e bem estabelecida, estimando-se que cerca de 60% dos fármacos atuais possuem origem direta ou indireta da natureza (Cragg et al., 1997; 2004).

Apesar do ambiente terrestre constituir uma importante fonte desses produtos, o mar possui a maior biodiversidade, representando trinta e quatro dos trinta e seis filos (Jimeno, 2002). Pressões ecológicas, como competições por espaço e alimento, incrustações em superfícies, predação e sucesso reprodutivo, conduzem a uma evolução de metabólitos pelos organismos aquáticos e com as mais diversas atividades biológicas, sobretudo em Bentos (Ireland et al., 2000). A importância dos organismos bentônicos, seres vivos fixos ou associados ao substrato, destaca-se principalmente pela sua abundância e diversidade. Isto se deve em grande parte pela sua característica filtradora, tornando-os sensíveis a variações ambientais, como disponibilidade de nutrientes, tipo de substrato/sedimento, qualidade da água e quantidade de oxigênio dissolvido, o que os capacitam como ferramentas de monitoramento ambiental (EMBRAPA, 2008).

No Brasil, a investigação do ambiente marinho como fonte de produtos naturais é ainda incipiente, porém não menos importante. Tendo em vista que a costa brasileira é a segunda em extensão no mundo,a região abriga uma grande variedade de áreas geográficas, habitats e exposição a diferentes fatores naturais. Assim, destaca-se os estudos realizados pelo Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo com a pesquisa de atividades biológicas em extratos de microrganismos marinhos (Berlinck et al., 2004).

O presente estudo surgiu como desdobramento do projeto intitulado "Investigação do potencial biotecnológico e metabólico de organismos marinhos para processos de biorremediação e produção de substâncias com atividades antivirais, anti Leishmania e antiinflamatória" (FAPESP 10/50190-2), realizando a pesquisa de atividade antiviral.

Os organismos marinhos que deram origem aos extratos utilizados neste trabalho foram coletados na Baía de Todos os Santos (BA) e em São Sebastião (SP). Essa região da costa possui grande variabilidade de sedimento resultante de complexos padrões de sedimentação com areia fina e muito fina; predomínio de águas quentes (>20ºC); salinidade maior que 36,4 ppm; influência de águas frias oceânicas associada ao fenômeno de ressurgência costeira (Amaral, 2006). A ressurgência costeira consiste na associação entre o efeito de rotação da terra (efeito de Coriolis) e o atrito dos ventos na superfície do mar empurra as águas costeiras de superfície para longe da costa, gerando movimentos ascendentes de massas de águas profundas (até 350 m), ricas em nutrientes. Essa movimentação da água resulta em maior aporte de nutrientes e oxigênio aoS Bentos, e, consequentemente, no desenvolvimento da fauna marinha com o crescimento acelerado do fitoplâncton (Castro et al., 2012). Esses fatores tornam os organismos bentônicos da região bastante promissores na busca de metabólitos secundários com aplicabilidade terapêutica pela sua vasta biodiversidade.

A esponja marinha é um exemplo de rica fonte de produtos naturais potentes com diversas propriedades farmacológicas e de crescente participação no desenvolvimento de novas drogas (Sarma et al., 1993). Os nucleosídeos espongotimidina e espongouridina foram os primeiros compostos isolados de esponjas dos quais originou o Ara-C, um agente anticâncer, e o Ara-A, a primeira droga antiviral,

segundo estudo pioneiro de Bergmann e Feeney (1951). Desde então, diversos compostos com atividade antiviral foram desenvolvidos a partir de organismos marinhos, como o ciclodidemniserinol, um policetídeo extraído de ascídias com capacidade de inibir infecção por HIV (vírus da imunodeficiência humana) *in vitro* (Mitchell et al., 2000); e a dragmacidina F, um alcalóide oriundo de esponjas que age como inibidor de HHV-1 (Herpesvírus Humano Tipo 1) (Cutignano et al., 2000).

As doenças causadas por vírus constituem os mais sérios problemas de saúde pública e saúde animal no mundo, tendo em vista a dificuldade do seu diagnóstico e do seu tratamento efetivo. No decorrer dos últimos anos, novos vírus de interesse veterinário foram surgindo e muitos outros apresentam caráter reemergente (Chiang et al., 2002). Dois dos principais obstáculos para o tratamento e profilaxia de infecções virais são a atuação obrigatória intracelular dos vírus e a contínua mutação de algumas linhagens. Logo, o desenvolvimento de substâncias alvos específicas é dificultado pela existência de poucos mecanismos exclusivamente celulares (Jassim & Naji, 2003 e Abou-Karam & Shier, 1990).

No estudo de antivirais, o ensaio mais empregado é o de triagem, no qual é avaliada a atividade de extratos e, por fim, são selecionados os que apresentam resultados promissores (Cos et al., 2006). Além disso, a triagem permite a realização de ensaios com um grande número de diferentes extratos (Simoni et al.,2007; Brandão et al., 2010). Os testes antivirais, principalmente os de triagem, empregam uma metodologia simples e confiável, gerando informações úteis do extrato analisado. Com isso, estudos mais refinados de como e onde o extrato atua devem ser explorados (Simoni et al., 2003; Cos et al., 2006).

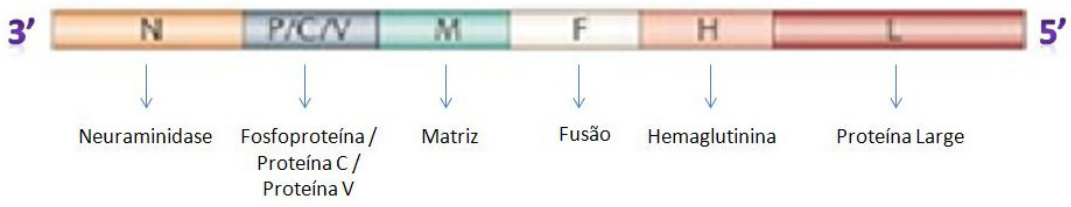
A triagem de compostos antivirais requer o desenvolvimento de um sistema de cultura celular ideal para a propagação dos vírus, e a escolha do método mais adequado para avaliar os resultados das substâncias frente aos vírus. Os métodos utilizados são visuais (análise microscópica do efeito citopático), colorimétricos (cristal violeta, MTT e vermelho neutro) e fluorimétrico (Azul de Alamar, bisbenzidina rodamina 6G) (Smee et al., 2002)

Para este trabalho foram selecionadas duas espécies de vírus causadores das doenças respiratórias de maior destaque na avicultura mundial, o Metapneumovirus aviário (aMPV) e o vírus da doença de Newcastle (NDV).

A contínua intensificação da produção no setor avícola propicia determinadas condições que favorecem a ocorrência e disseminação de algumas doenças infecciosas, principalmente aquelas associadas ao trato respiratório. As doenças respiratórias que acometem as aves domésticas criadas comercialmente geram perdas econômicas pelo aumento da mortalidade, gastos com medicamentos, queda de postura, redução na qualidade e eclodibilidade dos ovos (Minharro et al. 2001).

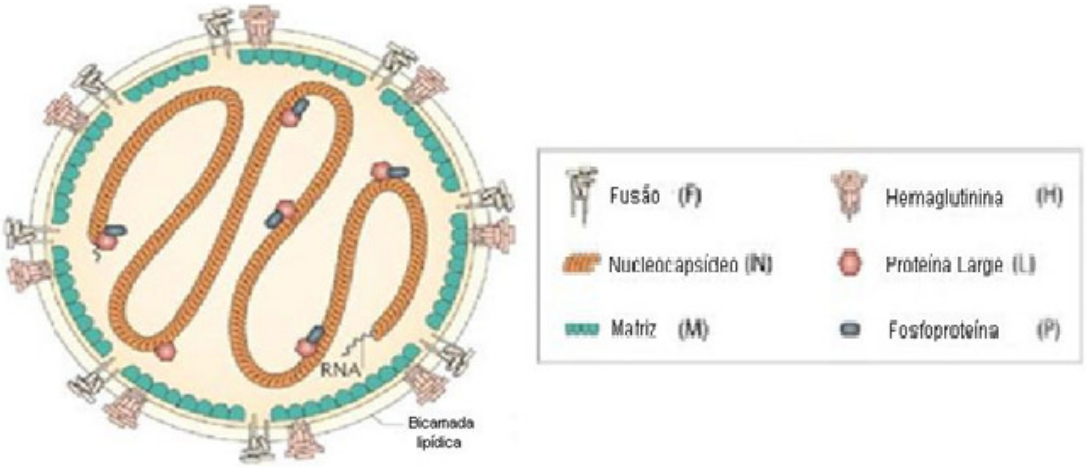
O aMPV e o NDV pertencem à família Paramyxoviridae, apresentam o genoma RNA, fita simples, não segmentado, de polaridade negativa e com cerca de 15kb de tamanho, como apresentado na figura 1.

<u>Figura1</u>: Organização geral do genoma de Paramyxovirus. Representação das posições dos principais genes e as respectivas proteínas codificadas.



Como ilustrado na figura 2, a morfologia do vírion é esférica, às vezes pleomórfica, com 150 a 200nm de diâmetro, um nucleocapsídeo em forma de espiral de 12 a 17 nm de diâmetro. As partículas virais apresentam projeções típicas de dois tamanhos: a maior, uma gliproteína (HN) associada à atividade de hemaglutinação e neuraminidase; a espícula menor, formada pela glicoproteína F, associada à fusão do envelope viral com a membrana celular da célula hospedeira, resultando no efeito citopático mais característico, a formação de sincícios (Brooks et al., 2009).

Figura 2: Estrutura básica do virion da família Paramyxoviridae.



As propriedades em comum dos vírus dentro das respectivas subfamílias, como a organização genômica, sequências das proteínas e suas atividades biológicas, permitem a utilização do aMPV como modelo de estudo para importantes agentes infecciosos da subfamília Pneumovirinae, e o NDV da subfamília Paramyxovirinae. Assim, o aMPV pode ser modelo de estudo de agentes como o Metapneumovírus humano, vírus sincicial respiratório humano e bovino; e o NDV para o vírus da

caxumba e Parainfluenza vírus humano (Tortora, 2005), como exemplificado na figura 3.

<u>Figura 3</u>: Exemplos de vírus de importância na saúde pública das subfamílias Paramyxovirinae e Pneumovirinae para quais o aMPV e o NDV podem servir de modelo de estudo.

Subfamília	Espécies	Hospedeiros
Paramyxovirinae	Vírus da Caxumba (MuV)	Humanos
	Vírus do sarampo (MV)	Humanos
	Vírus da cinomose (CDV)	Caninos (leões, furões, guaxinins, pandas etc)
	Vírus Hendra (HeV)	Morcegos (equinos e humanos)
	Vírus da doença de Newcastle (NDV ou APMV-1)	**Galinhas, patos, gansos, perus, aves silvestres e aquáticas, humanos**
Pneumovirinae	Vírus respiratório sincicial humano (hRSV)	Humanos
	Vírus respiratório sincicial bovino (BRSV)	Bovinos (ovinos)
	Metapneumovírus humano (hMPV)	Humano
	Metapneumovírus aviário (aMPV)	**Galinhas e perus**

O aMPV vem adquirindo papel de destaque entre os patógenos respiratórios que afetam galinhas reprodutoras, poedeiras comerciais e frangos de corte (Cook, 2000). O vírus é conhecido como causador da Rinotraqueíte Infecciosa dos Perus (TRT) e, está associado à Síndrome da Cabeça Inchada nas galinhas (SCI) (Arns & Hafez, 1992). A SCI está disseminada por todo mundo, causando grandes perdas econômicas. Em matrizes e poedeiras, a enfermidade leva a um quadro respiratório, com edema facial e submandibular (Figura 4), presença de sinais neurológicos, queda na produção e na

qualidade dos ovos. Em frangos de corte são observados secreção nasal, depressão e edema subcutâneo (Arns & Hafez, 1992). Freqüentemente os quadros são agravados pela presença de infecções secundárias causadas principalmente por *Escherichia coli* (Van de Zande et al. 1999).

Figura 4: Ave doméstica com sinais clínicos característicos da Síndrome da Cabeça Inchada, como edema dos seios infraorbital, nasal e frontal; descarga ocular; coriza; e dificuldade respiratória

O aMPV é classificado em subtipos A, B, C e D, baseado na análise de sequências de nucleotídeos e aminoácidos, predominando a ocorrência dos subtipos A e B (D'arce, 2005). A replicação do vírus ocorre nos tecidos nasais e sinusais, na traquéia e pulmões, porém ela é mais limitada ao trato respiratório superior, onde as partículas virais são detectadas mais facilmente, até dez dias após a infecção (Cook, 2000; Nauwynck et al., 1999).

A transmissão de aMPV ocorre de forma horizontal, não havendo evidências de transmissão vertical. A difusão do vírus é facilitada pelo ar, pessoas, animais silvestres e veículos, sendo mais evidente nas aves criadas em galpões do que naquelas mantidas

em gaiolas, sugerindo que o contato físico seja um importante fator na transmissão da doença (Peres et al., 2006).

As vacinas em circulação, vivas e atenuadas, são eficazes se administradas corretamente, mas problemas relacionados à reversão de virulência surgem e há evidências de possível evolução do vírus, não garantindo a supressão da circulação viral (Schat, Baranowski, 2007; Mckinley et al., 2008).

Outro vírus economicamente preocupante aos produtores de aves em todo o mundo é o NDV, também conhecido como Paramyxovírus aviário do tipo 1 (APMV-1) (MAPA, 2009). Recentemente, análises do tamanho dos genomas e sequências de genes revelaram dois lados distintos dos APMV-1: classe I e II. Enquanto os isolados de classe I são recuperados a partir de amostras de aves silvestres e aves do comércio de aves vivas; os isolados de classe II são coletados principalmente a partir de aves domésticas nas formas virulentas (Orsi, 2010).

A doença de Newcastle é uma enfermidade viral aguda, altamente contagiosa, que acomete aves silvestres e comerciais, com sinais respiratórios, frequentemente seguidos por manifestações nervosas (figura 5), diarréia e edema da cabeça. A manifestação clínica e a mortalidade variam segundo a patogenicidade da amostra do vírus. Essa patogenicidade varia de muito alta (amostra velogênica), para intermediária (amostra mesogênica) e muito baixa (amostra lentogênica) (MAPA, 2009).

<u>Figura 5</u>: Ave doméstica apresentando sintoma nervoso (torcicolo) e inchaço de cabeça, característicos da doença de Newcastle.

A infecção ocorre através da inalação ou ingestão de água e ração contaminada, sendo que o vírus está presente no ar exalado pelas aves, nas fezes e em toda parte da carcaça da ave durante a infecção aguda e na morte. A contaminação de outras aves se dá por meio de aerossóis e pela ingestão de água ou comida contaminada (MAPA, 2009).

A doença de Newcastle tem distribuição mundial, com áreas onde é endêmica, ou com áreas/países considerados livres da doença e está listada no Código Zoosanitário Internacional da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), sendo compulsória a notificação dos focos (Cattoli et al., 2009) . Países exportadores estabelecem monitoramentos constantes da doença, para avaliar a sua situação, assim como para tentar evitar a entrada da doença no país. Em muitos países, incluindo o Brasil, a doença é controlada em plantéis comerciais através da vacinação, com vacinas aprovadas e com controle de qualidade. Em alguns estados brasileiros são vacinadas apenas as matrizes, para transferência de imunidade materna às progênies. A queda completa do nível de

anticorpos, que ocorre na idade de abate de frangos de corte, é utilizada como uma forma de verificar se há vírus circulando em determinada região (MAPA, 2009).

O controle dessas doenças é de importância vital para o Brasil, que é o maior exportador e o 3º maior produtor mundial de frango de corte (OIE, 2004). A capacidade produtiva da avicultura nacional oferece condições vantajosas para que a mesma compita em mercados internacionais, mesmo frente a países que fornecem subsídios para os produtores. Deste modo, a presença do produto brasileiro nestes mercados só pode ser diminuída através de alegadas dificuldades ou barreiras sanitárias, já que as taxações e impostos que incidem sobre o produto não consegue diminuir o seu custo relativo (Orsi, 2010).

Portanto, a necessidade de estudos sobre estes vírus e do desenvolvimento de novos insumos a serem utilizados nos seus controles é de grande importância ponderado a crescente projeção da indústria avícola brasileira no comércio mundial.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Realizar ensaios de triagem para determinar a ativIdade antiviral de extratos de organismos marinhos frente ao Metapneumovírus aviário (aMPV) e ao vírus da doença de Newcastle.

2.2. Específicos

- Determinar os possíveis mecanismos de ação dos extratos marinhos que apresentarem atividade antiviral.

- Testar metodologia de PCR em tempo real para avaliar possíveis mecanismos da ação de um composto puro proveniente de um fungo de esponja.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras virais

A amostra viral de aMPV usada nos experimentos foi a SHS/BR121 proveniente do próprio Laboratório de Virologia Animal (LVA), Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP, São Paulo. Trata-se de um aMPV do subtipo A isolada a partir de amostras de campos de aves domésticas com síndrome da cabeça inchada no Brasil (Arns & Hafez, 1995; Dani et al., 1999; D`Arce et al., 2005).

O NDV empregado no experimento foi inicialmente o NDV-1547, amostra vacinal lentogênica (La Sota) adaptada para a linhagem celular CER fornecida pela doutora Maria Ângela Orsi do LANAGRO/Campinas-SP (Laboratório Nacional Agropecuário). Por problema no título desta amostra viral, o vírus foi trocado pelo NDV-945 de mesma origem.

Tratando-se de um vírus causador de uma enfermidade que faz parte da "lista A" do código zoosanitário internacional da Organização Mundial de Saúde (OMS), somente amostras vacinais de NDV podem ser utilizadas em laboratórios não oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2009).

3.2. Linhagem celular

A linhagem celular utilizada no trabalho foi a CER (Chicken Embryo Related), fornecida pelo professor doutor Hafez Mohamed Hafez do Laboratório Estadual de Stuttgart /Alemanha. Trata-se de uma linhagem híbrida derivada de fibroblastos de

embrião de galinha e de células de rim de hamsters jovens, a BHK-21 (Silva et al., 2007).

As células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM - Nutricell®) acrescido de 10% em volume de soro fetal bovino (SFB – Cripion®) e incubadas a 37ºC com 5% de CO_2.

3.3. Preparo dos extratos

Os extratos de organismos marinhos foram coletados no litoral Sul do Estado de São Paulo e, na Baía de Todos os Santos, no Estado da Bahia e preparados pela equipe do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP), liderado pelo professor doutor Roberto Berlinck, coordenador do projeto temático "Investigação do potencial biotecnológico e metabólico de organismos marinhos para processos de biorremediação e produção de substâncias com atividades antivirais, anti-Leishmania e anti-inflamatória" (Processo-FAPESP 10/50190-2).

Os organismos marinhos invertebrados foram imersos em metanol (MeOH) por 24 horas e depois submetidos à filtração. O solvente foi evaporado em sistema de concentração de amostra a vácuo SpeedVac® (Thermo Savant) e o extrato formado foi seco e congelado sob a temperatura de -20ºC.

Os micro-organismos associados aos invertebrados marinhos, como bactérias e fungos, foram cultivados nas suas respectivas condições ideais de crescimento, e após 24h foram trituradas em liquidificador com acetato de etila (AcOEt). Esses produtos foram filtrados e submetidos a uma partição líquido-líquido, onde as frações orgânicas foram coletadas, secas e congeladas a -20ºC.

As diferentes origens dos extratos estudados foram diferenciadas por prefixos na identificação das amostras estudadas, como apresentado na figura 6.

Figura 6: Padrão de identificação dos extratos e sua procedência

Prefixo de Identificação	Origem
B	Bactérias associadas a macro-organismos marinhos coletados em São Sebastião-SP no ano de 2007.
F	Fungos associados a macro-organismos marinhos coletados em São Sebastião-SP no ano de 2007.
BA04ES	Esponjas coletadas na Baía de todos os Santos-BA no ano de 2004

O processo de identificação dos micro-organismos e invertebrados marinhos que deram origem aos extratos em estudo é demorado devido à complexidade do cultivo desses organismos *in vitro*, e ainda está em andamento sob comando da equipe do IQSC-USP.

Antes da utilização na triagem antiviral, os extratos foram diluídos cem vezes em dimetil sulfóxido de sódio (DMSO) com a finalidade de eliminar contaminantes dos extratos, e posteriormente em meio essencial mínimo sem soro fetal bovino para que o DMSO não seja tóxico para as células, atingindo ao final a concentração de 125 µg/mL da amostra (Skehan et al., 1990).

Para confirmar a não citotoxicidade das amostras, todo o experimento foi acompanhado de controle de extrato, somente a célula em contato com a substância e/ou extrato em estudo.

3.4. Padronização da concentração do extrato

Os extratos foram inicialmente avaliados quanto a sua toxicidade à célula por ensaio colorimétrico utilizando o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo) com o intuito de encontrar uma concentração que não causa toxicidade para as células e garantir que a substância aja somente contra o vírus, diminuindo o falso positivo. Assim, as células de CER em microplacas de noventa e seis poços foram expostas a concentrações decrescentes na base dois dos extratos e incubadas por 72h a 37ºC e 5% CO_2 para realizar a leitura.

O fundamento do ensaio consiste na metabolização do MTT, inicialmente de cor amarela, pela enzima mitocondrial LDH de células viáveis, produzindo o formazan, que é um cristal de cor violeta. Ou seja, quanto menor a intensidade da cor violeta, menor é a absorbância, maior é a atividade viral e, consequentemente, há menos células viáveis. Os resultados foram analisados em leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm (Mosmann, 1983; Wang et al., 2010).

Considerando um importante fator limitante do experimento, que foi a pequena quantidade de cada extrato recebido, e observando que várias amostras apresentaram concentração não citotóxica relativamente constante, optou-se pela padronização da concentração do extrato em 50 µg/mL para realizar o ensaio antiviral. Nos ensaios antivirais foram feitos um controle para avaliar a citotoxicidade do extrato, garantindo que durante o experimento o efeito observado seja exclusivamente do vírus sem ser influenciado por a célula não estar em condições ideais para o vírus se replicar.

3.5. Titulação viral

As titulações virais foram realizadas de acordo com metodologias usuais do Laboratório de Virologia Animal (Martini, 2010). Em microplaca de noventa e seis poços já com 100µL de CER a uma concentração de 1,5 a 3,0 x 10^4 células/poço, foram adicionados 50µL de diluições seriadas na base dez dos vírus ($1x10^{-1}$ a $1x10^{-6}$) em cada compartimento. As placas foram incubadas a 37ºC em câmara umidificada com 5% de CO_2. As leituras foram feitas 24, 48 e 72 horas após a inoculação em busca do efeito citopático característico. Os títulos foram calculados com base no método de Spearmann & Karber (Lorenz & Bögel, 1973).

3.6. Triagem da atividade antiviral

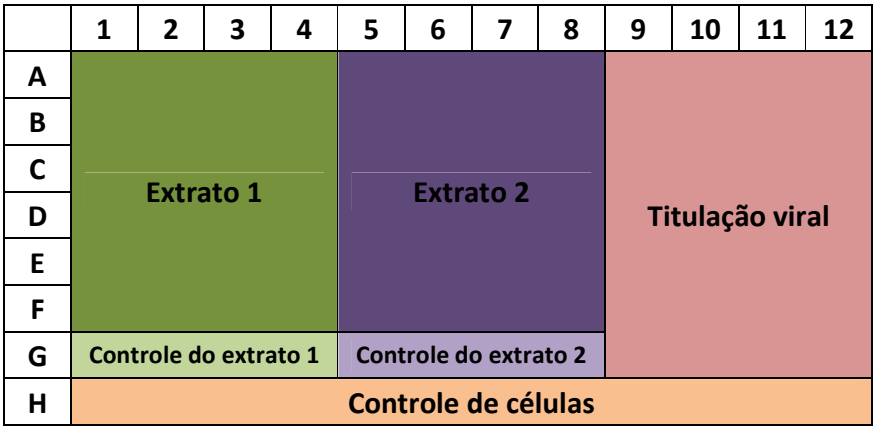
A análise *in vitro* da atividade antiviral baseia-se na habilidade do vírus se replicar nas células com os extratos (Cós, et al., 2006). A triagem da atividade antiviral foi realizada utilizando os extratos na concentração padronizada de 50 µg/mL frente a diluições seriadas do vírus.

As microplacas de noventa e seis orifícios com as células em suspensão foram incubadas por 24 horas a 37ºC em câmara umidificada e 5% de CO_2 para a formação de monocamada confluente celular.

Após 24 horas, o meio foi descartado e colocado por poço 100µL de extrato a 50 µg/mL em quadruplicata para cada amostra (4 colunas da microplaca). Em seguida, 50 µL de suspensão viral em diluições logarítmicas na base dez foram adicionados em cada compartimento. A última linha da microplaca foi utilizada como controle das células,

tendo somente meio de cultura e a CER. A penúltima linha serviu de controle dos extratos, contendo MEM, célula e o extrato. Para controle do vírus, quatro colunas foram utilizadas como titulação viral de cada experimento, conforme a Figura 7.

Figura 7: Desenho da microplaca para realização da triagem de antivirais.



Incubando as microplacas nas condições ideais, foram feitas leituras diárias em microscópio de luz para a observação do efeito citopático (EPC), até 72 horas após a realização do ensaio. O título viral foi calculado pelo método de Reed e Muench (1938). A avaliação da atividade antiviral foi calculada pela diferença entre o título do tratado, ou seja, células infectadas e tratadas com extrato (T), pelo título do controle, apenas células infectadas. O resultado foi expresso em porcentagem de inibição (PI% = [1-(antilogT/antilogC)]X100) e foram considerados positivo ou ativo aquele extrato capaz de inibir a replicação viral, ou seja, porcentagem de inibição (PI) viral igual ou superior a 98%. Amostras com porcentagem de inibição viral de 90 a 98% foram consideradas como extratos com alto potencial de atividade antiviral.

Para a triagem de atividade antiviral contra o aMPV, cento e vinte e cinco extratos foram testados. Destas, sessenta e duas (49,6%) eram oriundas de bactérias, vinte e nove (23,2%) de fungos e trinta e quatro (27,2%) de esponjas.

Inicialmente, cento e quarenta e sete extratos foram testados frente ao vírus da doença de Newcastle (NDV). Dessas amostras, vinte e oito (19%) eram oriundas de bactérias, cinquenta e um (34,7%) de fungos e sessenta e oito (46,3%) de esponjas.

Os extratos testados nessa etapa contra o NDV foram todos diferentes dos cento e vinte e cinco testados frente ao metapneumovírus aviário (aMPV).

Porém, devido a uma queda no título da amostra viral utilizada (NDV-1547) foi necessário repetir a triagem contra NDV. Assim, outra amostra vacinal, a NDV-945, de mesma origem da utilizada anteriormente, foi titulada e refeita a triagem de extratos com atividade antiviral contra NDV. Para esta triagem, foram utilizados somente os extratos que se mostraram ativos e com alto potencial antiviral contra o aMPV, levando em consideração a baixa disponibilidade de extratos e as similaridades dos vírus da família Paramyxoviridae.

3.7. Avaliação do mecanismo de ação antiviral

Uma vez encontrados os extratos ativos, três diferentes protocolos foram utilizados para investigar em qual etapa da replicação viral a substância antiviral provavelmente atua. Quando a monocamada de células atingiu 85% de confluência em placas de noventa e seis orifícios, foram adicionados os extratos na concentração padronizada e cem doses infectantes da amostra viral de três formas: Pré-tratamento; Pós-tratamento, e

Teste de Inativação Viral (Martini, 2010)

No Pré-tratamento, verificou-se a capacidade do extrato de atuar nas fases de adsorção e/ou de penetração do vírus à célula, bloqueando os receptores celulares. As células foram tratadas com os extratos na concentração padronizada e incubadas por 1 hora. Após esse período, o vírus foi adicionado em diluições seriadas na base dez e as micropLacas incubadas em câmara úmida a 37ºC com 5% de CO_2 por até 72 horas.

No Pós-tratamento, diluições decimais do vírus foram incubadas junto às células por 1 hora para posterior acréscimo dos extratos na concentração padrão, e incubação por até 72horas. Com esse tratamento, visou-se averiguar a capacidade do extrato em interferir nas etapas intracelulares da replicação viral (transcrição reversa, replicação do DNA, tradução).

No Teste de Inativação Viral, cada diluição decimal do vírus foi mantida em contato com o extrato por 1 hora. Posteriormente, esse conjugado vírus acrescido de extrato foi adicionado às células para serem incubados por até 72 horas, a fim de detectar se o extrato possui ação direta sobre a partícula viral.

Todos os tratamentos incluíram controle de vírus, dado pela sua titulação em cada microplaca; controle de extrato para confirmar a ausência de toxicidade da substância às células; e controle de células para verificar a viabilidade das células ao longo do experimento.

A análise das placas foi realizada diariamente durante as 72 horas de incubação. O efeito citopático do vírus na presença do extrato foi avaliado visualmente ao microscópio óptico de luz invertida (Zeiss Axyovert 100®) em comparação ao título do vírus, calculado com base no método de Spearmann & Karber (Lorenz & Bögel, 1973).

3.8. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real de extrato puro

Com o fornecimento de um composto puro pela equipe do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC-USP), resolveu-se testar uma metodologia mais objetiva, com baixo risco de contaminação e altamente específico para avaliação dos possíveis mecanismos de ação antiviral, a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR) (Stock et al., 2006).

Trata-se de um composto chamado de pirocina A (DRMA06) extraído do fungo *Penicillium paxilli* associado à esponja da espécie *Mycale angulosa*.

Esse composto foi previamente testado quanto a sua atividade antiviral frente ao aMPV nos métodos utilizados neste trabalho e foram determinados a porcentagem de inibição e possível mecanismo de ação.

Para o teste da qPCR foi calculado a concentração máxima não tóxica (CMNT), ou seja, concentração que não causa toxicidade para as células já que a substância deve ser ativa somente contra o vírus, evitando um resultado falso positivo. A determinação da CMNT foi realizada através de um ensaio colorimétrico utilizando o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo), descrito anteriormente.

Num primeiro teste da qPCR, foram preparadas microplacas nos três tipos de tratamento para avaliação do mecanismo de ação (pré tramento, pós tramento e teste de inativação viral), como descrito anteriormente. O extrato foi utilizado na CMNT (2,5µg/mL) e a amostra viral de aMPV em diluições decimais sobre a CER. Após as 72horas de incubação, as microplacas foram congeladas a -80ºC por 24horas com o intuito de romper as células e liberar os vírus para o sobrenadante.

Todos esses sobrenadantes foram submetidos à extração do RNA segundo o protocolo do QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen ®). Iniciou-se então a transcrição reversa dessas amostras com o kit Superscript III First Strand Synthesis (Invitrogen ®) em Termociclador Mastercicler Gradient (Eppendorf®). A qPCR foi realizada utilizando o Quantitec Probe PCR kit (Qiagen ®) no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) pelo método TaqMan®

Foram utilizados clone de aMPV também do subtipo A para a curva padrão (controle positivo da qPCR); amostras somente com reagentes e meio essencial mínimo (MEM) para controle negativo da qPCR,; amostras de células para controle negativo do ensaio antiviral, e amostras com vírus e células como controle positivo do ensaio antiviral. As sequências dos primers e da probe desse protocolo de qPCR estão descritas na figura 9 abaixo.

Figura 9: Gene alvo; identificação, sequência e posição dos primers e probe, e tipo de fluoróforo para a qPCR de aMPV subtipo A.

Gene	Primer / Probe	Seqüência (5'→3')	Posição
G aMPV/A (Guionie et al., 2007)	Primer A fwd	5′-GGACATCGGGAGGAGGTACA-3′	66–85
	Probe A	5′-*FAM*-TGCACAGTCACTATTGCACTCACTGTTAGCG-*TAMRA*-3′	121–151
	Primer A rev	5′-CACTCCTCTAACACTGACTGTTCAACT-3′	156–182

Um segundo teste da qPCR foi realizado mantendo fixa a concentração de vírus em cem TCID50, ou seja, dose infectante do vírus capaz de danificar 50% da monocamada de células (Arns et al., 2003). Em microplacas de noventa e seis poços

com monocamada confluente de CER, foram adicionados simultaneamente o vírus a cem $TCID_{50}$ e os extratos em diluições seriadas na base dez (10^{-1} a 10^{-6}).

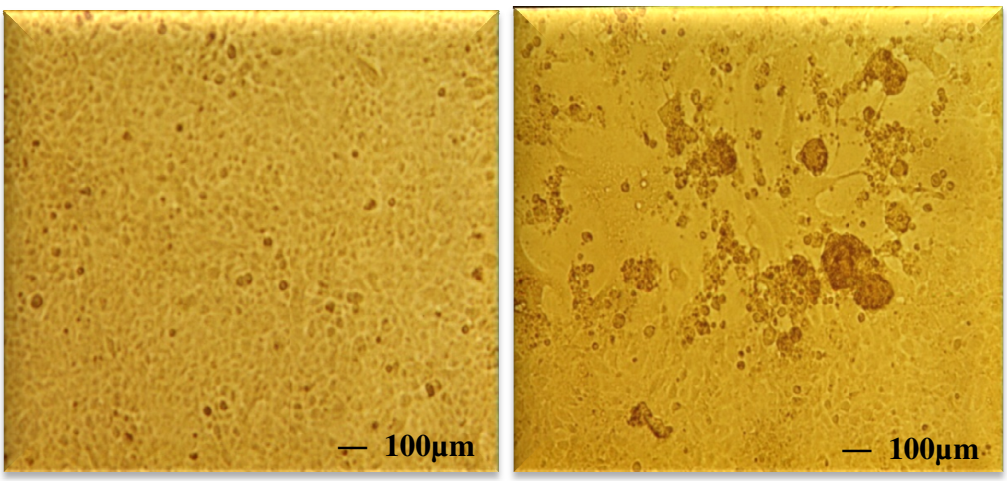
Após as 72horas de incubação, os mesmo procedimentos de preparo das amostras, de qPCR e controles das reações descritos anteriormente foram realizados.

4. RESULTADOS

4.1. Triagem da atividade antiviral

No total, cento e vinte e cinco extratos foram testados quanto a sua capacidade de inibição do aMPV. Incubando as microplacas nas condições ideais, foram feitas leituras diárias em microscópio de luz para a observação do efeito citopático (EPC), até 72 horas após a realização do ensaio. A figura 10-A mostra a aparência da monocamada confluente da linhagem celular CER sem a presença do vírus. Na figura 10-B é possível visualizar o efeito citopático característico do aMPV em monocamada confluente de CER, formação de sincícios.

Figura 10: A) Imagem de monocamada confluente de CER sem efeito citopático; B) Imagem do efeito citopático do aMPV em monocamada confluente de CER (escala 100µm).



O resultado da triagem de atividade antiviral foi avaliado com o cálculo da porcentagem de inibição, que é dada pela seguinte fórmula:

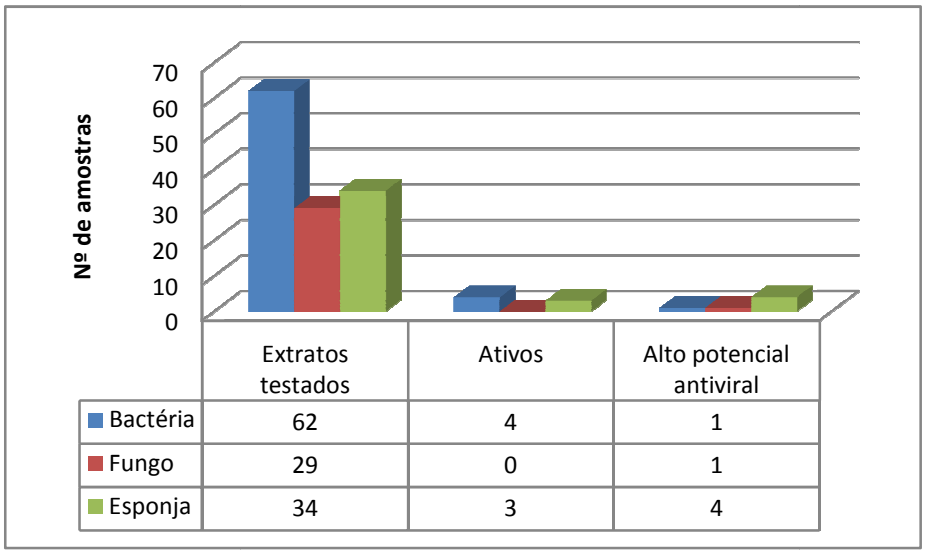
$$(PI) = (1 - T/C) \times 100$$

O valor de T se refere ao antilog dos títulos virais tratados (com extrato), e C é o antilog do título viral controle (sem extrato). Assim, PI igual ou acima de 98% foram consideradas como positivos ou ativos. Amostras com porcentagem de inibição viral de 90 a 98% foram classificadas como extratos com alto potencial de atividade antiviral.

Das cento e vinte e cinco amostras testadas, sessenta e duas (49,6%) são oriundas de bactérias, vinte e nove (23,2%) de fungos e trinta e quatro (27,2%) de esponjas. Um total de sete (5,6%) extratos se apresentaram ativos contra o aMPV, sendo três (42,8%) provenientes de esponjas e quatro (57,2%) de bactérias. Esses extratos foram estudados posteriormente quanto a seus possíveis mecanismos de ação.

Foram seis (4,8%) os extratos com elevado potencial antiviral para aMPV no total. Desses, quatro (66,6%) são originados de esponjas, um (16,7%) de bactéria e um (16,7%) de fungo. Esses resultados estão representados na figura 11.

<u>Figura 11</u>: Representação da quantidade de extratos testados e sua atividade contra o aMPV (ativo ou alto potencial antiviral) de acordo com a origem das amostras (bactéria, fungo ou esponja).



	Extratos testados	Ativos	Alto potencial antiviral
Bactéria	62	4	1
Fungo	29	0	1
Esponja	34	3	4

É passível de nota a elevada quantidade de extratos provenientes de esponjas que apresentaram atividade antiviral, levando em conta o total de extratos de esponjas testados. De trintae quatro amostras produzidas a partir de esponjas marinhas, sete (20,6%) apresentaram PI igual ou superior a 90%.

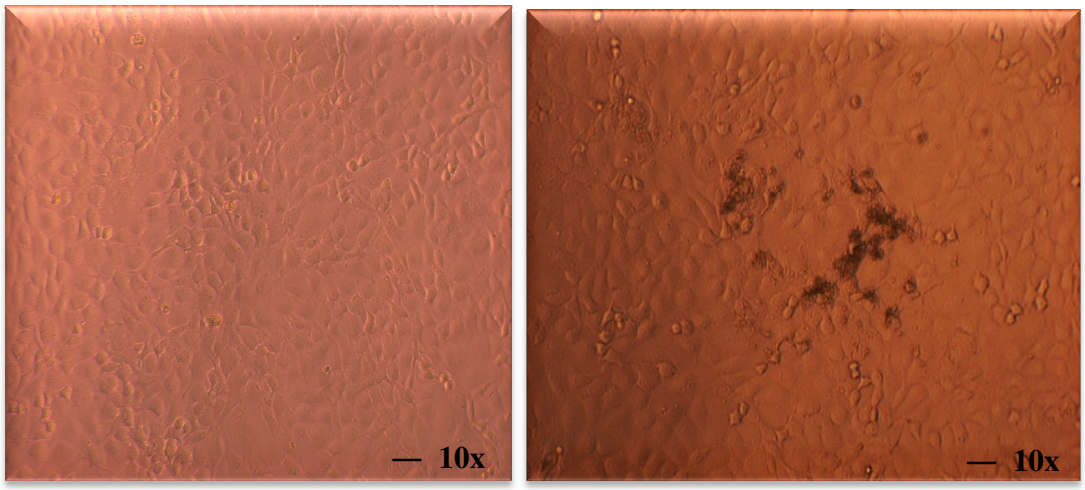
Inicialmente, cento e quarenta e sete extratos foram testados frente ao vírus da doença de Newcastle (NDV) para a triagem da atividade antiviral. Desses extratos, vinte e oito (19%) eram oriundos de bactérias, cinquenta e um (34,7%) de fungos e sessenta e oito (46,3%) de esponjas.

A seleção das cento e quarenta e sete amostras foi realizada de acordo com o maior volume de cada extrato, após notar que sua pequena quantidade limitava a realização dos experimentos necessários. Também se optou testar maior quantidade de extratos produzidos a partir de esponjas ao detectar grande proporção decompostos com PI superior a 90% dessa fonte na triagem anterior de antivirais frente ao aMPV.

Os extratos testados nessa etapa contra o NDV foram todos diferentes dos cento e vinte e cinco testados frente ao metapneumovírus aviário (aMPV).

O NDV empregado no experimento foi a NDV-1547, amostra vacinal lentogênica (La Sota) adaptada para a linhagem celular CER fornecida pela doutora Maria Ângela Orsi do LANAGRO/Campinas-SP (Laboratório Nacional Agropecuário). Pode ser visualizado o efeito citopático do NDV em monocamada confluente de CER na figura 12-B com formação de sincícios, em comparação à CER não inoculada com vírus da figura 12-A.

<u>Figura 12</u>: <u>A</u>) Imagem de monocamada confluente de CER sem efeito citopático; <u>B</u>) Imagem do efeito citopático do NDV em monocamada confluente de CER (escala 10x).



Porém, os resultados desse experimento de triagem foram inconclusivos pela não detecção de efeito citopático adequado no controle do vírus, titulação viral que sempre acompanha cada triagem de antivirais. Provavelmente devido à complexidade de adaptação de amostra vacinal de NDV na linhagem celular CER (Chicken Embryo Related), ocorreu uma queda no título da amostra utilizada no experimento.

Assim, outra amostra vacinal, a NDV-945, de mesma origem da utilizada anteriormente, foi titulada e refeita a triagem de extratos com atividade antiviral contra NDV. Para esta triagem, foram utilizados somente os extratos que se mostraram ativos (sete extratos) e com alto potencial antiviral (seis extratos) contra o aMPV, listadas na figura 13, levando em consideração a baixa disponibilidade de extratos e as similaridades dos vírus da família Paramyxoviridae.

<u>Figura 13</u>: Identificação, origem, massa (mg), porcentagem de inibição (PI) e classificação dos extratos que apresentaram atividade antiviral contra o aMPV e que foram testados na triagem contra NDV.

Identificação dos extratos	Origem	Massa (mg)	PI contra aMPV (%)	Classificação da atividade
BA04ES 39	Esponja	3,8	99	Ativo
BA04ES 45	Esponja	3,9	99	Ativo
BA04ES 59	Esponja	3,4	99	Ativo
B220 E1	Bactéria	5	98	Ativo
B389 E2	Bactéria	4,6	98	Ativo
B404 E1	Bactéria	4,4	98	Ativo
B420 E2	Bactéria	4,9	98	Ativo
BA04ES 32	Esponja	3,3	90	Alto potencial antiviral
BA04ES 48	Esponja	3,2	90	Alto potencial antiviral
BA04ES 67	Esponja	3,3	90	Alto potencial antiviral
BA04ES 71	Esponja	3,5	90	Alto potencial antiviral
B398 E1	Bactéria	3,4	90	Alto potencial antiviral
F162 E2	Fungo	4,2	94	Alto potencial antiviral

Dos treze extratos testados, quatro (30,8%) são de origem bacteriana, um (7,7%) fúngica e oito (61,5%) de esponjas. Nenhum dos extratos testados frente ao NDV apresentaram atividade antiviral, como ocorreu com o aMPV. Apesar dos dois vírus compartilharem de similaridades da família Paramyxoviridae a qual pertencem, os agentes infecciosos não responderam da mesma forma aos extratos.

4.2. Avaliação do Mecanismo de Ação

Dentre os sete extratos ativos contra aMPV, seis foram avaliados quanto ao seu possível mecanismo de ação. Uma amostra de esponja não possuía quantidade o suficiente para realização deste teste.

Nesta avaliação dos mecanismos de ação antiviral frente ao aMPV, foram averiguados que quatro (66,7%) extratos parecem agir nas etapas intracelulares de replicação do vírus (Pós tratamento) e dois (33,3%) extrato com ação nas fases de adsorção e/ou penetração do vírus na célula (Pré tratamento), conforme apresentado na figura 14.

Figura 14: Identificação, organismo marinho de origem, porcentagem de inibição (PI%) e possível mecanismo de ação dos extratos com ativos contra aMPV.

IDENTIFICAÇÃO	ORIGEM	PI%	MECANISMO DE AÇÃO
BA04ES 39	Esponjas coletadas na Baía de Todos os Santos (BA) no ano de 2004	99	Etapas intracelulares da replicação viral.
BA04ES45		99	Etapas intracelulares da replicação viral.
B220 E1	Bactérias	98	Fases de adsorção e/ou penetração do vírus na célula.
B404 E1	Bactérias	98	Etapas intracelulares da replicação viral.
B420 E2	Bactérias	98	Etapas intracelulares da replicação viral.
B389 E2	Bactérias	98	Fases de adsorção e/ou penetração do vírus na célula.

Devido a ausência de atividade antiviral dos extratos testados frente ao NDV, essa etapa do experimento não foi realizada para este vírus.

4.3. PCR em tempo real para extrato puro

No ensaio antiviral do composto puro pirocina A (DRMA06) prévio aos testes da metodologia de qPCR, observou-se uma atividade antiviral de 90% de porcentagem de inibição do aMPV e aparente ação nas etapas intracelulares de replicação do vírus.

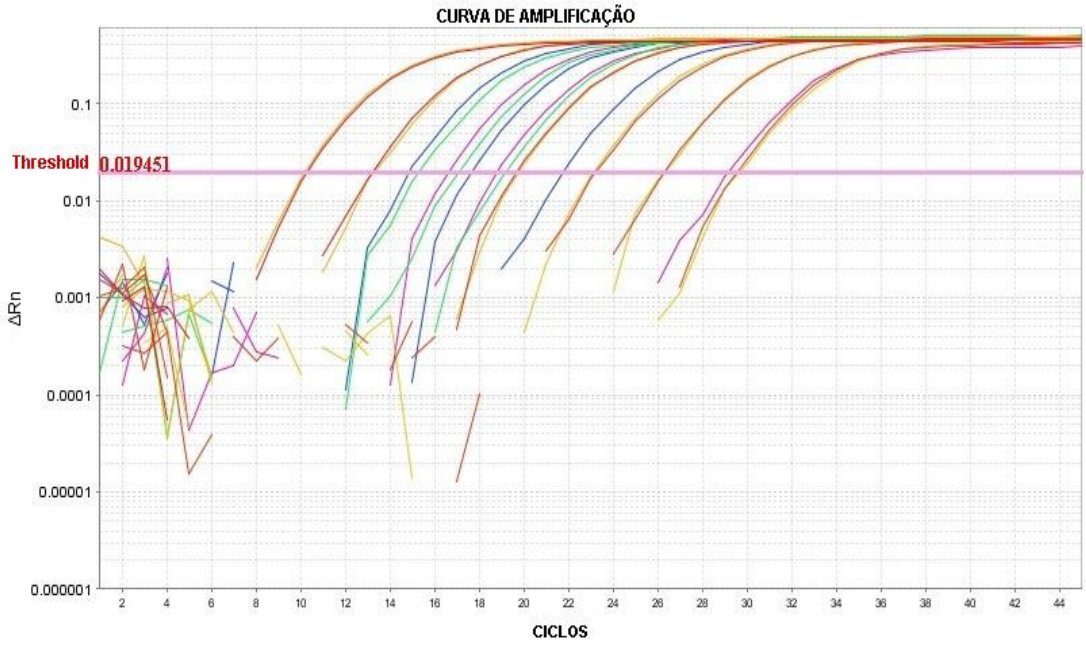
O primeiro experimento para qPCR, que foram testados em três tratamentos com concentração fixa do composto e diluições decimais do vírus, foi bem sucedida. O Slope da reação foi de -3,284; e a Eficiência foi de 101,612%. De forma geral, detectou-se que o extrato não interferiu significativamente na quantidade de RNA viral produzido durante o experimento. Somente uma amostra do pós-tratamento se destacou com uma quantidade menor de RNA, dado pelo Ct (Cycle threshold) muito maior em relação às outras amostras, mas acima do limiar Threshold e ainda dentro da curva padrão formada pelas diluições do controle positivo da qPCR, clone de aMPV-A.

O valor de Ct consiste no número de ciclos necessário para que a amplificação do material genético expressado por sinal de fluorescência ultrapasse o limiar mínimo de emissão de luz dado pelo threshold. Ou seja, o Ct é inversamente proporcional à quantidade de ácido nucleico alvo (Dorak, 2007).

Esses resultados podem ser melhores observados na figura 15 onde em amarelo e vermelho estão representadas as linhas da curva padrão (controle positivo da qPCR), em azul as amostras de pré tratamento, em verde o teste de inativação viral, e em rosa o

pós tratamento. O gráfico apresenta o aumento de fluorescência (ΔRn) no decorrer dos ciclos de amplificação da qPCR.

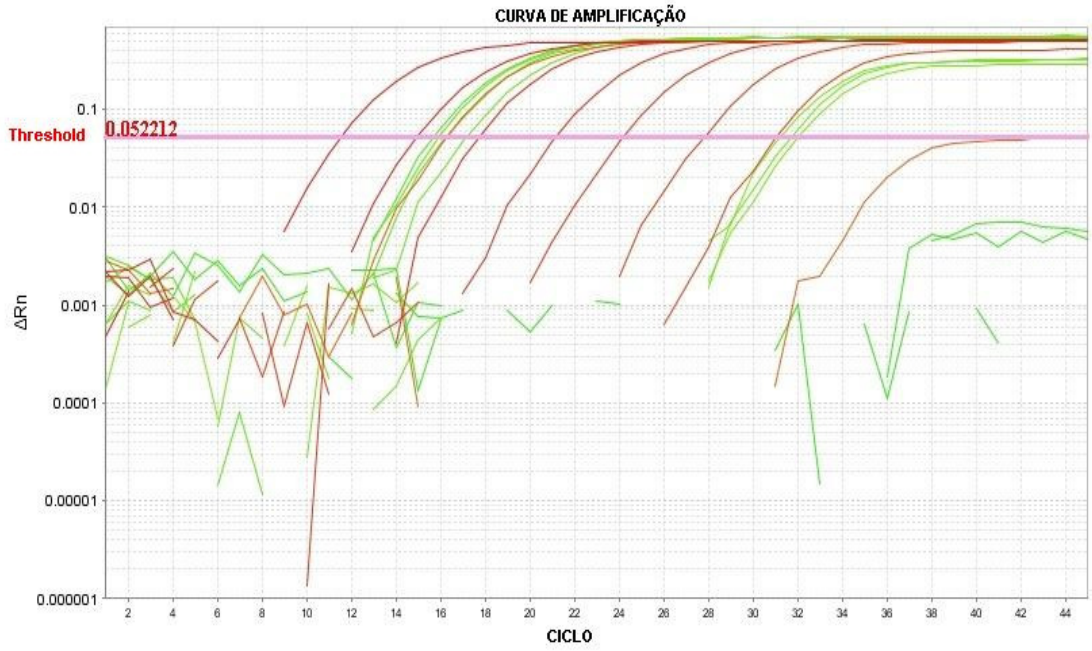
<u>Figura 15</u>: Curva de amplificação da qPCR do composto DRMA06 em CER sob três tipos de tratamento com diluições decimais do aMPV.



■ e ■: curva padrão ■: pré tratamento ■: teste de inativação viral ■:pós tratamento

No segundo experimento de qPCR, as células foram tratadas simultaneamente com o vírus e o composto, mantendo fixa a concentração do vírus e variando o composto em seis diluições na base dez. Esta qPCR também teve uma alta eficiência com valor de 103,626% e Slope de -3,238. Foi possível detectar que três amostras tiveram menor quantidade de material genético amplificado em relação as demais, ficando praticamente fora da curva padrão com alto valor de Ct, como exposto na figura 16.

Figua 16: Curva de amplificação da qPCR do aMPV a cem TCID50 com diluições decimais do composto DRMA06 simultaneamente adicionados à CER.



■: curva padrão ■: tratamento simultâneo com concentração fixa do vírus

5. DISCUSSÃO

Todos os membros da família Paramyxoviridae são envelopados e pleomórficos; possuem proteínas de fusão em seus envoltórios; são partículas lábeis, embora altamente patogênicas; RNA de fita simples não segmentado compõe seus genomas; são antigenicamente estáveis; e iniciam infecção através das vias respiratórias dos hospedeiros. Atualmente, essa família é dividida em duas subfamílias, a Pneumovirinae e a Paramyxovirinae (Brooks et al., 2010).

Um fator de distinção morfológica da subfamília Pneumovirinae, a qual o aMPV pertence, é o nucleocapsídeo estreito. Além disso, os pneumovírus diferem dos vírus da subfamília Paramyxovirinae quanto ao número de proteínas codificadas e de proteínas de adesão. Já os componentes da subfamília Paramyxovirinae, como o NDV, se assemelham morfologicamente pelo tamanho e molde do nucelocapsídeo, que tem simetria helicoidal de sentido anti horário. Uma característica biológica dessa subfamília é a capacidade de reação cruzada antigênica entre os membros de cada gênero (Fields et al., 1996).

As propriedades em comum dos membros dentro das respectivas subfamílias, como a organização genômica, sequências das proteínas e suas atividades biológicas, permitiriam a utilização desses dois vírus de escolha como modelo de estudo para importantes agentes infecciosos das subfamílias Pneumovirinae e Paramyxovirinae. Assim, o aMPV pode ser modelo de estudo de agentes como o Metapneumovírus humano, vírus sincicial respiratório humano e bovino; e o NDV para o vírus da caxumba e Parainfluenza vírus humano (Murray et al., 2011).

Neste trabalho, foi possível demonstrar que a capacidade antiviral dos extratos vai além dessas similaridades da família dos vírus. Provavelmente pelas distinções entre as subfamílias, os treze extratos que apresentaram PI acima de 90% contra o aMPV não tiveram a mesma ação sobre o NDV.

A principal abordagem da descoberta de novos agentes antivirais envolve a pesquisa de compostos quanto à sua capacidade em interferir na replicação exclusivamente do vírus em cultivo celular. Tais ensaios *in vitro* devem incluir controles de toxicidade celular para evitar a escolha de compostos que inibem a replicação do vírus apenas indiretamente por causa dos efeitos tóxicos às células hospedeiras (Fields et al., 1996).

Na infecção viral, os processos de adesão e penetração requerem a interação de estruturas víricas específicas com receptores da membrana plasmática da célula hospedeira (Fields et al., 1996). Esses processos podem ser alvos de agentes antivirais, como demonstrado neste trabalho pela atividade de dois (B220 E1 e B389 E2) dos sete extratos ativos contra o aMPV. Por esse comportamento, esses extratos podem ser promissores para a busca de antivirais com ação preventiva à infecção.

Os antivirais podem interferir em etapas intracelulares da replicação viral, como ação sobre polimerases que controlam a síntese de DNA ou RNA viral e quinases que estão envolvidas na fosforilação de nucleosídeos; intervenção da regulação da transcrição do vírus, do processamento pós traducional de proteínas, ou a montagem de proteínas virais (Brooks et al., 2009). Dentre os sete extratos que foram ativos frente ao aMPV, 2 compostos extraídos de esponjas (BA04ES 39 e 45) e 2 de bactérias (B404 E1 e B420 E2) agiram nas etapas intracelulares de replicação. Esse tipo de mecanismo de

ação é promissor para a descoberta de drogas antivirais úteis às fases inicias de infecção e manifestação clínica, minimizando a área lesionada (Brooks et al., 2009).

Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para minimizar o alto custo e a lentidão do processo de pesquisa de antivirais (Saxena, 2009). Uma dessas abordagens é a utilização da reação da polimerase em cadeia (PCR) em tempo real. PCR em tempo real consiste na coleta contínua de sinal fluorescente a partir de uma ou mais reações da polimerase em cadeia ao longo de um intervalo de ciclos. A análise quantitativa de uma PCR em tempo real (qPCR) se dá pela conversão dos sinais fluorescentes a partir de cada reação em valor numérico para cada amostra (Dorak, 2006).

No presente trabalho, a qPCR foi testada como metodologia de avaliação de mecanismo de ação antiviral mais objetiva e específica, além do baixo risco de contaminação. Para tanto, optou-se pela utilização de um composto puro, a pirocina A (DRMA06), extraído de um fungo de esponja, e fornecido pela equipe do IQSC-USP, frente ao aMPV de subtipo A. O primeiro experimento forneceu indícios da eficácia da técnica, detectando uma amostra com queda na quantidade de RNA viral. A amostra destaque fazia parte do teste de pós-tratamento, ou seja, a que verifica se o composto age em etapas intracelulares da replicação viral. Esse dado poderia confirmar o resultado do prévio ensaio antiviral da pirocina A, que indicou ação no pós-tratamento. Porém, deve-se considerar que nesse experimento, o vírus foi submetido a diluições seriadas na base 10 e a concentração do composto mantido na CMNT. A amostra que apresentou menor quantidade de RNA era a de menor diluição do vírus, embora esta tenha se destacado das mesmas diluições de outros tratamentos.

Ao notar que não havia sentido utilizar diferentes concentrações do vírus com uma técnica que detecta quantidade de material genético viral, o segundo experimento

foi realizado. Desta vez a concentração do vírus foi mantida a cem $TCID_{50}$ e o composto submetido a seis diluições decimais, e adicionadas simultaneamente à célula. Detectou-se, então, queda na quantidade de RNA viral nas três maiores concentrações da pirocina A, confirmando a atividade antiviral do composto frente ao aMPV e a utilidade da técnica também para triagem de antivirais.

Utilizando as mesmas concentrações de vírus e da pirocina A do experimento anterior, um terceiro teste foi realizado nos três tratamentos para avaliação do mecanismo de ação antiviral. Essa qPCR foi inconclusiva por prováveis problemas no título do vírus.

A detecção de extratos com atividade antiviral nas situações testadas neste trabalho corrobora o valor da biodiversidade marinha como fonte de produtos promissores na terapêutica de enfermidades virais. Portanto, a necessidade de estudos sobre esses vírus e do desenvolvimento de novos insumos a serem utilizados nos seus controles é de grande importância ponderado a crescente projeção da indústria avícola brasileira no comércio mundial.

6. CONCLUSÕES

- Foi confirmada a importância dos organismos marinhos como rica fonte de produtos com atividade antiviral.
- A atividade antiviral de cento e vinte e cinco extratos brutos de organismos marinhos foi determinada frente ao aMPV, sendo sete ativos (5%) e seis com alto potencial antiviral (4%).
    - 57% dos extratos ativos eram oriundos de esponjas e 43% de bactérias.
    - 68% dos extratos com alto potencial antiviral eram de esponjas, 16% de bactérias e 16% de fungos.
    - Destaque às esponjas como fonte promissora de produtos com atividade antiviral já que 23% de seus derivados testados apresentaram porcentagem de inibição acima de 90% frente ao aMPV.
    - 67% dos extratos ativos tiveram ação antiviral nas etapas intracelulares de replicação do vírus.
    - Os outros 33% dos extratos ativos agiram na fase de adsorção e/ou penetração do vírus na célula hospedeira.
- Embora pertençam à mesma família Paramyxoviridae, o aMPV e o NDV não reagiram da mesma forma à atividade antiviral dos extratos testados. Provavelmente, devido ao fato de pertencerem a subfamílias distintas.
- Corroborou-se a qPCR como metodologia promissora tanto para triagem como para avaliação dos possíveis mecanismos de ação antiviral.

7. REFERÊNCIAS BILBIOGRÁFICAS

ABOU-KARAN, M.; SHIER, W.T.. 1990. A Simplified Plaque Reduction Assay For Antiviral Agents From Plants. Demonstration of Frequent Occurrence of Antiviral Activity In Higher Plants. Journal of Natural Products, 53 (2):340-44.

AMARAL, A.C.Z.;. 2006. Manual de identificação de invertebrados marinhos da região sudeste e sul do brasil. Edusp.

ARNS, C.W.; CAMPALANS, J.; COSTA, S.C.B.; DOMINGUES, H.G.; D'ARCE, R.C.F.; ALMEIDA, R.S.. 2003. Characterization of bovine respiratory syncytial virus isolated in Brazil. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 36: 213 – 218.

ARNS, C.W.; HAFEZ, H.M.. 1995. Isolation and Identification of Avian Pneumovirus From Broiler Breeder Flocks In Brazil. In: Proceedings of The 44st Western Poultry Diseases Conference, Sacramento, California, USA, P. 124-125.

ARNS, C.W.; HAFEZ, H.M.. 1992. Swollen Head Syndrome In Poultry Flocks In Brazil. In: Proceedings Of The 41st Western Poultry Diseases Conference, Sacramento, California, Usa, P. 81-84.

BERGMAN W, FEENEY RJ. 1951. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. J Org Chem; 16:981-987.

BERLINCK, R. G. S., HAJDU,E., ROCHA, R.M., OLIVEIRA, J. H. H. L., HERNÁNDEZ, I. L. C., SELEGHIM, M. H. R., GRANATO, A. C., AND MINARINI, P.R. R.. 2004. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. J. Nat. Prod., 67 (3), pp 510–522.

BRANDÃO, G. C., KROON E. G., DOS SANTOS, J. R., STEHMANN, J. R., LOMBARDI, J. A., OLIVEIRA, A. B.. 2010. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): part 1.Lett Appl Microbiol 51(4): 469-476.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICUTURA E ABASTECIMENTO (MAPA); empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (embrapa-meio ambiente). 2008. Organismos Bentônicos: biomonitoramento de qualidade de águas. Livro Bentônicos; 12-33.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICUTURA E ABASTECIMENTO (MAPA). 2009. Plano de contingência para Influenza aviária e doença de Newcastle. Versão 1.3..

BROOKS, G. F. et al. 2009. Jawetz, Melnick e Adelberg Microbiologia médica. 24. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill.

CASTRO, P.; HUBER, M.E.. 2012. Biologia Marinha.8ª Edição. Editora AMGH.

CATTOLI, G.; FUSARO, A.; MONNE, I.; MOLIA, S.; LE MENACH, A.; MAREGEYA, B.; NCHARE, A.; BANGANA, I.; GARBA MAINA, A.; N'GORAN KOFFI, J.-N.; THIAM, H.; BEZEID, O. E. M. A.; SALVIATO, A.; NISI, R.; TERREGINO, C.; CAPUA, I.. 2009. Emergence of new genetic lineage of Newcastle disease vírus West and Central África – Implications for diagnosis and control. Veterinary Microbiology (In Press).

CHIANG, L.C.; CHIANG, W.; CHANG, M.Y.; NG L.T.; LIN, C.C. 2002. Antiviral Activity of Plantago Major Extracts And Related Compounds In Vitro. Antiviral Res. Jul: 55(1): 53-62.

COEN, D.M.; RICHMAN, D.D.. 2007. Antiviral agents. In: Knipe D.M. & Howley P.M. (Eds), Fields Virology. 5th ed. Williams and Wilkins, Philadelphia. p.447-485.

COOK, J.K.. 2000. Avian pnemovirus infections of turkeys and chickesn. The Veterinary Journal, 160: 118 – 125.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. 2006. Antiinfective Potential of Natural Products: How To Develop A Stronger In Vitro 'Proof-Of-Concept'. Journal of Ethno-Pharmacology, 106: 290–302.

CRAGG GE, NEWMAN DJ AND SANDER KM. 1997. Natural products in drug discovery and development. J.Nat.Prod,. 60, 52-60.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., 2004. A tale of two tumor targets: topoisomeraseI and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. Journal of Natural Products 67, 232–244.

CUTIGNANO, A.; BIFULCO, G.; BRUNO, I.; CASAPULLO, A.; GOMEZ-PALOMA, L.; AND RICCIO, R.. 2000. Dragmacidin F: a new antiviral bromoindole alkaloid from the Mediterranean sponge Halicortex sp. Tetrahedron 56: 3743-3748.

D'ARCE, R.C.F. ET AL. 2005. Subtyping of New Brazilian Avian Metapneumovirus Isolates From Chicken And Turkeys By Rt-Nested-Pcr. Avian Pathology, V. 34 (2): 133-136.

DANI, M. A.; E. L. DURIGON, et al.. 1999. Molecular Characterization of Brazilian Avian Pneumovirus Isolates: Comparison Between Immunochemiluminescent Southern Blot And Nested Pcr. Journal Of Virological Methods, 79(2):237-41.

DORAK, M.T..2007. Real-Time PCR. Taylor & Francis Group, 03-59.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.. 1996. Fields Virology. 5th edition, Volume One. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business; 1449-1483.

Guionie, O., Toquin, D., Zwingelstein, F., Allée, C., Sellal, E., Lemière, S. & Eterradossi, N.. 2010. A laboratory evaluation of a quantitative real-time RT-PCR for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumoviruses. J Virol Methods 139, 150–158.

IRELAND, C. M.; COPP, B.R.; FOSTER, M.P.; MCDONALD, L.A.; RADISKY, D.C.; SWERSEY, J.C.. 2000. Bioactive compounds from the sea. In: Martin, R.E.; Carter, E.P.; Davis, L.M.; eds. Marine and freshwater products handbook. Lancaster. PA: Technomic Publishing, 641 – 661.

JASSIM, S.A. e NAJI, M.A. 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. J Appl Microbiol. 95(3):412-27.

JIMENO, J.M.. 2002. A clinical armamentarium of marine derived anti-cancer compounds. Anticancer Drugs; 13 (suppl 1): S15 – 19.

LORENZ, R.J.; BOGEL, K. 1973. Methods of calculation, p. 321-335. In:Kaplan M.M. & Koprowsky H. (ed.) Laboratory Tecniques in Rabies. World Health Organization, Geneva.

MARTINI, M.C.. 2010. Avaliação in vitro da atividade antiviral de extratos de plantas frente ao metapneumovírus aviário (AMPV) e vírus respiratório sincicial bovino (BRSV). Dissertação de mestrado; Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia; 22-56.

MCKINLEY, E.T., HILT, D.A., JACKWOOD, M.W.. 2008. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. Vaccine; 26:1274-1284.

MINHARRO, S.; LINHARES, G.F.C.; ANDRADE, M.A.; ROCHA, P.T.; SANTANA, A.T.. 2001. Envolvimento de Escherichia coli, de Mycoplasma gallisepticum e de Mycoplasma synoviae em lesões de sacos aéreos em frangos abatidos no Estado de Goiás. Ciênc. Anim. Bras. 2:111-117.

MITCHELL, S.S; RHODES, D.; BUSHMAN, F.D.; AND FAULKNER, D.J.. 2000. Cyclodidemniserinol trisulfated serinolipid from the Palauan ascidian Didemnum guttatum that inhibits HIV-1 integrase. Org Lett 2:1605-1607.

MOSMANN, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay For Cellular Growth And Survival: Application To Proliferation And Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods 65: 55-63.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A.. 2011. Microbiologia médica. 6ª edição. Elsevier Editora.

Nauwynck, H. J., Duan, X., Favoreel, H. W., Van Oostveldt, P. & Pensaert, M. B.. 1999. Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. J Gen Virol 80, 297–305.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). 2004. World Organization of Animal Health. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial. 5th ed. Paris.

PERES, M.F.; CARRIJO, A.S.; HIGA, J.A.; OLIVEIRA, J.M.O.. 2006. Evidência sorológica de Pneumovírus aviário em lotes de frangos de corte em municípios de Mato Grosso do Sul. Pesq. Vet. Bras. vol.26 no.4 Rio de Janeiro.

ORSI, M.A.; DORETTO Jr, L.; CAMILLO, S.C.A; REISCHAK, D.; RIBEIRO, S.A.M.; RAMAZZOTI, A.; MENDONÇA, A.O.; SPILKI, F.R.; BUZINARO, M.G.; FERREIRA, H.L.; ARNS, C.W.. 2010. Prevalence of Newcastle disease virus in broiler chickens (Gallus gallus) in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology 41: 349 – 357.

REED, L.J.; MUENCH, H.. 1938. A simple method for estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg., 27: 493-497.

SARMA, A. S.; DAUM, T.; MIILLER, W.E.G.. 1993. Secondary metabolites from marine sponges. Ullstein-Mosby Verlag: Berlin, Germany.

SAXENA, S.K.; MISHRA, N.; SAXENA, R.. 2009. Advances in antiviral drug Discovery and development: part I Advancementes in antiviral drug discovery. Future Virology, 4(2): 101 – 107.

SCHAT, K.A.; BARANOWSKI, E.. 2007. Animal vaccination and the evolution of viral pathogens. Rev Sci Tech. Aug;26(2):327-38.

SILVA G.M.M. & RISTOW L.E. 2007. Detecção de anticorpos contra laringotraqueíte infecciosa das aves no Estado de Minas Gerais. In: XX Congresso Latinoamericano de Avicultura. (Porto Alegre, Brasil). pp.110-112.

SIMONI, I.C.. 2003. Tratamentos antivirais. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 65(1-2): 41-44.

SIMONI, I. C.; MANHA, A. P. S.; SCIESSERE, L.; HOE, V. M. H.; TAKINAMI, V. H.; FERNANDES, M. J. B.. 2007. Evaluation of the antiviral activity of Brazilian Cerrado plants against animal viroses. Virus Reviews and Research, 12(1-2): 25-31.

SKEHAN, P.; STOREG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESH, H.; KENNEY, S.; BOY, M.R.. 2009. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening Journal of the national cancer institute.Volume 82, Issue 13. Pp. 1107-1112.

SMEE, D.F., MORRISON, A.C., BARNARD, D.L., SIDWELL, R.W. 2002. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. Journal Virolology Methods. 106(1):71-9.

STOCK, R.; HARSTE, G.; MADISCH, I.; HEIM, A.. 2006. A rapid quantitative PCR-based assay for testing antiviral agents against human adenoviruses demonstrates type specific differences in ribavirin activity. Antiviral Res. 72: 34-41.

TORTORA, G.J. et al. 2005. Microbiologia.: Porto Alegre: Ed.Artmed, 8 ed., v. 28, p. 792-812.

VAN DE ZANDE, A.; NAUWYNCK, H.; DE JONGHE, S.; PENSAERT, M.. 1999. Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian penumovirus inturkeys. Avian Pathology.28: 239 – 244.

WANG, J.; HU, Y.; WANG, D.; ZHANG, F.; ZHAO, X.; ABULA, S.; FAN, Y.; GUO, L.. 2010. Lycium barbarum polysaccharide inhibits the infectivity of Newcastle disease virus to chicken embryo fibroblast. International Journal of Biological Macromolecules 46: 212-216.

WU, S.F.; LEE, C.J.; LIAO, C.L.; DWEK, R.A.; ZITZMANN,N.; LIN, Y.L.. 2002. Antiviral Effects of an Iminosugar Derivative on Flavivirus Infections. J. Virol. April 2002 vol. 76 no. 8 3596-3604.