

JULIANA CRISTINA SANTIAGO BASTOS

**“ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ORGANISMOS MARINHOS
FRENTE AO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, MODELO
PARA O VÍRUS DA HEPATITE C”**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

JULIANA CRISTINA SANTIAGO BASTOS

**“ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ORGANISMOS MARINHOS
FRENTE AO VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA, MODELO
PARA O VÍRUS DA HEPATITE C”**

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) <i>Juliana Cristina Santiago Bastos</i> e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>[Assinatura]</i>

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

B297a Bastos, Juliana Cristina Santiago, 1985-
Atividade antiviral de organismos marinhos frente ao
vírus da diarreia viral bovina: modelo para o vírus da
hepatite C / Juliana Cristina Santiago Bastos. –
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Vírus da hepatite C. 2. Agentes antivirais. 3.
Organismos marinhos. 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 against bovine viral diarrhea virus: a surrogate model for the hepatitis C virus

Palavras-chave em Inglês:

Hepatitis C virus

Antiviral agents

Marine organisms

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Clarice Weis Arns [Orientador]

Eduardo Furtado Flores

Fabiana Fantinatti-Garboggini

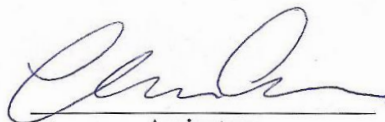
Data da defesa: 25-02-2013

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 25 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Clarice Weis Arns (orientadora)



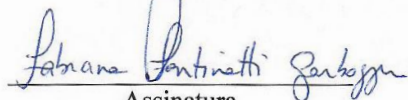
Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores



Assinatura

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini



Assinatura

Dra. Carmen Lucia Queiroga

Assinatura

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

Assinatura

ÍNDICE

Lista de abreviaturas e siglas.....	vi
Agradecimentos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	8
3. Justificativa.....	9
4. Hipótese.....	10
5. Material e Métodos.....	10
5.1. Cultivo celular.....	10
5.2. Multiplicação e estoque de vírus.....	11
5.3. Titulação viral.....	12
5.4. Preparo dos extratos.....	12
5.4.1. Preparo dos extratos a partir de invertebrados.....	13
5.4.2. Preparo dos extratos a partir de fungos.....	13
5.4.3. Preparo dos extratos a partir de bactérias.....	15
5.5. Ensaio antiviral.....	17
5.6. Ensaio colorimétrico de MTT.....	19
5.7. Determinação da concentração máxima não tóxica e cálculo de CC ₅₀	20
5.8. Ensaio preliminares de possíveis mecanismos de ação.....	21
5.9. Determinação de IC ₅₀ – Ensaio de placa.....	23
5.10. Determinação do Índice de Seletividade (IS).....	25
6. Resultados.....	26
6.1. Efeito citopático do vírus BVDV sobre as células MDBK.....	26
6.2. Ensaio antiviral.....	28
6.2.1. Origem dos extratos.....	28

6.2.2.	Ensaio de avaliação da atividade antiviral.....	29
6.2.3.	Concentração Máxima Não Tóxica.....	32
6.2.4.	CC ₅₀ , IC ₅₀ e IS.....	34
6.2.5.	Ensaio preliminares de mecanismo de ação.....	36
7.	Discussão.....	39
8.	Conclusão.....	50
9.	Referências bibliográficas.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BVDV (bovine viral diarrhoea vírus): vírus da diarreia viral bovina

C: controle

CBMAI: Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria

CC₅₀: concentração que inibe em 50% o crescimento celular

CMC: carboximetilcelulose

CMNT: Concentração máxima não tóxica

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas

DMSO: Dimetilsulfóxido

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

h: hora

HCV (hepatitis C vírus): vírus da hepatite C

IC₅₀: concentração que inibe em 50% a replicação viral

IIV: Índice de inibição viral

IS: Índice de seletividade

MDBK: Mardin-Darby bovine kidney

MEM (E): meio essencial mínimo Eagle

MeOH: metanol

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

MTT: (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

nm: nanômetros

ORF: “open reading frame” ou fase aberta de leitura

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PI: Porcentagem de inibição

RNA: ácido ribonucléico

Rpm: rotações por minuto

T: tratado

TCID₅₀: Doses infectantes para 50% dos cultivos celulares

μL: microlitros

AGRADECIMENTOS

A Deus, presente em todos os momentos da minha vida, cuidando de mim e dos meus planos, e me surpreendendo a cada dia.

Aos meus pais, por tudo que fizeram por mim. Vocês são a razão de todas as minhas conquistas.

Às minhas irmãs pelo apoio, e ao Anderson pela paciência, apoio e ajuda em todos os momentos da minha jornada.

À Profa. Dra. Clarice Arns por ter me acolhido em seu laboratório e ter me dado toda a estrutura e apoio necessários. Sou muito grata.

Ao Prof. Dr. Eduardo Flores pelo auxílio e por disponibilizar meios que garantiram a conclusão desse trabalho. Agradeço, também, a Maira e a Mariana Flores por me receberem tão bem durante essa importante etapa.

À Dra. Luciana Kohn pela co-orientação.

Aos colaboradores que fizeram parte do projeto temático.

Aos professores, funcionários e colegas da Unicamp, agradeço por tudo que aprendi.

Aos queridos amigos que me acompanharam e me ajudaram em todos os momentos. À Marina por compartilhar todos os momentos bons e ruins e por me ajudar sempre. Aos amigos Profa. Fernanda e Eduardo por compartilharem também de todos

os momentos, alegrias e decepções. E também, ao Matheus e à Sonia, por transformarem os problemas numa grande piada. Enfim, à grande equipe do LVA: Geneci, Leonardo, Luciana H., Márcia, Paula e os ex-alunos que mantêm presença constante no laboratório, obrigada pela ajuda. Jamais esquecerei o que cada um de vocês fez por mim!

RESUMO

O vírus da Hepatite C (família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*) é causador de infecções crônicas em humanos, que podem evoluir para quadros de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Até o momento, não há vacina disponível contra essa infecção e o tratamento disponível é caro, tem eficácia limitada e gera uma vasta gama de efeitos secundários, o que dificulta a continuidade do tratamento. Como esse vírus não replica eficientemente em cultura de células e em animais, o vírus da diarreia viral bovina é utilizado como modelo substituto para ensaios de avaliação de atividade antiviral e em ensaios de mecanismo de ação. A partir de invertebrados e micro-organismos marinhos, foram preparados extratos e frações, e algumas substâncias foram isoladas para a avaliação da sua possível atividade antiviral. Dos 422 testados, 5% foram considerados promissores e, destes, 20% mostraram-se ativos apresentando uma proteção de mais de 97% às células frente ao vírus. Os melhores resultados foram obtidos dos extratos produzidos a partir das amostras de esponjas *Hyrtios* sp. (BA07ES-56: PI=99%, IS=25), *Aaptos* sp. (BA07ES-59: PI=99%, IS=8,25) e de bactérias *Bacillus* sp. (555: PI=98%, IS>18; 584: PI=98%, IS=27) isoladas da esponja *Petromica citrina*. Os extratos e compostos promissores foram capazes de atuar em diversas etapas do ciclo replicativo viral (adsorção, penetração, etapas intracelulares do ciclo replicativo e também inativação da partícula viral), levando à sua interrupção quase completa nas condições analisadas. Desse modo, diversas substâncias presentes nesses organismos estudados são ativas e podem levar ao desenvolvimento de fármacos que garantam uma terapia alternativa para o tratamento da hepatite C.

ABSTRACT

The Hepatitis C virus (family Flaviviridae, genus Hepacivirus) causes chronic infections in humans, which can develop to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. This represents a major public health problem worldwide. To this moment, there is no vaccine available against this infection and the treatment available is expensive, has limited efficacy and generates a wide range of side effects, making it difficult to continue the treatment. All this reflects the need to seek new agents with antiviral action against this virus. As this virus does not replicate efficiently in cell culture and in animals, bovine viral diarrhea virus is used as a surrogate model for screening assays of antiviral activity, and mechanism of action assays. From marine invertebrates and micro-organisms isolated from them, extracts and fractions were prepared, and substances were isolated for assessment of their possible antiviral activity. Of the 422 tested, 5% were considered promising, and of these, 20% were active presenting a protection percentage of more than 97%. The best results were obtained from the extracts produced from the samples of sponge *Hyrtilos* sp. (BA07ES-56: IP=99%, SI=25), *Aaptos* sp. (BA07ES-59: IP=99%, SI=8,25) and bacteria *Bacillus* sp. (555: IP=98%, SI>18; 584: IP=98%, SI=27) isolated from the sponge *Petromica citrina*. The promising extracts and compounds acted in several stages of viral replicative cycle (adsorption, penetration, intracellular steps of the replicative cycle and also inactivation of the viral particle). Thus, various substances are active and may lead to the development of drugs which ensure an alternative therapy for the treatment of hepatitis C.

1. INTRODUÇÃO

Os vírus são capazes de provocar muitas doenças importantes em humanos e animais. Doenças infecciosas causadas por vírus emergentes e reemergentes representam um grande problema de saúde pública (Yasuhara-Bell *et al.*, 2010). Várias destas infecções não apresentam tratamento eficiente somente sintomático, além do desenvolvimento de resistência à quimioterapia atual (Cos *et al.*, 2006).

Os vírus pertencentes à família *Flaviviridae* são causadores de doenças clinicamente significativas, tanto em humanos quanto em animais (Sako *et al.*, 2008). São vírus envelopados que apresentam genoma composto por RNA de fita simples e polaridade positiva. A molécula de RNA apresenta duas regiões não traduzidas próximas às extremidades 5' e 3' e possuem uma única fase de leitura (ORF). A replicação do genoma e a produção da progênie viral ocorrem inteiramente no citoplasma da célula hospedeira, após penetração por endocitose. Através da fusão entre envelope e membrana endossomal, o capsídeo dissocia-se e o genoma é liberado. O RNA é traduzido em uma poliproteína que origina as proteínas estruturais e não estruturais. A síntese de uma molécula de RNA de sentido antígenômico permite a formação de cópias de moléculas de RNA de polaridade positiva que são encapsidadas como genoma da progênie viral (Ridpath & Flores, 2007).

Três gêneros fazem parte dessa família: *Flavivirus* (que compreende vírus da febre amarela, vírus da dengue e vírus do Nilo Ocidental), *Hepacivirus* (representado

pelo vírus da hepatite C) e *Pestivirus* (incluindo o vírus da diarreia viral bovina) (Sako *et al.*, 2008).

O vírus da diarreia viral bovina (“Bovine viral diarrhea vírus” - BVDV) é um vírus que está associado com a doença severa das mucosas em bovinos, principalmente. Dependendo do comportamento em cultura celular, os isolados são considerados como não citopáticos ou citopáticos (Leysen *et al.*, 2000). Os vírus não citopáticos são capazes de produzir infecções persistentes em fetos; os citopáticos são gerados a partir dos não citopáticos através de mutações, recombinações, deleções ou rearranjos genéticos. Fetos infectados por vírus não citopáticos nascem persistentemente infectados e, se forem superinfectados com vírus citopáticos, podem desenvolver a doença das mucosas, que é uma forma altamente fatal da infecção. O BVDV é, também, imunossupressor, podendo predispor os animais infectados a outras infecções (Ridpath & Flores, 2007). Atribui-se esse caráter persistente da infecção pelo vírus não citopático à habilidade do mesmo em interferir na indução da produção de interferon tipo 1 pelos macrófagos (Baigent *et al.*, 2004; Charleston *et al.*, 2001).

O BVDV possui distribuição mundial e a infecção tem ampla distribuição no território brasileiro com uma grande diversidade de manifestações clínicas, que levam a perdas significativas no rebanho bovino. O vírus pode infectar uma variedade de ruminantes domésticos e silvestres, e também suínos. Os bovinos, contudo, são considerados seus hospedeiros naturais. De acordo com as características genéticas e antigênicas, os isolados são divididos em BVDV-1 e BVDV-2, sendo que no Brasil há

um predomínio do genótipo 1, quadro que está tendendo ao equilíbrio nos últimos anos (Ridpath & Flores, 2007).

Como o vírus da hepatite C (“Hepatitis C vírus” - HCV) não replica eficientemente em culturas de células e animais, o BVDV pode ser um modelo substituto para ele (Zitzmann *et al.*, 1999; Baginski *et al.*, 2000; Buckwold^a *et al.*, 2003; Buckwold^b *et al.*, 2003; Yanagida *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de replicons de RNA subgenômico de HCV representou um grande avanço nas pesquisas relacionadas a esse vírus. Esses replicons são sistemas que mostraram utilidade na avaliação de agentes antivirais que afetam a tradução, a replicação do RNA e o processamento da poliproteína proteolítica. No entanto, esses replicons não produzem vírions infecciosos. Desse modo, eles não podem ser utilizados para a identificação e caracterização de agentes antivirais que atuem nas etapas iniciais do ciclo replicativo do vírus, como adsorção e penetração, nem são eficazes para a identificação de componentes que afetem as fases finais do ciclo, como maturação e liberação de vírions. Esses fatores somados aos altos custos relacionados à utilização dos replicons inviabilizam seu uso nas pesquisas de agentes antivirais (Buckwold^a *et al.*, 2003). Desse modo, o uso de modelos ainda é fundamental para as pesquisas de agentes antivirais para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da hepatite C.

O BVDV possui uma organização estrutural semelhante ao HCV, é de fácil cultivo *in vitro* e os clones moleculares estão disponíveis para estudos genéticos (Buckwold^a *et*

al., 2003). Eles partilham um elevado grau de homologia em termos de organização genômica, estratégias de expressão de proteínas e replicação (Grassmann *et al.*, 2005).

Como o HCV, o BVDV utiliza o receptor LDL para penetrar nas células, utiliza um IRES funcionalmente semelhante para a tradução, utiliza um cofator NS4A com sua protease homóloga NS3, tem uma helicase NS3/ATPase similar, uma RNA polimerase dependente de RNA NS5B mecanisticamente similar e mecanismo de maturação viral, bem como montagem e liberação de partículas virais aparentemente equivalente. O BVDV mostra-se, portanto, um modelo eficaz para a avaliação de drogas com atividade antiviral potencial contra o HCV e em estudos de mecanismos de ação (Buckwold^a *et al.*, 2003).

Acredita-se que a infecção pelo HCV seja a principal causa de hepatite humana no mundo, e a Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 170 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas por este vírus (Li *et al.*, 2012). Pessoas com infecção crônica geralmente não apresentam sintomas clínicos até que evoluam para casos mais graves (Suzuki *et al.*, 2007). Isso representa um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, pois pacientes com infecção crônica por HCV apresentam alto risco de desenvolver cirrose hepática e até mesmo carcinoma hepatocelular (Strader *et al.*, 2004).

Até o momento, não há vacina disponível contra HCV (Barnes *et al.*, 2012). O tratamento disponível contra essa infecção é composto por interferon alfa-peguilado (IFN- α) somente, ou em combinação com ribavirina (Bartenschlager & Lohmann, 2001).

O mecanismo de ação do interferon ocorre através da ativação de genes específicos que influenciam o crescimento e a divisão celular. Promovem, portanto, um efeito indireto contra o HCV. Após a sua ligação ao receptor específico na superfície da célula-alvo, o interferon ativa uma cascata de sinalização intracelular, que cria um estado antiviral específico no interior da célula (Peters, 1996; Souvignet *et al.*, 2007). A ribavirina apresenta atividade contra vários vírus, tanto DNA como RNA. Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado, mas os seguintes efeitos são sugeridos: inibição direta da replicação do HCV, inibição de uma enzima envolvida no ciclo replicativo viral (inosina monofosfato desidrogenase), indução de mutagênese no RNA viral ou imunomodulação pela indução de um Linfócito T *helper* tipo 1 (Parker, 2005).

Esse tratamento que combina interferon e ribavirina é bem caro, tem sucesso limitado e está associado a uma vasta gama de efeitos secundários (Martinot Peignoux *et al.*, 1998), o que leva uma proporção significativa dos pacientes à descontinuação do tratamento (Ravikumar *et al.*, 2011). São comuns efeitos semelhantes a sintomas de gripe, fadiga e depressão devido ao interferon. Apesar dos efeitos benéficos da ribavirina, os efeitos secundários são mais severos na terapia combinada, pois a ribavirina pode provocar anemia hemolítica e, devido ao seu caráter teratogênico, não pode ser utilizado em mulheres grávidas infectadas pelo HCV (Bartenschlager & Lohmann, 2001).

Diante da ausência de vacina disponível e de um tratamento realmente eficaz, faz-se necessário buscar novos compostos que apresentem ação antiviral e que possam representar alternativas ao tratamento já existente.

A pesquisa de novos medicamentos a partir de recursos naturais tornou-se uma tendência global (Ravikumar *et al.*, 2011). Nos últimos anos, pesquisas envolvendo organismos marinhos têm contribuído significativamente para a descoberta de novas substâncias potencialmente bioativas para fins terapêuticos (Blunt *et al.*, 2006).

Nos últimos 50 anos, a partir de organismos marinhos foram identificadas estruturas e componentes que mostraram seu potencial para o desenvolvimento industrial de cosméticos, suplementos nutricionais, produtos químicos e agentes terapêuticos para uma variedade de doenças. Alguns exemplos de bioprodutos marinhos que foram desenvolvidos incluem Ara-A e Ara-C, drogas antivirais derivadas da esponja *Tethya cripta*, Manoalide (sonda molecular) a partir da esponja *Luffariella variabilis* e Pseudopterosinas (aditivos de cremes para a pele) a partir do coral *Pseudopterogorgia elizabethae* (Yasuhara-Bell *et al.*, 2010).

Para as doenças infecciosas, a exploração do ambiente marinho representa uma estratégia promissora na busca por compostos ativos diante da necessidade constante de novos medicamentos, gerada pelo aparecimento de resistência aos tratamentos utilizados contra diversos micro-organismos (da Silva *et al.*, 2006). Já foram oficialmente aprovados para uso clínico mais de 40 compostos, sendo pelo menos metade deles para uso no tratamento de infecções por HIV. Alguns podem ser usados

para o controle de contaminações por vírus enteropatogênicos humanos e em quimioterapia para doenças virais humanas (Yasuhara-Bell *et al.*, 2010). No entanto, apesar da extensão do litoral brasileiro, sua fauna marinha ainda é pouco explorada na pesquisa por produtos naturais biologicamente ativos (Berlinck, 2004). Isso ocorre pela dificuldade encontrada para a coleta desses materiais que exige a prática do mergulho em regiões de diversas profundidades, além do custo ser elevado.

Em certos ecossistemas marinhos, estima-se que a diversidade biológica é maior que em algumas florestas tropicais. Muitos organismos marinhos são sésseis e, por isso, necessitam de meios químicos para sua defesa. Portanto, eles possuem a capacidade de sintetizar componentes tóxicos ou de obtê-los a partir de micro-organismos. A grande diversidade biológica de micro-organismos marinhos ainda foi pouco explorada e essa grande diversidade é capaz de gerar um número igualmente elevado de metabólitos secundários (Haefner, 2003).

Estudos demonstram que os invertebrados marinhos pertencentes às classes Porifera, Mollusca, Cnidaria, Anthozoa, Echinodermata, e Bryozoa são uma fonte rica de vários metabólitos bioativos (Bérdy, 2005; Sipkema *et al.*, 2005). Porém, muitas evidências sugerem que em vários casos os compostos ativos isolados deles são oriundos de micro-organismos simbióticos (Imhoff & Stohr, 2003; Bérdy, 2005).

Substâncias liberadas na água são rapidamente diluídas e, por isso, devem ser muito potentes ou serão ineficazes. Essa é uma das razões porque o ambiente marinho é reconhecido como uma importante fonte de substâncias químicas, cuja atividade

biológica deve ser usada na busca por novas drogas com grande eficácia e especificidade para tratamento de muitas doenças humanas (Haefner, 2003).

Diante dessa variedade de compostos a serem estudados, o ambiente marinho se mostra uma fonte promissora para a pesquisa de novos antivirais, principalmente em casos de doenças virais que ainda possuem tratamentos com eficácia limitada, como é o caso da infecção por HCV. Baseado nisso, esse trabalho se propôs a buscar compostos com ação antiviral a partir de extratos à base de invertebrados e micro-organismos marinhos contra o BVDV e, desse modo, com possível ação contra o HCV.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* de extratos de invertebrados e micro-organismos marinhos frente ao BVDV e, desse modo, com possível ação contra o HCV;
- Verificar os possíveis mecanismos de ação dos extratos ativos por meio de ensaios diferenciais.

3. JUSTIFICATIVA

A infecção pelo HCV ainda hoje se apresenta como um dos grandes problemas de saúde pública no mundo. Estima-se que existam cerca de 170 milhões de pessoas infectadas por esse vírus. Por ser uma doença assintomática por um longo período, a maioria dos pacientes somente busca o diagnóstico após a evolução para os quadros mais graves da doença, que muitas vezes são irreversíveis. Além da inexistência de vacina, o tratamento disponível é caro e de sucesso limitado, além de provocar muitos efeitos colaterais, levando à interrupção do tratamento em muitos casos. Existe, portanto, uma necessidade urgente do desenvolvimento de novos fármacos para serem utilizados no tratamento dessa infecção, o que evidencia a importância das pesquisas por novos agentes terapêuticos que atuem frente a esse vírus. Diante da dificuldade de replicação do HCV *in vitro* ou *in vivo*, é necessário utilizar modelos para o estudo de substâncias com ação antiviral. Devido à similaridade molecular e biológica, o BVDV tem sido proposto como modelo para o estudo de agentes antivirais que atuem frente ao HCV, e permite a realização de ensaios de mecanismo de ação.

4. HIPÓTESE

O ambiente marinho contém diversos organismos e micro-organismos que produzem substâncias com capacidade para atuar frente a diversos vírus, entre eles o BVDV e o HCV.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1- CULTIVO CELULAR

A linhagem celular utilizada nos ensaios foi a MDBK (Madin-Darby bovine kidney - ATCC CCL-22). Essa linhagem foi mantida em meio essencial mínimo de Eagle (MEM(E) Nutricell) suplementado com 10% de soro equino (Cripion). O soro fetal bovino, comumente utilizado em cultura celular, encontra-se frequentemente contaminado pela cepa não citopática do BVDV. Isso não gera prejuízos visíveis na maioria dos estudos mas, sendo este o vírus estudado, os vírus citopáticos e não-citopáticos poderiam entrar em competição e a cepa citopática poderia ser impedida de atuar nas células e levar ao aparecimento de efeito citopático. Por esse motivo, o soro equino foi escolhido para a manutenção dessas células.

Estoque celular foi mantido pelo congelamento em nitrogênio líquido das células, em soro suplementado com DMSO (Dimetilsulfóxido – Sigma Aldrich). Periodicamente, foram realizados ensaios de imunofluorescência para verificar a possível contaminação celular pela cepa não citopática do BVDV, já que essa contaminação ocorre com facilidade em laboratórios onde soro fetal bovino é utilizado, e isso poderia prejudicar a visualização dos resultados dos ensaios realizados neste trabalho.

5.2- MULTIPLICAÇÃO E ESTOQUE DE VÍRUS

A cepa viral utilizada foi a BVDV Singer (cepa citopática de BVDV-1), cedida pelo Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores, da Universidade Federal de Santa Maria - RS. Para a multiplicação viral, alíquotas contendo BVDV Singer a um título de $10^{6,0}$ TCID₅₀/mL foram inoculadas em garrafas de 25 cm² contendo monocamada celular, preparadas com 24 h de antecedência. Previamente à inoculação, todo o conteúdo do meio de cultura foi removido e, após a inoculação de 1 mL da solução viral, a garrafa foi mantida em estufa a 37°C por duas h, para garantir a adsorção viral. Após esse período, foram adicionados 5 mL de meio MEM com 2% de soro equino na garrafa, que foi, então, incubada por um período de 72 h, observando-se diariamente o aparecimento do efeito citopático característico até a destruição de cerca de 70% da monocamada celular. O sobrenadante foi, então, coletado, centrifugado a 2000 rpm durante 10 min e foram preparadas alíquotas para estoque viral a ser utilizado nos ensaios.

5.3- TITULAÇÃO VIRAL

Para a titulação viral, foram preparadas placas de 96 orifícios com monocamada de MDBK, incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. A amostra viral foi preparada nas diluições 10⁻¹ a 10⁻⁷. Essas diluições foram adicionadas sobre a monocamada celular em quadruplicata (50 µL por orifício), deixando-se uma linha da placa sem inóculo representando o controle celular. As visualizações foram realizadas diariamente em microscópio de luz invertida (Axiovert 100, Carl Zeiss Oberkochen) para a observação do efeito citopático e, após 72 h, foi realizada a última leitura seguida pelo cálculo do título viral. O título foi calculado através da fórmula de Reed e Munch (1938).

5.4- PREPARO DOS EXTRATOS

Os organismos marinhos foram coletados pela equipe do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck em diversos locais da costa brasileira, incluindo os Estados da Bahia, Alagoas, Rio de Janeiro e São Paulo. A partir destes organismos também foram isolados bactérias e fungos filamentosos, dos quais foram obtidos extratos brutos para ensaios antivirais.

5.4.1- PREPARO DOS EXTRATOS A PARTIR DE INVERTEBRADOS

Os extratos de invertebrados marinhos foram preparados pela equipe do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck do IQSC-USP e enviados ao LVA-IB-UNICAMP para a realização do bioensaio de avaliação da atividade antiviral (Projeto temático FAPESP 2010/50190-2).

Todos os invertebrados marinhos foram extraídos de acordo com o seguinte procedimento: foi tomada uma alíquota de 50 g de cada animal, que foi cortada em pequenos fragmentos e colocada em MeOH (metanol) por 1 noite. Após este período, o solvente foi transferido para tubos de ensaio com tampas rosqueáveis, os quais foram colocados em aparelho Speedvac para a evaporação do MeOH. Após a total evaporação do MeOH, as amostras foram mantidas em freezer à temperatura de – 20 °C. Alíquotas de cada extrato bruto seco foram pesadas em frascos de vidro e enviadas para os bioensaios.

5.4.2- PREPARO DOS EXTRATOS A PARTIR DE FUNGOS

O preparo dos extratos a partir de fungos isolados de organismos marinhos foi realizado pela equipe da Profa. Dra. Lara Durães Sette, da Universidade Estadual

Paulista – Rio Claro. As linhagens de fungos foram inoculadas em placas de Petri para crescimento de suas colônias. Em seguida, discos do meio de cultura sólido contendo a linhagem foram transferidos para 32 frascos do tipo Schott contendo 250 mL do meio de cultura, totalizando um volume de 8 L do meio de cultura inoculado com a linhagem de fungo. A inoculação nos frascos foi realizada utilizando seringas de 10 mL para a retirada de cerca de cinco discos de cada colônia para a transferência aos frascos. Os frascos contendo as linhagens de fungos foram incubados em temperatura ambiente durante 21 dias, de modo a reproduzir o crescimento anterior.

Para o preparo dos extratos, após 21 dias foram adicionados 250 mL de acetato de etila a cada um dos frascos e estes foram periodicamente agitados. A mistura resultante foi filtrada em funil de Buchner, através de papel coberto com cerca de 2 cm de celite. A solução filtrada foi posteriormente separada por partição líquido-líquido, a fração aquosa foi descartada e a fração orgânica seca em evaporador rotativo e transferida para frascos previamente pesados.

Alguns desses extratos brutos passaram, ainda, por processo de fracionamento. Para isso, inicialmente foi realizada uma pré-purificação em que o extrato seco foi suspenso em 500 mL de MeOH, transferido para funil de separação e particionado com 500 mL de hexano dividido em três partes. A fração hexânica foi evaporada e a fração metanólica foi transferida para um frasco previamente pesado para a determinação da massa resultante. A fração metanólica foi dividida em partes de 0,5 g e fracionada por cromatografia em coluna de separação por tamanho de partículas – Sephadex LH20 – eluída com MeOH grau analítico.

Foram coletadas frações de aproximadamente 8 mL em tubos de ensaio pequenos. As frações foram, posteriormente, analisadas por CCD (cromatografia em camada delgada) utilizando-se os eluentes e reveladores que se mostraram mais adequados, de acordo com os testes anteriores, avaliadas quanto ao seu grau de similaridade e as frações semelhantes foram reunidas. As frações semelhantes foram transferidas para frascos previamente pesados e etiquetados para determinação de suas massas.

5.4.3- PREPARO DOS EXTRATOS A PARTIR DE BACTÉRIAS

As bactérias utilizadas nos ensaios antivirais foram isoladas pela equipe da Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini da Divisão de Recursos Microbianos (DRM) e estão mantidas na Divisão de Recursos Microbianos/CPQBA - UNICAMP.

Extratos derivados do metabolismo dos isolados de bactérias com potencial biotecnológico foram obtidos pelo método de separação líquido-líquido. Um pré-inóculo dos isolados foi feito em 7 mL do meio de Marine Agar (Difco™, USA) preparado com água artificial do mar (ASW): KBr 0,1 g/L, NaCl 23,48 g/L, MgCl₂·6H₂O 10,61 g/L, CaCl₂·2H₂O 1,47 g/L, KCl 0,66 g/L, SrCl₂·6H₂O 0,04 g/L, Na₂SO₄ 3,92 g/L, NaHCO₃ 0,19 g/L, H₃BO₃ 0,03 g/L e incubado a 30 °C por 48 h a 150 rpm. Após o crescimento da cultura, o volume total foi transferido para um frasco Erlenmeyer contendo 50 mL do

mesmo meio e mantidos na mesma temperatura e rotação por 12 h. Novamente, 50 mL do crescimento bacteriano foram transferidos para quatro frascos em vidro contendo 500 mL do mesmo meio e mantidos nas mesmas condições citadas acima por 3 semanas. Após esse período, 500 mL de acetato de etila foram adicionados e o material foi triturado em liquidificador de alta rotação e mantido, então, sob agitação a 100 rpm por 12 h.

Os extratos brutos foram obtidos pelo método de separação líquido-líquido, após filtragem em funil de Buchner contendo camada de celite. Após separação das fases orgânicas e aquosas, a fase orgânica foi transferida para balão de fundo redondo. Os extratos brutos foram concentrados no rotaevaporador (Rotavapor R-215 Buchi), a vácuo e temperatura de 30 °C, até completa secagem do solvente. Para fracionamento do extrato bruto, foi adicionado o solvente de extração (acetato de etila) e dividido em 3 frascos de vidro, os quais foram concentrados em rotaevaporador (Rotavapor R-215 Buchi), a vácuo e temperatura de 30 °C. A cada fração foi adicionado metanol, e foram, então, homogeneizadas em banho de ultrassom, filtradas em algodão, transferidas para novos frascos de vidro e concentradas em centrífuga a vácuo (Savant SpeedvacâPlus SC 210A) com refrigeração (RVT4104 refrigerated Vapor Trap), até completa secagem do solvente. Os extratos brutos foram, então, encaminhados para os ensaios de atividade antiviral.

5.5- ENSAIO ANTIVIRAL

Para o ensaio antiviral, foram preparadas placas de 96 orifícios com células MDBK que permaneceram em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Após esse período, o meio foi descartado e o ensaio foi montado conforme esquematizado na Figura 1.

BR	CE1	CE2	CE3	CE4	CE5	CE6	CE7	CE8	CE9	CE10	CE11
BR	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5	Am6	Am7	Am8	Am9	Am10	Am11
CC	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5	Am6	Am7	Am8	Am9	Am10	Am11
CC	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5	Am6	Am7	Am8	Am9	Am10	Am11
CC	Am12	Am13	Am14	Am15	Am16	Am17	Am18	Am19	Am20	Am21	Am22
CV	Am12	Am13	Am14	Am15	Am16	Am17	Am18	Am19	Am20	Am21	Am22
CV	Am12	Am13	Am14	Am15	Am16	Am17	Am18	Am19	Am20	Am21	Am22
CV	CE12	CE13	CE14	CE15	CE16	CE17	CE18	CE19	CE20	CE21	CE22

Figura 1: Esquema da placa de 96 compartimentos padronizado para o ensaio antiviral. Sendo: BR=branco; CC=controle celular; CV=controle viral; CE=controle de extrato; e Am=amostra.

Na primeira coluna da placa, foram destinados dois orifícios ao branco (somente meio e soro), três orifícios para o controle celular (somente células e meio de

manutenção), e três para o controle de vírus (células e vírus com título igual ao utilizado nos experimentos de avaliação da atividade antiviral de cada extrato). No restante da placa, foram realizados os ensaios antivirais para cada extrato, sendo que cada um deles foi avaliado em triplicata e um orifício foi destinado ao controle do extrato, para garantir que o efeito celular verificado nos ensaios ocorreu devido à ação do vírus e não pela citotoxicidade do extrato. Desse modo, em cada placa foram avaliadas as atividades de 22 extratos.

Para esses ensaios, foram utilizados 50 µg/mL dos extratos e 100 TCID₅₀/mL de vírus. Para substâncias isoladas a concentração utilizada foi dez vezes menor. Essas placas foram incubadas a 37 °C e acompanhadas diariamente para verificação do aparecimento de efeito citopático e grau de destruição da monocamada celular. Após 72 h foi realizada a leitura final do efeito citopático ao microscópio óptico para visualização da presença de extratos potencialmente ativos, ou seja, os extratos que apresentaram proteção significativa às células diante do efeito citopático viral foram considerados como potencialmente ativos. Para isso, foi realizada uma comparação entre os controles (celular e viral) para que fosse possível inferir a proteção promovida pelo extrato.

Em seguida, a taxa de proteção apresentada por cada extrato foi quantificada através do ensaio colorimétrico de MTT ((3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide). Esse ensaio permite a quantificação da viabilidade celular e, indiretamente, permite quantificar a proteção celular do extrato frente ao vírus.

5.6- ENSAIO COLORIMÉTRICO DE MTT

Inicialmente, foram adicionados 20 µL da solução de MTT (a uma concentração de 5 mg/mL) em cada orifício das placas. Essas placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 4 horas. Essa etapa do ensaio permite a redução do MTT por células metabolicamente ativas a cristais de formazan. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos para a fixação dos cristais formados no fundo dos orifícios. Então, o sobrenadante de cada orifício foi retirado cuidadosamente, seguindo-se à adição de 150 µL de DMSO para a dissolução dos cristais formados, o que permitiu a posterior leitura da absorbância. A taxa de redução do tetrazolium corresponde à taxa de células viáveis, metabolicamente ativas. As placas foram, em seguida, colocadas em agitação por 10 min e, por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm (Gerlier & Thomasset, 1986).

A porcentagem de proteção foi, então, definida a partir do seguinte cálculo (Takeuchi *et al.*, 1991):

$$\frac{\text{Absorbância do tratado} - \text{absorbância do controle de vírus}}{\text{Absorbância do controle celular} - \text{absorbância do controle de vírus}} \times 100$$

Os extratos que apresentaram uma porcentagem de proteção a partir de 80% foram considerados potencialmente ativos e selecionados para a continuação dos

ensaios, já que foram testados a 50 µg/mL e sua atividade poderia ser potencializada quando utilizada na concentração máxima não tóxica.

5.7- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA NÃO TÓXICA E CÁLCULO DE CC₅₀

Para a determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT) foram utilizadas 11 diluições sequenciais dos extratos, cujas concentrações variaram entre 2000 µg/mL a 0,48 µg/mL, dependendo da quantidade de extrato disponibilizada para os ensaios. Essas diluições foram adicionadas em quadruplicata sobre a monocamada celular e incubadas em estufa durante 48 h, quando foi determinada a máxima concentração em que o extrato não apresentou citotoxicidade. Essa determinação foi realizada através de visualização ao microscópio, pela observação da morte celular provocada pelas maiores concentrações dos extratos.

Após observação visual, seguiu-se o ensaio de MTT, com a finalidade de quantificar a viabilidade celular em cada quadruplicata de cada concentração do extrato. Essa viabilidade celular foi calculada a partir dos valores de absorbância em comparação com o controle celular. A partir desses dados, foi realizada uma regressão linear que gerou um valor de CC₅₀ de cada extrato. CC₅₀ corresponde à concentração do extrato que reduz em 50% o crescimento celular.

5.8- ENSAIOS PRELIMINARES DE POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO

Para a avaliação da fase do ciclo viral em que cada extrato pode interferir, foram realizados experimentos com diferentes tratamentos.

- **Pré-tratamento:** as células foram previamente tratadas com as substâncias avaliadas, objetivando verificar sua capacidade de produzir um estado antiviral na célula. Após 1 h, as amostras virais foram adicionadas nas diluições 10^{-1} a 10^{-6} .

- **Ensaio de inativação da partícula viral:** as amostras virais foram mantidas por 1 h em contato com a substância analisada, na ausência de células, para avaliar a capacidade de provocar inativação da partícula viral, ou interferência em sua habilidade de iniciar um ciclo de replicação. Após 1 h, a mistura de vírus e extrato foi diluída normalmente e as diluições foram adicionadas à placa contendo a monocamada celular.

- **Pós-tratamento:** A substância foi adicionada após 1 h da inoculação do vírus e, assim, pôde-se verificar se era capaz de interferir nas etapas intracelulares da replicação viral.

Para os extratos que apresentaram maior atividade no ensaio de pré-tratamento, foram realizados os seguintes ensaios adicionais:

- **Ensaio da inibição da Adsorção viral:** As células foram infectadas com vírus e tratadas com os extratos na CMNT (100 μ L) durante 1 h a 4 °C. Essa temperatura utilizada permite que ocorra a adsorção viral, mas não a penetração. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, as placas foram lavadas com PBS, foram adicionados 150 μ L de MEM com 1% de soro e as placas foram incubadas a 37 °C por 72 h, permitindo a penetração das partículas virais e continuidade do processo de replicação.

- **Ensaio da inibição da Penetração viral:** inicialmente adicionou-se 50 μ L do vírus nas diferentes diluições, e as placas foram incubadas por 1 h a 4 °C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS e adicionou-se o extrato na concentração máxima não tóxica. A temperatura de incubação foi, então, elevada para 37° C para permitir a penetração viral.

Após 72 h de incubação das placas em cada um desses ensaios, o efeito citopático foi visualizado e o título viral calculado. A partir da comparação entre o título viral do controle e do tratado, foi determinada a atividade do extrato em cada tratamento. Para isso, foram calculados o índice de inibição viral e a porcentagem de inibição.

O índice de inibição viral (IIV) para cada extrato foi calculado através da diferença entre o log do título do controle (C), sem extrato, e o log do título do tratado

(T), com extrato. O efeito foi considerado positivo se o IIV foi igual ou maior que 1,75 log.

A porcentagem de inibição foi calculada pela fórmula: $(PI) = (1 - T/C) \times 100$, onde T é o antilog dos títulos virais tratados e C é o antilog do título viral controle. Considerou-se positivo o efeito dos extratos que geraram uma PI superior a 97%.

Extratos com atividade acima de 90% foram considerados promissores, considerando que nos extratos pode-se encontrar componentes que são ativos, componentes que não tem atividade e não interferem na atividade dos ativos, e também aqueles que interferem na atividade das substâncias ativas presentes. Portanto, o isolamento dessas substâncias poderia levar ao aumento da atividade apresentada.

5.9- DETERMINAÇÃO DE IC₅₀ – ENSAIO DE PLACA

Para determinar o valor de IC₅₀ de cada extrato, foram realizados ensaios de placa, de acordo com a atividade apresentada nos ensaios de mecanismo de ação. IC₅₀ corresponde à concentração do extrato capaz de inibir em 50% a replicação viral. Esse valor, juntamente com o valor de CC₅₀ permite calcular o índice de seletividade de cada extrato, ou seja, o grau de segurança para a utilização da droga *in vitro*.

Para esses ensaios, foram preparadas placas de 24 orifícios com monocamada confluyente de células MDBK. Em cada placa foi realizado o ensaio para um extrato, contendo controle celular e controle viral em triplicata. Foram realizadas 6 diluições dos extratos a partir da concentração máxima não tóxica previamente determinada. Essas diluições foram testadas em triplicata nos ensaios, que foram realizados de três maneiras, com base na atividade apresentada nos ensaios de mecanismo de ação:

- Os vírus foram inoculados e mantidos em estufa durante 2 h. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, as placas foram lavadas com PBS, e acrescentou-se o extrato em cada diluição, juntamente com CMC (carboximetilcelulose) a 1,5% e MEM 2X concentrado na proporção de 1:1. Esse método foi utilizado para os extratos que mostraram maior atividade no ensaio de pós-tratamento.

- Os vírus foram inoculados na placa juntamente com as diluições do extrato e, após 2 h, o sobrenadante foi retirado e foram acrescentados o CMC e o MEM 2X concentrado. Esse método foi utilizado para os extratos ativos sobre as partículas virais.

- As diluições dos extratos foram adicionadas às placas e mantidas por 1 h. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e os vírus foram inoculados. As placas foram incubadas por 2 h. Por fim, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se CMC e MEM 2X concentrado. Esse método foi utilizado para os extratos ativos no pré-tratamento.

Essas placas foram mantidas em estufa durante 72 h e, após esse período, foram lavadas com PBS e coradas com cristal violeta a 0,35%. Então, as placas virais foram contadas e a proteção apresentada por cada concentração do extrato frente ao

vírus foi determinada de acordo com o número de placas virais a partir do cálculo seguinte (conforme metodologia padronizada fornecida pela pesquisadora Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões):

$$1 - \frac{\text{Número de placas da amostra}}{\text{Número de placas do controle viral}} \times 100$$

A partir desses valores foi realizada uma regressão linear (Mosmann, 1983) que gerou o valor correspondente ao IC₅₀, ou seja, a concentração do extrato que inibe em 50% a replicação viral.

5.10- DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

A partir dos valores determinados de CC₅₀ e IC₅₀, foi calculado o índice de seletividade, que expressa a segurança da substância testada e, dessa forma, viabiliza a realização de outros ensaios tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Coen & Richman, 2007; Dezengrini *et al.*, 2009). Os valores de IS são considerados positivos a partir de 4, e quanto maior é esse valor, considera-se o extrato como mais promissor (Amoros *et al.*, 1992).

6. RESULTADOS

6.1- EFEITO CITOPÁTICO DO VÍRUS BVDV SOBRE AS CÉLULAS MDBK

Após a inoculação viral, as alterações celulares características do efeito citopático foram observadas durante 72 h. Após 48 h já se observava efeito citopático significativo, incluindo expressiva formação de vacúolos. Isso fica evidente através da comparação com o controle celular durante esse mesmo período (Figuras 2 a 8).

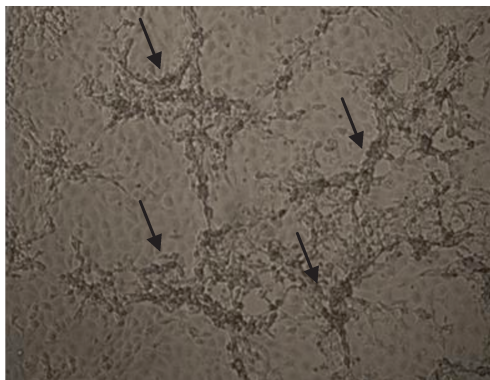


Figura 2: Células MDBK 48 h após inoculação do BVDV com título n de $10^{6,0}$ TCID₅₀/mL (Aumento: 50x). As setas indicam os aglomerados celulares formados.



Figura 3: Controle celular após 48 h (Aumento: 50x)

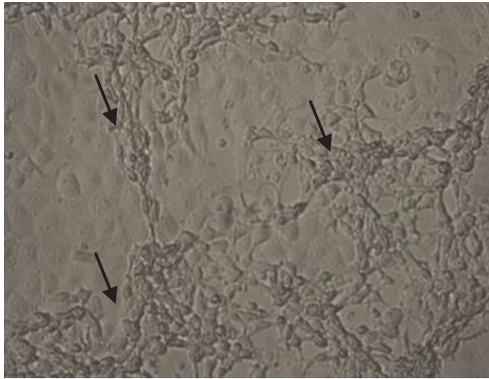


Figura 4: Células MDBK 48 h após inoculação do BVDV com título de $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL (Aumento: 200x). As setas indicam os aglomerados celulares formados.

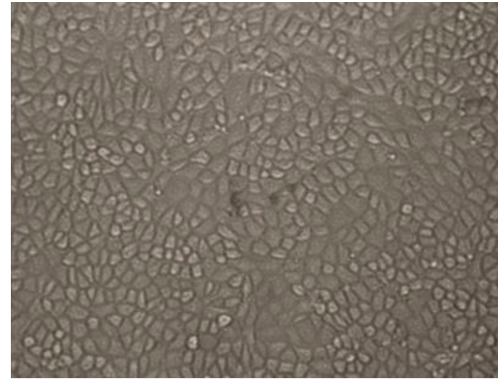


Figura 5: Controle celular após 48 h (Aumento: 200x)

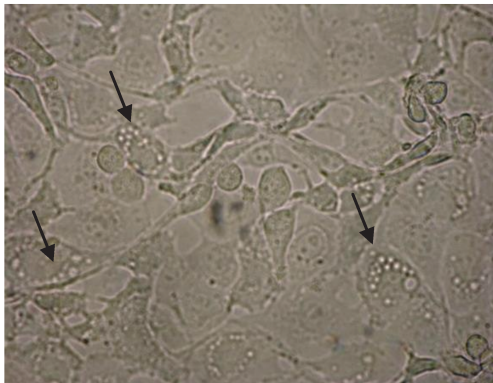


Figura 6: Células MDBK 48 h após inoculação Do BVDV com título de $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL (Aumento: 400x). As setas indicam a expressiva formação de vacúolos.

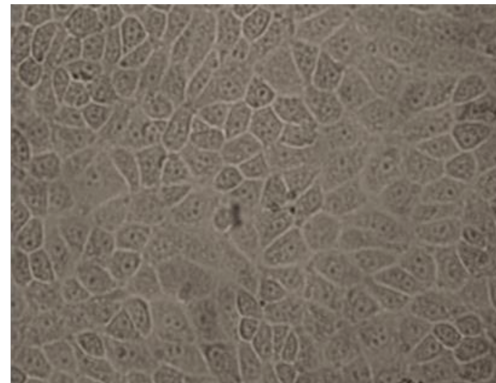


Figura 7: Controle celular após 48 h (Aumento: 400x)

Após 72 h, a monocamada celular já se apresentava quase destruída, como é possível observar na Figura 8:

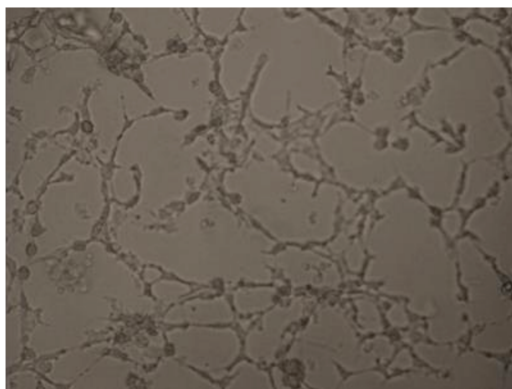


Figura 8: MDBK 72 h após inoculação do BVDV com título de $10^{6,0}$ TCID₅₀/mL (Aumento: 200x)

6.2- ENSAIO ANTIVIRAL

6.2.1- ORIGEM DOS EXTRATOS

Foram testados 422 extratos, originados de diversas fontes, conforme apresentado na Figura 9. A maior parte dos extratos foi preparada a partir de esponjas (44,75%), seguido pelos extratos de bactérias (29%) e fungos (18,75%) isolados dos organismos coletados. Alguns extratos foram preparados a partir de ascídias (5,75%), Briozoários (0,75%) e Cnidários (0,25%). Foram testados, ainda, alguns compostos puros (antraquinona emodina e pirenocina A) isolados a partir dos demais organismos marinhos.

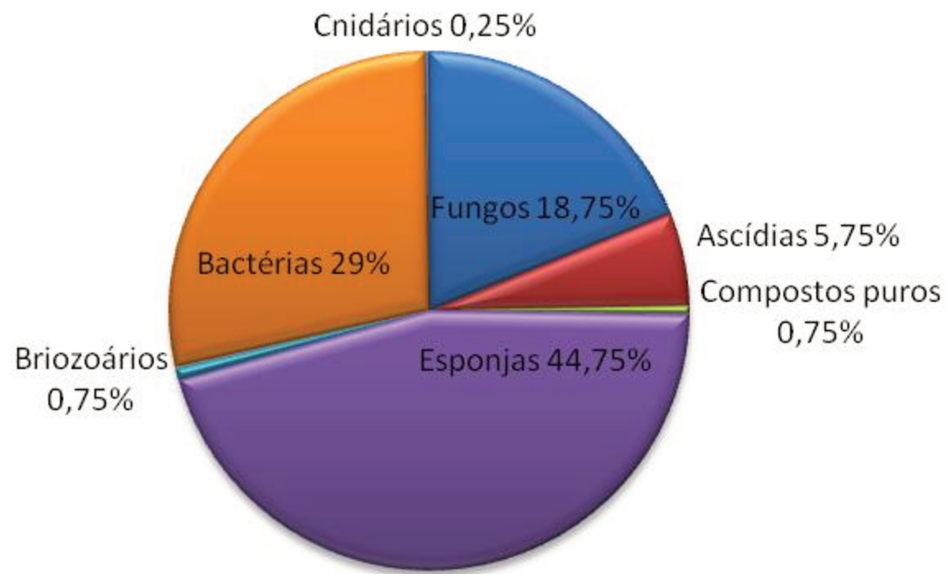


Figura 9: Percentual de extratos testados a partir de cada fonte.

6.2.2- ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

Dos 422 extratos testados, 20 apresentaram potencial atividade antiviral frente ao BVDV, o que corresponde a 5% do total.

Os extratos considerados potencialmente ativos foram produzidos a partir de diversas das fontes. A tabela 1 resume as informações referentes a esses extratos, incluindo a origem dos mesmos e a porcentagem de proteção apresentada nos ensaios iniciais.

O extrato F1-5 corresponde a uma fração (MaMe100Me-1) do extrato metanólico da esponja *Monanchora arbuscula* (MNRJ 11235). No experimento de avaliação da atividade antiviral realizado inicialmente, esse extrato proporcionou uma proteção de 86% às células. Portanto, foi um dos extratos selecionados para a continuação dos ensaios.

O CF11-2H5 corresponde a uma substância isolada que proporcionou 81% de proteção às células. Essa substância está passando por novos ensaios para identificação de sua estrutura.

O extrato BA07ES-52 foi obtido a partir da esponja *Aplysina* sp. (MNRJ 10548) e proporcionou uma proteção de 94%. O extrato BA07ES-56 foi preparado a partir da esponja *Hyrtios* sp. (MNRJ 10550) e sua porcentagem de proteção foi de 99,9%. BA07ES-57 corresponde ao extrato obtido a partir da esponja *Agelas cf. díspar* (MNRJ 10574), cuja porcentagem de proteção foi de 99%. A esponja *Aiolochoia crassa* (MNRJ 8391) deu origem ao extrato BA07ES-58, cuja porcentagem de proteção apresentada foi de 98%.

Os extratos BA07ES-59 e BA07ES-60 foram obtidos a partir da esponja *Aaptos* sp. (MNRJ 2628) e suas porcentagens de proteção foram de 99% e 91%, respectivamente. A esponja *Iotrochota birotulata* foi utilizada para preparar o extrato BA07ES-75, que proporcionou às células uma proteção de 99,9%.

Tabela 1: Identificação e porcentagem de proteção apresentada pelos extratos potencialmente ativos.

Extrato	Identificação*	Porcentagem de proteção** (%)
F1-5	Fração do extrato metanólico da esponja <i>Monanchora arbuscula</i>	86
CF11-2H5	Substância isolada do briozoário <i>Bugula dentata</i> (em identificação)	81
BA07ES-52	<i>Aplysina sp.</i>	94
BA07ES-56	<i>Hyrtilos sp.</i>	99,9
BA07ES-57	<i>Agelas cf. dispar</i>	99
BA07ES-58	<i>Aiolochoira crassa</i>	98
BA07ES-59	<i>Aaptos sp.</i>	99
BA07ES-60	<i>Aaptos sp.</i>	91
BA07ES-75	<i>Iotrochota birotulata</i>	99,9
555	<i>Bacillus sp.</i>	99
584	<i>Bacillus sp.</i>	99,9
B232	<i>Micrococcus sp.</i>	99
B137	<i>Williansia sp.</i>	91
B204	<i>Gordonia sp.</i>	99,9
B255 (75:25)	<i>Janibacter sp.</i>	93
373	<i>Brachybacterium sp.</i>	86
B149	<i>Micrococcus sp.</i>	86
B177	<i>Nocardioides sp.</i>	81
B616	<i>Bacillus sp.</i>	87
DRRBRR-2	<i>Trichoderma sp.</i>	85

*Identificação dos organismos e micro-organismos utilizados na produção de cada extrato. **Os valores de porcentagem de proteção referem-se aos resultados encontrados com a concentração de 50 µg/mL frente a 100 TCID₅₀/50µL de vírus (e concentração de 5 µg/mL para a substância isolada e a fração) através de quantificação por ensaio colorimétrico de MTT.

Os extratos 584 (CBMAI 1571), 555 (CBMAI 1569) e B616 (CBMAI 1572) foram produzidos a partir de *Bacillus* sp. isolados da esponja *Petromica citrina*. Eles apresentaram porcentagem de proteção de 99,9%, 99% e 85%, respectivamente.

Somente um extrato obtido a partir de fungo apresentou atividade antiviral, DRRBBR-2, do fungo *Trichoderma* sp. (CBMAI 1359) isolado da esponja *Dragmacidon reticulatum*. A porcentagem de proteção nesse caso foi de 85%.

Os demais extratos foram obtidos a partir de exemplares do filo Actinobacteria, cuja atividade foi observada a partir de colônias dos gêneros *Micrococcus* (B232 – 99%), *Williansia* (B137 – 91%), *Gordonia* (CBMAI 1069; B204 - 99,9%), *Janibacter* (B255 75:25 – 93%), *Brachybacterium* (CBMAI 1088; 373 – 86%) e *Nocardioides* (CBMAI 1107; B177 – 81%).

6.2.3- CONCENTRAÇÃO MÁXIMA NÃO TÓXICA

Em relação aos valores de CMNT dos extratos considerados potencialmente ativos na triagem inicial, os resultados encontrados estão apresentados na figura 10:

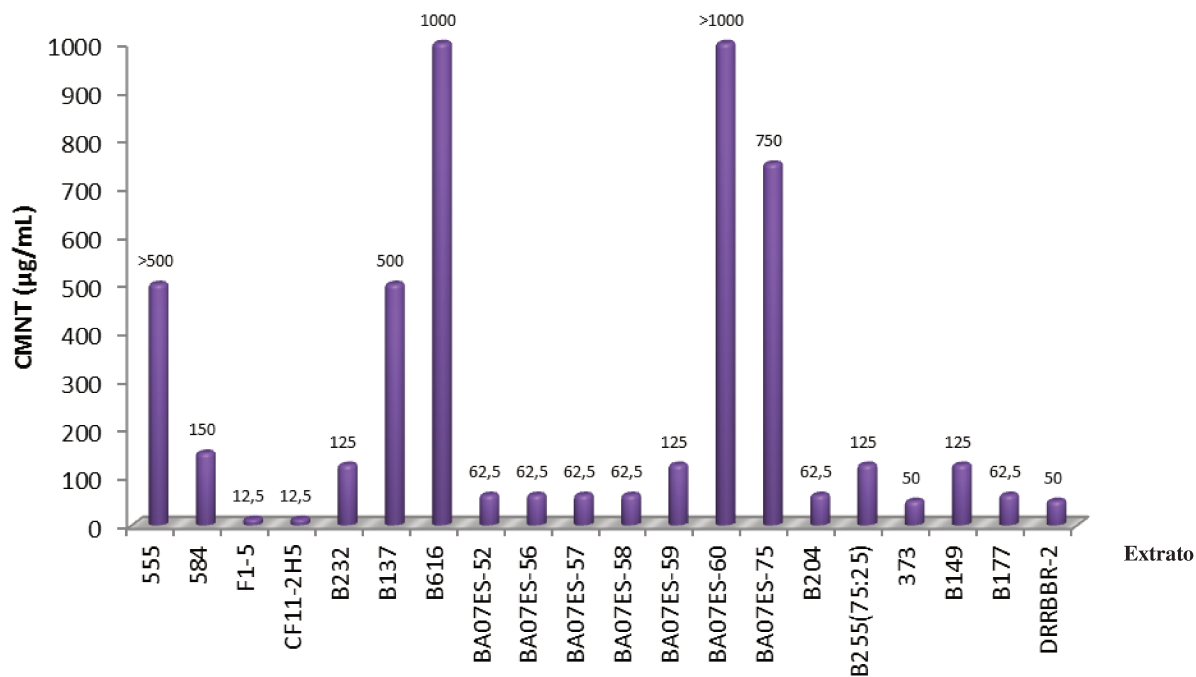


Figura 10: Valores de CMNT dos extratos potencialmente ativos.

Dentre os extratos brutos, o 555 (CMNT>500), o B137 (CMNT=500), o B616 (CMNT=1000), os BA07ES-60 (CMNT>1000) e 75 (CMNT=750) foram os que apresentaram maiores valores de CMNT. Já a fração F1-5 (CMNT=12,5) e a substância isolada CF11-2H5 (CMNT=12,5) apresentaram os valores mais baixos de CMNT.

6.2.4- CC_{50} , IC_{50} e IS

Foram calculados os valores referentes ao CC_{50} (concentração do extrato capaz de reduzir em 50% o crescimento celular), IC_{50} (concentração do extrato capaz de inibir em 50% a replicação viral) e os valores resultantes da razão entre eles, que corresponde ao IS (índice de seletividade), que determina o quanto o composto é ativo sem causar danos à viabilidade celular. Os valores encontrados estão listados na tabela 2.

Através da tabela 2, observa-se que a maioria dos extratos apresentou índice de seletividade maior que quatro. Alguns deles apresentaram um valor de IS consideravelmente alto, como B584 (IS=27), B137 (IS=27), B616 (IS=30,6), BA07ES-75 (IS=33,75) e B373 (SI=39).

Tabela 2: Valores de CC₅₀, IC₅₀ e IS dos extratos ativos e promissores.

Extrato	CC ₅₀ * µg/mL	IC ₅₀ ** µg/mL	IS***
555	>500 [~]	27,35	>18 [~]
584	277	10,24	27
F1-5	39,6	2,49	15
CF11-2H5	37,7	7,5	5
B232	144	49	2,9
B137	918	34	27
B616	1500	47	30,6
BA07ES-52	157	21,3	7,3
BA07ES-56	171	6,8	25
BA07ES-57	88	21,5	4,1
BA07ES-58	86	49	1,75
BA07ES-59	330	40	8,25
BA07ES-60	>1000 [~]	39,5	>25 [~]
BA07ES-75	1325	40	33,75
B204	95	12	8
B255 (75:25)	78,25	14,6	5,35
373	175	4,5	39
B149	187	30	6,2
B177	104	47	2,2
DRRBRR-2	124	13	9,5

*CC₅₀: concentração do extrato capaz de reduzir em 50% o crescimento celular; **IC₅₀: concentração do extrato capaz de inibir em 50% a replicação viral; ***IS: índice de seletividade. Os valores de IS destacados em negrito correspondem aos que foram inferiores ao valor de corte, 4. [~]Os valores destacados não foram determinados com exatidão por causa da pequena quantidade de extrato gerada no processo, o que não permitiu determinar exatamente o valor de CC₅₀.

Apenas três deles não apresentaram esse valor mínimo: B232 (IS=2,9), BA07ES-58 (IS=1,75) e B177 (IS=2,2), o que representa 15% deles. Esse resultado está evidenciado através da Figura 11.

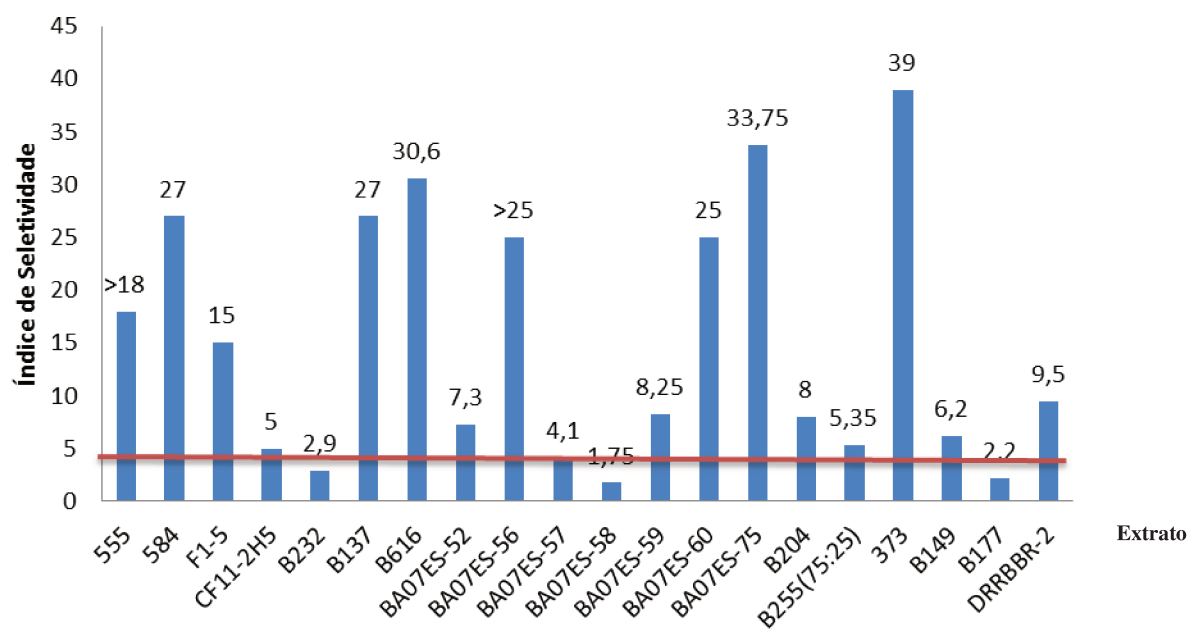


Figura 11: Índice de seletividade dos extratos ativos e promissores.

6.2.5- ENSAIOS PRELIMINARES DE MECANISMO DE AÇÃO

Os ensaios de mecanismo de ação indicam em qual fase o extrato apresenta atividade frente ao vírus, seja atuando diretamente na partícula viral, durante a

adsorção, penetração ou nas demais etapas referentes ao ciclo replicativo. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados dos ensaios preliminares de mecanismo de ação.

<u>Extrato</u>	<u>IIV*</u>	<u>PI**</u> %	<u>Atividade***</u>
555	1,75	98	Pré-tratamento: Adsorção [6]
584	1,75	98	
BA07ES-52	1,75	94	
BA07ES-56	2,0	99	
B204	1,5	97	
B616	1,0	90	
DRRBRR-2	1,25	94	Pré-tratamento: Penetração [4]
B137	1,5	97	
BA07ES-59	2,0	99	
B149	1,0	90	
F1-5	1,0	90	Pré-tratamento [1]
BA07ES-57	1,25	94	Etapas intracelulares da replicação [7]
BA07ES-58	1,25	94	
BA07ES-60	1,0	90	
BA07ES-75	1,0	90	
B232	1,0	90	
B255 (75:25)	0,75 [∨]	83 [∨]	
B177	0,75	83	
373	1,0	90	Inativação viral [2]
CF11-2H5	1,0	90	

Resultados encontrados nos ensaios preliminares de mecanismo de ação. *IIV = Índice de inibição viral; **PI = Porcentagem de inibição. ***Fase em que o extrato promoveu maior atividade frente ao vírus, através da redução do título viral: pré-tratamento (adsorção ou penetração), etapas intracelulares do ciclo replicativo ou inativação viral. [∨]Ensaio realizado com o extrato bruto de B255.

A tabela 3 mostra que a maioria dos extratos foram ativos nos ensaios de pré-tratamento, sendo que seis deles atuaram durante a adsorção viral, quatro durante a penetração e para 1 deles (F1-5) não foi possível diferenciar a fase de ação entre adsorção e penetração porque trata-se de uma fração cuja quantidade gerada pelo processo de fracionamento foi muito pequena, não sendo suficiente para a realização de todos os experimentos.

Sete extratos foram capazes de atuar durante as etapas intracelulares do ciclo replicativo viral, impedindo que este ocorresse normalmente (Tabela 3). Os experimentos referentes ao mecanismo de ação do extrato B255 foram realizados com o extrato bruto, já que a quantidade da fração era insuficiente para a realização de todos os experimentos. Por esse motivo, a porcentagem de inibição, nesse caso, foi de 83%, inferior à proteção apresentada pela fração.

Um extrato e uma substância testados foram capazes de agir diretamente sobre a partícula viral, impedindo assim a adsorção, penetração e produção de novas partículas virais (Tabela 3).

A partir dos valores de Índice de Inibição Viral e Porcentagem de Inibição calculados nesses ensaios, os extratos foram classificados em ativos ou promissores, já que para serem considerados ativos, devem apresentar índice de inibição viral maior ou igual a 1,75 e porcentagem de inibição maior ou igual a 98% (Tabela 3). Com base nesses parâmetros, os extratos ativos foram 584 (IIV=1,75 e PI=98%), 555 (IIV=1,75 e PI=98%), BA07ES-56 (IIV=2,0 e PI=99%) e BA07ES-59 (IIV=2,0 e PI=99%), o que

corresponde a 20% dos extratos considerados inicialmente como potencialmente ativos (Tabela 3).

7. DISCUSSÃO

A exploração do ambiente marinho representa uma estratégia promissora na busca por componentes ativos contra as doenças infecciosas (Yasuhara-Bell *et al.*, 2010). Além de suas estruturas peculiares, produtos naturais marinhos possuem uma extraordinária diversidade de alvos moleculares com seletividade marcante, como canais iônicos, enzimas, microtúbulos, DNA, lisossomos, calmodulina, proteossomos, além de indução de estresse oxidativo e modulação do sistema imunológico. Isso aumenta sobremaneira o potencial farmacológico e terapêutico dessas moléculas (Costa-Lotufo *et al.*, 2009).

No presente trabalho, foram utilizados extratos produzidos a partir de diferentes fontes de organismos marinhos, bem como de seus micro-organismos associados. Algumas substâncias isoladas a partir desses organismos também foram testadas aqui, como a antraquinona emodina e a pirenocina A.

Espônjas marinhas estão entre as fontes mais ricas de produtos farmacologicamente ativos originados de organismos marinhos, tanto por seus metabólitos secundários como por substâncias produzidas por seus micro-organismos

associados. Já são conhecidos muitos produtos relacionados, que representam possíveis alternativas contra doenças de origens bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias (Marinho *et al.*, 2010). Nesse estudo, foram utilizadas várias esponjas, entre elas *Monanchora arbuscula*, *Haliclona melana*, *Mycale* sp., *Tethya* sp. *Amphimedon viridis*, *Clathria* sp., *Hemimycale* sp., *Petromica ciocalyptoides* e *Petromica citrina*.

As ascídias também são capazes de produzir metabólitos secundários que despertam interesse para as pesquisas de substâncias bioativas. O primeiro metabólito ativo foi isolado da ascídia *Aplidium* sp., e a partir daí foram identificados vários compostos com atividades notáveis, incluindo o primeiro produto natural marinho a passar por ensaios clínicos humanos, a Didemnina B (Núñez-Pons *et al.*, 2012). Aqui foram utilizados extratos das acídias *Didemnum ligulum* e *Didemnum rodriguesi*.

Um dos extratos testados foi produzido a partir de um cnidário, *Pennaria disticha*. Esse organismo, segundo Tezcan e Sarp (2013), é bem conhecido por provocar reações tóxicas através de substâncias liberadas a partir do contato com ele. Portanto, ele libera substâncias que promovem a sua defesa. Essas substâncias normalmente despertam interesse em estudos de substâncias ativas contra micro-organismos e parasitas e foi um dos alvos deste trabalho.

Outros extratos foram produzidos a partir de um briozoário, *Bugula dentata*, do qual foi isolada uma substância que está em fase de identificação. Essa substância mostrou-se promissora nos ensaios antivirais.

Além dos organismos marinhos, micro-organismos associados a eles também foram alvo da avaliação da atividade antiviral no presente estudo, já que diversos trabalhos demonstraram a ação biológica dos mesmos (Sipkema *et al.*, 2005, Imhoff & Stohr 2003, Bérdy, 2005). Foram utilizadas bactérias como *Bacillus* sp., *Erythrobacter aquimaris*, *Ruegeria* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudovibrio denitrificans*, entre várias outras, além de vários componentes do filo Actinobacteria, e também fungos como *Penicillium citrinum*, *Penicillium paxillii* e *Trichoderma* sp.

Através dos ensaios antivirais iniciais, foram considerados potencialmente ativos 20 extratos testados, que correspondem a 5% do total. Esses 20 extratos foram considerados potencialmente ativos porque apresentaram proteção de mais de 80% às células frente ao vírus. Para ser considerado ativo, o extrato deve apresentar proteção a partir de 98%. Porém, utilizamos aqui uma concentração dos extratos de 50 µg/mL. Para os compostos puros, foi utilizada a concentração de 5 µg/mL. Essa atividade poderia, portanto, ser aumentada quando o extrato fosse testado em sua concentração máxima não tóxica. Além disso, foram testados aqui extratos brutos em sua maioria. O isolamento da substância ativa pode potencializar essa atividade. Desse modo, esses extratos mostraram um grande potencial para a identificação de novas substâncias ativas contra o vírus estudado.

O extrato F1-5 corresponde a uma fração (MaMe100Me-1) do extrato metanólico da esponja *Monanchora arbuscula*. O extrato metanólico dessa esponja já mostrou atividade antibacteriana antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e citotóxica (Kossuga *et al.*, 2007). Nesse trabalho, é citado, ainda, que estudos químicos

anteriores realizados com esponjas do gênero *Monanchora* demonstraram que espécies deste gênero são uma rica fonte de alcalóides guanidínicos. O alcalóide guanidínico isoptilocaulina, isolado de *Monanchora arbuscula*, mostrou ser um potente antibiótico contra linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. No experimento de avaliação da atividade antiviral frente ao BVDV realizado inicialmente, esse extrato proporcionou uma proteção de 86% às células.

O CF11-2H5 corresponde a uma substância isolada do briozoário *Bugula dentata* (CF11BRI-01). Essa substância está em fase de identificação e proporcionou uma proteção de 81% às células.

O extrato BA07ES-52 foi obtido a partir da esponja *Aplysina* sp. e proporcionou uma proteção de 94% às células frente ao BVDV. Espécies de *Aplysina* são comumente encontradas em águas marinhas rasas de regiões tropicais e subtropicais, e são reconhecidas pela presença de micro-organismos simbiotes que produzem compostos com propriedades antimicrobianas (Cruz-Barraza *et al.*, 2012). Essas esponjas representam uma rica fonte de metabólitos secundários, e já foi descrita sua capacidade de gerar resposta antiinflamatória (de Medeiros *et al.*, 2012).

O extrato BA07ES-56 foi preparado a partir da esponja *Hyrtios* sp. e sua porcentagem de proteção foi de 99,9%. Essas esponjas contêm em sua composição derivados indólicos, que já tiveram várias atividades descritas como anti-câncer, antibiótica, antiinflamatória e antioxidante (Longeon *et al.*, 2011; Mollica *et al.*, 2012).

BA07ES-57 corresponde ao extrato obtido a partir da esponja *Agelas cf. dispar*, cuja porcentagem de proteção foi de 99%. *Agelas dispar* abriga diversos invertebrados em sua superfície e seus canais. Esta espécie produz uma grande variedade de compostos bioativos, inclusive alcalóides betaínicos e bromopirrólicos com atividade antibacteriana e glicolipídeos com ação imunomoduladora (Custódio *et al.*, 2012).

A esponja *Aiolochoira crassa* deu origem ao extrato BA07ES-58, cuja porcentagem de proteção apresentada foi de 98%. Essa esponja produz os crasserídeos, glicolipídeos com atividade anti-predação por peixes, além de derivados da bromotirosina com atividade antibiótica (Custódio *et al.*, 2012).

Os extratos BA07ES-59 e BA07ES-60 foram obtidos a partir da esponja *Aaptos* sp. e suas porcentagens de proteção foram de 99% e 91%, respectivamente. Já foi descrita a propriedade anti-amebiana do extrato metanólico dessa esponja (Nakisah *et al.*, 2012), bem como a atividade antiproliferativa obtida a partir de alcalóide presente na estrutura da mesma (Jin *et al.*, 2011).

A esponja *Iotrochota birotulata* foi utilizada para preparar o extrato BA07ES-75, que proporcionou às células uma proteção de 99,9%. Atividades biológicas ainda foram pouco exploradas com relação a esse organismo marinho.

Os extratos 584, 555 e B616 foram produzidos a partir de *Bacillus* sp. isolados da esponja *Petromica citrina*. Eles apresentaram porcentagem de proteção de 99,9%, 99% e 85%, respectivamente. A *Petromica citrina* é endêmica no Brasil e possui associada a ela uma grande diversidade de bactérias cultiváveis (Mantovani, 2011). Já foi

demonstrada atividade antimicrobiana contra algumas bactérias resistentes a partir de extratos aquosos dessa esponja (Marinho *et al.*, 2010). Porém neste trabalho, foram ativos os extratos produzidos a partir de micro-organismos associados a ela.

Somente um extrato obtido a partir de fungo foi ativo, DRRBBR-2, do fungo *Trichoderma* sp. Isolado da esponja *Dragmacidon reticulatum*. A porcentagem de proteção nesse caso foi de 85%. Espécies de *Trichoderma* já demonstraram atividade antifúngica (Vicente *et al.*, 2001).

Os demais extratos foram obtidos a partir de exemplares do filo Actinobacteria. Pesquisas recentes têm levado ao isolamento de novos Actinomicetos a partir de diferentes ambientes marinhos. Estes produzem diferentes tipos de novos metabólitos secundários, sendo que muitos deles possuem atividades biológicas e têm potencial para levarem ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Actinomicetos marinhos são, portanto, uma fonte abundante e ainda pouco explorada para a descoberta de metabólitos secundários de interesse terapêutico (Lam, 2006). Aqui foram considerados potencialmente ativos os extratos produzidos a partir de colônias dos gêneros *Micrococcus* (B232 – 99%), *Williansia* (B137 – 91%), *Gordonia* (B204 - 99,9%), *Janibacter* (B255 75:25 – 93%), *Brachybacterium* (373 – 86%) e *Nocardioides* (B177 – 81%). Destes, as melhores atividades foram de amostras obtidas dos gêneros *Micrococcus* (99%) e *Gordonia* (99,9%). Esses micro-organismos foram, ainda, pouco explorados quanto às suas atividades biológicas.

Para todos esses extratos, foi determinado o valor referente à CMNT. Os valores de CMNT representam as concentrações máximas em que os extratos podem ser utilizados sem causar danos à viabilidade das células em questão. Esta etapa é fundamental, pois os vírus utilizam a maquinaria celular para replicar-se. Deve-se, portanto, garantir que eles encontrem nas células as condições apropriadas para a sua multiplicação (Putnam *et al.*, 2002). Os compostos, então, devem ser tóxicos para os vírus sem interferir na fisiologia celular.

Dentre os extratos brutos, o 555, o B137, o B616, os BA07ES-60 e 75 foram os que apresentaram maiores valores de CMNT. Portanto, esses extratos não apresentaram toxicidade mesmo quando utilizados em altas concentrações. Já as frações e a substância isolada apresentaram os valores mais baixos de CMNT, devido à maior concentração das substâncias ativas nessas amostras, visto que nos extratos brutos existe uma grande diversidade de substâncias compondo a amostra.

A partir dos valores de CC_{50} e IC_{50} foi calculado o Índice de Seletividade para cada amostra. Como um extrato é considerado viável se apresentar IS maior ou igual a 4, dos 20 extratos listados apenas 3 não apresentam essa característica, o que representa 15% deles. Foram eles os extratos B232, BA07ES-58 e B177. Porém, por tratarem-se de extratos brutos, eles não foram descartados, pois após o fracionamento e isolamento das substâncias ativas, esse valor pode mudar, uma vez que substâncias tóxicas podem ser eliminadas durante esses processos.

Foram também realizados ensaios preliminares referentes ao mecanismo de ação dos diversos extratos frente ao BVDV. Esses ensaios indicam em qual fase o extrato apresenta atividade frente ao vírus, seja atuando diretamente na partícula viral, durante a adsorção, penetração ou nas etapas intracelulares do ciclo replicativo.

A maioria dos extratos apresentou atividade nos ensaios de pré-tratamento, sendo que seis deles atuaram durante a adsorção viral, quatro durante a penetração e para 1 deles (F1-5) não foi possível diferenciar a fase de ação entre adsorção e penetração.

Ao impedir a adsorção ou a penetração do BVDV, o extrato é capaz de impedir todo o ciclo replicativo do vírus, já que se tratam de etapas iniciais, sem as quais a partícula viral não é capaz de replicar no interior da célula e produzir novas partículas virais. Isso garante a eficácia de um tratamento, já que para infectar novas células, partículas virais são continuamente liberadas após a infecção. As substâncias ativas, portanto, são capazes de intervir na progressão da infecção.

Sete extratos foram capazes de atuar durante as etapas intracelulares do ciclo replicativo do BVDV. Podem, portanto, ter interferido no desencapsulamento do nucleocapsídeo, na tradução do RNA, ou nas diversas etapas envolvidas na formação de novas partículas virais. Ao atuar nas diversas etapas intracelulares do ciclo replicativo, as substâncias ativas são capazes de impedir a progressão da infecção.

Um extrato e uma substância testados foram capazes de agir diretamente sobre a partícula viral, impedindo assim a adsorção, penetração e produção de novas

partículas virais. Caso essas substâncias ativas sejam capazes de se manter biodisponíveis na corrente sanguínea por um tempo adequado, são também capazes de impedir a progressão da infecção, já que podem inviabilizar as partículas virais liberadas, e estas não serão mais capazes de adsorver, penetrar na célula e replicar-se.

Nessa fase da pesquisa, os extratos foram testados em suas concentrações máximas não tóxicas, e a partir dos títulos encontrados, foram determinados os índices de inibição viral e as porcentagens de inibição. A porcentagem de inibição mostrou valores diferentes da porcentagem de proteção apresentada nos ensaios iniciais. Isso ocorreu devido ao uso de concentrações diferentes nos dois ensaios, bem como pelo uso de metodologias diferentes a fim de garantir os objetivos de cada fase da pesquisa.

A partir desses valores de porcentagem de inibição obtidos nos ensaios de mecanismo de ação, os extratos foram classificados em ativos ou promissores, já que para serem considerados ativos, devem apresentar índice de inibição viral maior ou igual a 1,75 e porcentagem de inibição maior ou igual a 98%.

De todos os extratos testados, os que apresentaram porcentagem de inibição a partir de 98% foram 584, 555, BA07ES-56 e BA07ES-59, o que corresponde a 20% dos extratos considerados inicialmente como potencialmente ativos. Esses extratos apresentaram, também, índice de seletividade maior que 4, o que permite classificá-los como ativos. Portanto, foram esses os melhores resultados.

Os extratos 555 e 584 foram obtidos a partir de cultura de *Bacillus* sp. isolados da esponja *Petromica citrina*. Embora o gênero *Bacillus* seja considerado tipicamente

terrestre, membros deste gênero têm sido constantemente isolados de ambiente marinho (Sfanos *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2008, Santos *et al.*, 2010). Nesse ambiente, os membros desse gênero, que são conhecidos pela produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas, antifúngicas ou citotóxicas, foram isolados de invertebrados e apresentam um elevado potencial na busca de novas substâncias antimicrobianas (Muscholl-Silberhorn *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010).

Diversas atividades já foram descritas em relação ao gênero *Bacillus* sp., como a produção de diversos antibióticos caracterizados como dipeptídeos ou peptídeos cíclicos com baixo peso molecular (Melo, 2005), sendo que peptídeos cíclicos como as gramicidinas S, tirocidinas e bacitracinas, e lipopeptídeos como as iturinas, bacilomicinas e fengicinas são metabólitos secundários isolados característicos de bactérias do gênero *Bacillus* (Lisbôa, 2006). Além disso, já foram caracterizados como produtores de antibióticos contra fungos e bactérias patogênicas (Loeffler *et al.*, 1986; Krebs, 1998). Estudos mostram que as bactérias do gênero *Bacillus* podem dedicar mais de 3% do seu genoma a genes relacionados à biossíntese de metabólitos secundários, como policetídeo sintases e peptídeo sintases não ribossomais (Donadio *et al.*, 2007). Portanto, esse gênero representa uma rica fonte de substâncias bioativas que, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, podem levar ao desenvolvimento de uma nova opção de tratamento contra infecções pelo HCV.

O extrato BA07ES-56 foi preparado a partir da esponja *Hyrtios* sp. Estudos anteriores realizados com essa esponja revelaram algumas atividades como propriedades antibióticas de seus metabólitos secundários (Mollica *et al.*, 2012), e

também sua capacidade de inibição da ação do veneno de abelha, além de ação antioxidante com capacidade de absorção do oxigênio livre (Longeon *et al.*, 2011).

O extrato BA07ES-59 foi obtido a partir da esponja *Aaptos* sp. Esse gênero já teve atividades descritas como atividade anti-amebiana (Nakisah *et al.*, 2012), presença de alcalóides capazes de induzir apoptose em células leucêmicas humanas (Shubina *et al.*, 2010), e efeito antiproliferativo sobre Leucemia mielóide crônica humana (Jin *et al.*, 2011).

Esses extratos, portanto, representam uma importante fonte para o desenvolvimento de fármacos, já que além das atividades anteriormente descritas, mostraram aqui uma grande capacidade em inibir a ação do BVDV e, a partir disso, infere-se com base em pesquisas anteriores que sejam capazes também de inibir a ação do HCV, o que poderá ser comprovado através de ensaios específicos para esse vírus. Novos estudos são necessários para levar às substâncias ativas presentes em cada um desses extratos e para identificar detalhadamente as vias de atuação dos mesmos. Os demais extratos considerados promissores devem passar também pelos processos de fracionamento e isolamento de substâncias para que seja verificada a possível potencialização dessa atividade. Todos eles mostraram aqui seu potencial para levar ao desenvolvimento de uma terapia alternativa para o tratamento de uma infecção tão importante em todo o mundo.

8. CONCLUSÃO

A partir de invertebrados marinhos e micro-organismos associados a eles, foram produzidos extratos contendo compostos capazes de inibir a ação do BVDV, modelo para o HCV. Dos 422 testados, 20 foram selecionados, sendo que destes, 20% foram considerados ativos e 80% promissores.

A maioria (85%) dos extratos promissores e ativos apresentou um índice de seletividade maior que quatro, o que determina sua viabilidade para a continuidade dos experimentos.

Esses extratos foram capazes de atuar nas diversas etapas envolvidas na replicação viral, sendo que 55% foram ativos nos ensaios de pré-tratamento, 35% foram ativos nos ensaios de pós-tratamento e 10% foram ativos através da inativação da partícula viral. Desse modo, de diversas formas, mostraram-se capazes de inibir a progressão da infecção.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L. 1992. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55(12): 1732-40.
- Baginski, S.G.; Pevear, D.C.; Seipel, M.; Sun, S.C.; Benetatos, C.A.; Chunduru, S.K.; Rice, C.M.; Collett, M.S. 2000. Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 7981-7986.
- Baigent, S.J., Goodbourn, S., McCauley, J.W., 2004. Differential activation of interferon regulatory factors-3 and -7 by noncytopathogenic and cytopathogenic bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 100: 135–144.
- Bartenschlager, R.; Lohmann, V. 2001. Novel cell culture systems for the hepatitis C virus. *Antiviral Research.* 52: 1–17.
- Barnes E, Folgori A, Capone S, Swadling L, Aston S, Kurioka A, Meyer J, Huddart R, Smith K, Townsend R, Brown A, Antrobus R, Ammendola V, Naddeo M, O'Hara G, Willberg C, Harrison A, Grazioli F, Esposito ML, Siani L, Traboni C, Oo Y, Adams D, Hill A, Colloca S, Nicosia A, Cortese R, Klenerman P. 2012. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci Transl Med.* 4(115):115ra1. doi: 10.1126/scitranslmed.3003155.
- Bérdy, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View. *J. Antibiot.* 58(1):1–26.

- Berlinck, R. G. S.; Hajdu, E.; Rocha, R. M.; Oliveira, J. H. H. L.; Hernandez, I. L. C.; Selegim, M. H. R.; Granato, A. C.; Almeida, E. V. R.; Nunez, C. V.; Muricy, G.; Peixinho, S.; Pessoa, C; Moraes, M. O.; Cavalcanti, B. C.; Nascimento, G. G. F.; Thiemann, O.; Silva, M.; Souza, A. O.; Silva, C. L.; Minarini, P. R. R. 2004. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. *J. Nat. Prod.* 67: 510-522.
- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G. 2006. Marine natural products. *Natural Product Reports.* 23: 26-78.
- Buckwold^a, V.E.; Beer, B.E.; Donis, R.O. 2003. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral research.* 60: 1-15.
- Buckwold^b, V.E.; Wei, J.; Wenzel-Mathers, M.; Russell, J. 2003. Synergistic in vitro interactions between alpha interferon and ribavirin against bovine viral diarrhea virus and yellow fever virus as surrogate models of hepatitis C virus replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 47: 2293-2298.
- Charleston, B., Fray, M.D., Baigent, S., Carr, B.V., Morrison, W.I., 2001. Establishment of persistent infection with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus in cattle is associated with a failure to induce type I interferon. *J. Gen. Virol.* 82: 1893–1897.
- Coen D.M. & Richman D.D. 2007. Antiviral agents, p.447-485. In: Knipe D.M. & Howley P.M. (Eds), *Fields Virology*. 5th ed. Williams and Wilkins, Philadelphia.

- Cos, P.; Vlietinck, A.J.; Berghe, D.V. E.; Maes, L. 2006. Antiinfective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(3): 290-302.
- Costa-Lotufo, L.V.; Wilke, D.V.; Jimenez, P.C.; Epifanio, R.A. 2009. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico& perspectivas. *Quim. Nova*. 32(3): 703-716.
- Cruz-Barraza, J.A.; Carballo, J.L.; Rocha-Olivares, A.; Ehrlich³, H.; Hog, M. 2012. Integrative Taxonomy and Molecular Phylogeny of Genus *Aplysina* (Demospongiae: Verongida) from Mexican Pacific. *PLoS ONE* 7(8): e42049.
- Custódio, M.R.; Hadju, E.; Muricy, G. *Agelas dispar* Duchassaing & Michelotti, 1864. Porifera Brasil. Disponível em: <<http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/4especies/ceractinomorpha/agelasida/adispar/adispar.htm>>. Acesso em: 28 dez 2012.
- Da Silva, A. C.; Kratz, J. M.; Farias, F. M.; Henriques, A. T.; Dos Santos, J.; Leonel, R. M.; Lerner, C.; Mothes, B.; Barardi, C. R. M.; Simões, C. M. O. 2006. In vitro antiviral activity of marine sponges collected off brazilian coast. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(1): 135-140.
- De Medeiros AI, Gandolfi RC, Secatto A, Falcucci RM, Faccioli LH, Hajdu E, Peixinho S, Berlinck RG. 2012. 11-Oxo-aerothionin isolated from the marine sponge *Aplysina fistularis* shows anti-inflammatory activity in LPS-stimulated macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 34(6):919-24.

- Dezengrini R, Weiss M, Torres FD, Oliveira MS, Furian F, Mello CF, *et al.* 2009. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. *J Neurovirol* 15: 153-163.
- Donadio, S.; Monciardini, P.; Sosio, M. 2007. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat Prod Rep*, 24:1073-109.
- Gerlier, D.; Thomasset, N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods*. 94: 57-63.
- Grassmann, C.W.; Yu, H.; Isken, O.; Behrens, S-E. 2005. Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: Implications for the viral life cycle. *Virology*. 333: 349-366.
- Haefner, B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*. 8:536-544.
- Imhoff, J.F., Stohr, R. 2003. Sponge-associated bacteria: general overview, special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. *Prog Mol Subcell Biol*. 37: 35–57.
- Jin, M.; Zhao, W.; Zhang, Y.; Kobayashi, M.; Duan, H.; Kong, D. 2011. Antiproliferative Effect of Aaptamine on Human Chronic Myeloid Leukemia K562 Cells. *Int. J. Mol. Sci*. 12: 7352-7359.

- Kossuga, M.H.; Lira, S.P.; Nascimento, A.M. *et al.* 2007. ISOLAMENTO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PRODUTOS NATURAIS DAS ESPONJAS *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* E *Topsentia ophiraphidites*, DA ASCÍDIA *Didemnum ligulum* E DO OCTOCORAL *Carijoa riisei*. *Quim. Nova.* 30(5): 1194-1202.
- Krebs, B. *et al.* 1998. Use of *Bacillus subtilis* as biological control agente. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Disease and Protection*, 105: 18-87.
- Lam, K.S. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current opinion on microbiology.* 9(3): 245-251.
- Leyssen, P.; De Clercq, E.; Neyts, J. 2000. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. *Clinical microbiology reviews.* 13(1): 67-82.
- Li, H.; Stoddard, M.B.; Wang, S.; Blair, L.M.; Giorgi, E.E. *et al.* 2012. Elucidation of Hepatitis C Virus Transmission and Early Diversification by Single Genome sequencing. *PLoS Pathog* 8(8): e1002880.
- Lisbôa, M.P. Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada de solo. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). UFRS, Porto Alegre, 2006.
- Loeffler, W. *et al.* 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3: a comparason with activities of other *Bacillus* antibióticas. *Journal of Phytopathology.* 115: 204-213.

- Longeon, A.; Copp, B.R.; Quévrain, E.; Roué, M.; Kientz, B.; Cresteil, T.; Petek, S.; Debitus, C.; Bourguet-Kondraci, M-L. 2011. Bioactive Indole Derivatives from the South Pacific Marine Sponges *Rhopaloeides odorabile* and *Hyrtilios* sp. *Mar. drugs*. 9: 879-888.
- Mantovani, C.K. Diversidade e atividade antimicrobiana de bactérias isoladas de esponjas marinhas. 2011. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- Marinho, P. R.; Muricy, G. R. S.; Silva, M. F. L.; de Marval, M. G.; Laport, M. S. 2010. Antibiotic-resistant bacteria inhibited by extracts and fractions from Brazilian marine sponges. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(2): 267-275.
- Martinot-Peignoux, M.; Boyer, N.; Pouteau, M.; Castelnaud, C.; Giuily, N.; Duchatelle, V.; Aupérin, A.; Degott, C.; Benhamou, J.P.; Erlinger, S. *et al.* 1998. Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 29:214–223.
- Melo, F.M.P. Atividade antifúngica de metabólitos secundários produzidos pelos endófitos da mandioca *Bacillus pumilus* MAIIIM4a. Dissertação (Mestrado). ESALQ – USP, Piracicaba, SP. 2005.
- Mollica, A.; Locatelli, M.; Stefanucci, A.; Pinnen, F. 2012. Synthesis and bioactivity of secondary metabolites from marine sponges containing dibrominated indolic systems. *Molecules*. 17(5):6083-99.

- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 65:55-63.
- Muscholl-Silberhorn, A.; Thiel, V.; Imhoff, J. F. 2008. Abundance and Bioactivity of Cultured Sponge-Associated Bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology*. 55:94–106.
- Nakisah, M.A.; Ida Muryany, M.Y.; Fatimah, H.; Nor Fadilah, R.; Zalilawati, M.R.; Khamsah, S.; Habsah, M. 2012. Anti-amoebic properties of a Malaysian marine sponge *Aaptos* sp. on *Acanthamoeba castellanii*. *World J Microbiol Biotechnol*. 28(3):1237-44.
- Núñez-Pons, L.; Carbone, M.; Vázquez, J.; Rodríguez, J.; Nieto, R.M.; Varela, M.M.; Gavagnin, M.; Avila, C. 2012. Natural Products from Antarctic Colonial Ascidians of the Genera *Aplidium* and *Synoicum*: Variability and Defensive Role. *Mar. Drugs*. 10: 1741-1764.
- Parker, W.B. 2005. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res*. 107(2):165-71.
- Peters, M. 1996. Actions of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology*. 23(4):909-16.
- Putnam, K.P.; Bombick, D.W.; Doolittle, D.J. 2002. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology In Vitro*. 16: 599-607.

- Ravikumar, Y.S.; Upasana Ray; Nandhitha, M.; Perween, A.; Naika, H.R. 2011. Inhibition of hepatitis C virus replication by herbal extract: *Phyllanthus amarus* as a potent natural source. *Virus research*. 158: 89-97.
- Reed, L.J., Münch, H.A. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27: 493–497.
- Ridhpath, J.F.; Flores, E.F. Flaviviridae. In: Eduardo Furtado Flores (org). *Virologia Veterinária*. Santa Maria: UFSM, 2007. p.565-591.
- Sako, K.; Aoyama, H.; Sato, S.; Hashimoto, Y.; Baba, M. 2008. γ -Carboline derivatives with anti-bovine viral diarrhoea virus (BVDV) activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 16: 3780-3790.
- Santos, O. C. S.; Pontes, P. V. M. L.; Santos, J. F. M.; Muricy, G.; Giambiagi-deMarval, M.; Laport, M. S. 2010. Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil. *Research in Microbiology*. 161: 604-612.
- Sfanos, K.; Harmody, D.; Dang, P.; Ledger, A.; Pomponi, S.; McCarthy, P.; Lopez, J. 2005. A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates. *Systematic , Applied Microbiology*. 28: 242–264.
- Shubina, L.K.; Makarieva, T.N.; Dyshlovoy, S.A.; Fedorov, S.N.; Dmitrenok, P.S.; Stonik, V.A. 2010. Three new aaptamines from the marine sponge *Aaptos* sp. and their proapoptotic properties. *Nat Prod Commun*. 5(12):1881-4.

- Sipkema, D., Osinga, R., Schatton, W., Mendola, D., Tramper, J., Wijffels, R. H. 2005. Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: sea, cell, or synthesis? *Biotech Bioeng.* 90: 201–221.
- Souvignet, C.; Lejeune, O.; Trepo, C. 2007. Interferon-based treatment of chronic hepatitis C. *Biochimie.* 89(6-7):894-8.
- Strader, D.B.; Wright, T.; Thomas, D.L.; Seeff, L.B. 2004. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology.* 39: 1147-1171.
- Suzuki, T.; Ishii, K.; Aizaki, H.; Wakita, T. 2007. Hepatitis C viral life cycle. *Advanced drug delivery reviews.* 59: 1200-1212.
- Takeuchi, H.; Baba, M.; Shigeta, S. 1991. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *Journal of virological methods.* 33: 61-71.
- Tezcan, O.D.; Sarp, S. 2013. An unusual marine envenomation following a rope contact: A report on nine cases of dermatitis caused by *Pennaria disticha*. *Toxicon.* 61:125-8.
- Vicente, M.F.; Cabello, A.; Platas, G.; Basilio, A.; Díez, M.T.; Dreikorn, S.; Giacobbe, R.A.; Onishi, J.C.; Meinz, M.; Kurtz, M.B.; Rosenbach M.; Thompson, J.; Abruzzo, G.; Flattery, A.; Kong, L.; Tsiouras, A.; Wilson, K.E.; Peláez, F. 2001. Antimicrobial activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. *J Appl Microbiol.* 91(5):806-13.

- Yanagida, K.; Baba, C.; Baba, M. 2004. Inhibition of bovine viral diarrhea virus (BVDV) by mizoribine: synergistic effect of combination with interferon- α . *Antiviral research*. 64: 195-201.
- Yasuhara-Bell, J.; Yang, Y.; Barlow, R.; Trapido-Rosental, H.; Lu, Y. 2010. *In vitro* evaluation of marine-microorganism extracts for antiviral-activity. *Virology Journal*. 7:182.
- Zhang, H.; Zhang, W.; Jin, Y.; Jin, M.; Yu, X. 2008. A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93:241–248.
- Zitzmann, N.; Mehta, A.S.; Carrouee, S.; Butters, T.D.; Platt, F.M.; McCauley, J.; Blumberg, B.S.; Dwek, R.A.; Block, T.M. 1999. Imino sugars inhibit the formation and secretion of bovine viral diarrhea virus, a Pestivirus model of hepatitis C virus: implications for the development of broad spectrum anti-hepatitis virus agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (21): 11878– 11882.