

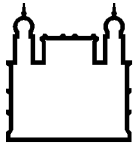
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DA AÇÃO DO COMPOSTO AGATISFLAVONA, UM
FLAVONOIDE DERIVADO DE *ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*,
SOBRE A REPLICAÇÃO DO VÍRUS INFLUENZA

CAROLINE SOUZA DE FREITAS

Rio de Janeiro
Novembro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CAROLINE SOUZA DE FREITAS

Estudo da ação do composto Agatisflavona, um flavonoide derivado de *Anacardium occidentale L.*, sobre a replicação do vírus influenza

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza

RIO DE JANEIRO
Novembro de 2018

Souza de Freitas, Caroline.

Estudo da ação do composto Agatisflavona, um flavonoide derivado de *Anacardium occidentale L.*, sobre a replicação do vírus influenza / Caroline Souza de Freitas. - Rio de Janeiro, 2018.

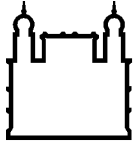
73 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Thiago Moreno Lopes e Souza.

Bibliografia: f. 51-59

1. influenza. 2. antiviral. 3. inibidores de neuraminidase. 4. produtos naturais. 5. flavonoides. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: CAROLINE SOUZA DE FREITAS

**Estudo da ação do composto Agatisflavona, um flavonoide derivado de
Anacardium occidentale L., sobre a replicação do vírus influenza**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza

Aprovada em: 30/11/2018.

EXAMINADORES:

Prof^ª. Dra. Vanessa Salete de Paula - Presidente (FIOCRUZ)

Prof^ª. Dra. Livia Melo Villar (FIOCRUZ)

Prof. Dr. André Marco Oliveira Gomes (UFRJ)

Prof^ª. Dr. Carlos Frederico Leite Fontes (UFRJ)

Prof. Dra. Milene Dias Miranda (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 30 de novembro de 2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Thiago Moreno L. e Souza, pela confiança, oportunidade de ingressar no laboratório, pelos ensinamentos concedidos, e orientação que culminaram neste trabalho;

À Dra. Patrícia Torres Bozza e equipe do Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz, pelas trocas de conhecimento e contribuições para o trabalho;

À Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, coordenadores, funcionários e corpo docente por todo aprendizado e oportunidade de crescimento;

Às agências de fomento FAPERJ e CNPq pelo financiamento deste projeto;

Ao Dr. Marco Rocha e ao Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN5) (Farmanguinhos/Fiocruz) por nos ceder o composto que foi estudado neste trabalho;

Ao Instituto Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem, Colégio Estadual de Ensino Médio Manoel Antônio de Castro e à Secretaria Executiva Estadual de Educação (SEDUC) de Igarapé-Miri, PA, que estimularam o estudo de algumas plantas da flora brasileira em turmas de ensino médio e inspiraram este trabalho;

Ao grupo do Dr. Jerson L. Silva do Instituto de Bioquímica Médica e ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela colaboração;

À Dra. Cristiana Couto do Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo (LVRS/IOC) pela colaboração para a realização dos ensaios *in vivo*;

Aos meus pais que não mediram esforços para me ajudar, sempre me incentivando, se orgulhando das minhas conquistas, apoiando minhas decisões e torcendo para que o melhor ocorresse sempre. Agradeço pelo carinho, pelos conselhos, pelas inúmeras conversas e por tudo que fizeram (e fazem) para que eu realize meus sonhos;

Agradeço à minha irmã, Mariane, por sempre ficar feliz com as minhas conquistas, por acompanhar minha jornada dando-me muita força, ouvindo-me, apoiando, torcendo, sempre (ou quase) com muito carinho e paciência, obrigada por ser tão

amorosa comigo não só nos períodos de calma, como também nos mais desafiadores;

Aos meus avós, Aloysio, Amélia, Maria e João, por estarem sempre torcendo pelas minhas vitórias e por demonstrarem-se tão orgulhosos e ávidos por saber sobre a minha trajetória;

Aos familiares: tios e primos por todo apoio e torcida sempre. Aos tios e tias “emprestados” que também participaram deste trabalho sempre ficando felizes com cada passo desta jornada;

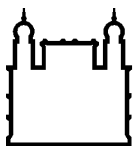
Às minhas grandes amigas, Jubs e Fê, presentes da Unirio, por estarem comigo em muitos momentos dando suporte, acreditando em mim, pelas conversas e risadas que, tenho certeza, foram instantes de leveza muito importantes para nos tirar da rotina;

Às amigas Larissa e Elizane por estarem tão presentes principalmente nos últimos meses/anos compartilhando inúmeros momentos de felicidade, angústia, dando conselhos, ouvindo, torcendo, sempre se interessando pelo meu trabalho e, mesmo que indiretamente, sendo muito importantes para que eu concluísse esse projeto;

Aos colegas de trabalho Natália e André por toda ajuda e parceria sempre. À Andressa, por ter sido minha “professora” no início, pelo auxílio sempre que possível, por tornar as “viagens” de Campo Grande para a Fiocruz mais leves, pelas conversas, por ser uma pessoa que me agrega tanto, pelo apoio desde o começo deste trabalho e pela amizade que mantemos. À Carol, pela co-orientação desde a minha entrada no laboratório, por toda a dedicação que teve comigo, sempre me ajudando, transmitindo conhecimento e muitas horas do seu tempo, possibilitando que este trabalho fosse realizado da melhor forma possível. À Natasha pelas incontáveis horas juntas no laboratório, por todo apoio, por (muitas) risadas, conversas, conselhos, apoio, encorajamento, por me passar tanto em tão pouco tempo, por estar sempre presente e por ter se tornado uma grande amiga.

E a todos que participaram direta ou indiretamente, e contribuíram para a realização deste trabalho.

“A Ciência e a vida cotidiana não podem e não devem viver separadas.” – Rosalind Franklin



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

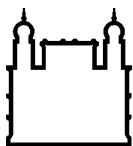
Estudo da ação do composto Agatisflavona, um flavonoide derivado de *Anacardium occidentale L.*, sobre a replicação do vírus influenza

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Caroline Souza de Freitas

Infecções causadas pelos vírus influenza estão associadas com um alto grau de morbidade, que pode levar a óbito. Devido à alta variabilidade genética desses vírus, a produção de uma vacina que seja efetiva contra todas as cepas circulantes é dificultada, sendo assim o tratamento e, em alguns casos, profilaxia são realizados através do uso de antivirais. Os inibidores de neuraminidase constituem a única classe de antivirais aprovada para utilização pelo FDA, contudo, cerca de 1-3% das cepas circulantes no mundo, atualmente, apresentam mutação de resistência ao medicamento mais usado na clínica, o oseltamivir (OST), o que torna necessária a busca por outras moléculas que inibam essas cepas. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade e mecanismo de inibição do vírus influenza, da agatisflavona, um flavonoide derivado de *Anacardium occidentale L.* (cajueiro). Através de ensaios de viabilidade celular, observamos que o nosso composto apresentou um CC_{50} de 349 μM , sendo considerado pouco citotóxico. Ensaios de inibição da replicação *in vitro* possibilitaram o cálculo do EC_{50} (1,3 μM) e do índice de seletividade (205.3), assim, concluímos que o nosso composto é seguro para utilização *in vitro* devido à margem entre os valores de CC_{50} e EC_{50} . Avaliamos a capacidade de inibição da atividade da neuraminidase (NA) e verificamos que a nossa molécula inibe cepas sensíveis e resistentes ao OST, o que motivou o aprofundamento no estudo da mesma. Através de ensaio *in silico* constatamos que a agatisflavona não se liga no mesmo sítio da NA que o OST, além de realizar essa ligação com certa espontaneidade e estabelecendo diversos tipos de interações com os resíduos de aminoácidos das isoformas de NA testadas. Por fim, após passagens sequenciais do vírus na presença da molécula, observamos na cepa gerada algumas mutações de resistência à agatisflavona, contudo estas parecem ser reversíveis. Nosso composto também foi capaz de diminuir os efeitos da infecção *in vivo*. Esses dados sugerem que a molécula apresenta uma estrutura promissora para o desenvolvimento de um possível antiviral.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Study of the action of the compound Agathisflavone, a flavonoid derivative of *Anacardium occidentale* L., over the influenza virus replication

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Caroline Souza de Freitas

Infections caused by influenza viruses are associated with a high degree of morbidity, which can lead to death. Due to the high genetic variability of these viruses, the production of a vaccine that is effective against all circulating strains is difficult, so the treatment and, in some cases, prophylaxis are performed using antivirals. Neuraminidase inhibitors are the only class of antivirals approved for use by the FDA, however, approximately 1-3% of circulating strains worldwide currently have resistance mutations to the most commonly used drug in the clinic, oseltamivir (OST), which makes it necessary to search for other molecules that inhibit these strains. Therefore, this dissertation aimed to evaluate the capacity and mechanism of inhibition of the influenza virus, agathisflavone, a flavonoid derived from *Anacardium occidentale* L. (cashew tree). Through cell viability assays, we found that our compound had a CC_{50} of 349 μ M and was not considered cytotoxic. In vitro replication inhibition assays enabled the calculation of EC_{50} (1.3 μ M) and selectivity index (205.3), thus, we concluded that our compound is safe for in vitro use because of the margin between the CC_{50} and EC_{50} values. We evaluated the inhibition capacity of neuraminidase (NA) activity and verified that our molecule inhibits sensitive and resistant strains to OST, which motivated the deepening in the study of agathisflavone. An in silico assay showed that agathisflavone does not bind to the same site of NA as the OST, in addition to making this binding with a certain spontaneity and establishing several types of interactions with the amino acid residues of the NA isoforms tested. Finally, after sequential passages of the virus with addition of our compound, we observed in the generated strain some mutations of resistance to agathisflavone, however these appear to be reversible. In addition, our compound was able to diminish the effects of infection in vivo. These data suggest that the molecule has a promising structure for the development of a possible antiviral.

ÍNDICE

| | |
|---|-------------|
| RESUMO | VII |
| ABSTRACT | VIII |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 O vírus Influenza – Características Estruturais | 1 |
| 1.1.1 Hemaglutinina e Neuraminidase | 2 |
| 1.2 Ciclo Replicativo | 5 |
| 1.2.1 “Drift” e “Shift” Antigênicos | 8 |
| 1.3 A Patologia dos Vírus Influenza | 9 |
| 1.4 O vírus Influenza – Histórico | 12 |
| 1.5 Epidemiologia | 14 |
| 1.6 Tratamento e prevenção das infecções causadas pelo vírus Influenza | 15 |
| 1.6.1 Vacinas | 15 |
| 1.6.2 Antivirais | 16 |
| 1.7 Produtos Naturais e Atividade Biológica | 19 |
| 1.7.1 Flavonoides | 20 |
| 1.8 Justificativa | 23 |
| 2 OBJETIVOS | 25 |
| 2.1 Objetivo Geral | 25 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 25 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 26 |
| 3.1 Células, vírus e compostos utilizados | 26 |
| 3.1.1 Células | 26 |
| 3.1.2 Vírus | 26 |
| 3.1.3 Compostos | 26 |
| 3.2 Ensaio de inibição da atividade da neuraminidase (NAI) | 27 |
| 3.3 Determinação da Viabilidade Celular | 28 |
| 3.4 Ensaio de Inibição da Replicação Viral (Yield Reduction Assay – YRA) | 29 |
| 3.5 Ensaio Sinérgico | 30 |
| 3.6 Determinação de possíveis mutações de resistência | 30 |

| | | |
|-------|---|-----------|
| 3.6.1 | Síntese de cDNA | 31 |
| 3.6.2 | PCR para amplificação dos genes da NA..... | 32 |
| 3.7 | Ensaio <i>in silico</i> | 34 |
| 3.8 | Ensaio de avaliação do efeito da agatisflavona <i>in vivo</i> | 34 |
| 4 | RESULTADOS | 36 |
| 4.1 | Efeito da Agatisflavona sobre a atividade da NA | 36 |
| 4.2 | “Docking” <i>in silico</i> em diferentes tipos de NA | 37 |
| 4.3 | Efeito Inibitório <i>in vitro</i>, Citotoxicidade e Índice de Seletividade (SI) da Agatisflavona | 41 |
| 4.4 | Efeito do tratamento combinado de Agatisflavona e OST <i>in vitro</i> | 42 |
| 4.5 | Efeito de passagens sequenciais do vírus e tratamento com Agatisflavona em possíveis mutações de resistência | 43 |
| 4.6 | Impacto do tratamento com Agatisflavona <i>in vivo</i> | 44 |
| 5 | DISCUSSÃO | 46 |
| 6 | CONCLUSÕES | 50 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Esquema representativo do vírus influenza A..... | 2 |
| Figura 2 - Estrutura do trímero da HA (subtipo H1) | 3 |
| Figura 3 - Estrutura do tetrâmero que constitui a NA | 4 |
| Figura 4 - Esquema representativo do ciclo replicativo do vírus influenza..... | 7 |
| Figura 5 - Esquema representativo de "drift" e "shift" antigênicos. | 9 |
| Figura 6 - Cartaz do Ministério da Saúde sobre SRAG, SG e como o tratamento deve ser realizado. | 11 |
| Figura 7 - Histórico de pandemias do vírus influenza A..... | 13 |
| Figura 8 - Estrutura das Adamantanas..... | 16 |
| Figura 9 - Estrutura química do OST | 18 |
| Figura 10 - Estrutura Básica dos Flavonóides..... | 20 |
| Figura 11 - Estrutura base dos biflavonoides..... | 22 |
| Figura 12 - Estrutura química da Agatisflavona | 22 |
| Figura 13 - "Docking" <i>in silico</i> da Agatisflavona em diferentes tipos de NA..... | 38 |
| Figura 14 – Tratamento combinado de agatisflavona com o composto de referência OST..... | 42 |
| Figura 15 - Porcentagem de replicação viral em cada passagem sequencial do vírus na presença da agatisflavona..... | 44 |
| Figura 16 – Efeito do tratamento com Agatisflavona <i>in vivo</i> | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Reagentes para a síntese de cDNA | 32 |
| Tabela 2 - Reagentes para amplificação dos genes HA e NA..... | 33 |
| Tabela 3 - Relação dos iniciadores utilizados para amplificação dos genes da NA | 33 |
| Tabela 4 - Porcentagem de Inibição da atividade da NA dos vírus influenza A/H3N2, A/H1N1 e B após tratamento com Agatisflavona e OST | 36 |
| Tabela 5 - Potência de Inibição da atividade da NA (IC ₅₀) da Agatisflavona e do OST em cepas selvagens e com mutações de resistência ao OST | 37 |
| Tabela 6 - Análise do ensaio <i>in silico</i> (energia de ligação, ligações de H e resíduos de aminoácidos nessas ligações)..... | 40 |
| Tabela 7 – Potência <i>in vitro</i> , citotoxicidade e Índice de Seletividade da Agatisflavona e do OST | 41 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA – Albumina de soro bovino

CC₅₀ – Concentração da droga que mantém 50% das células viáveis

CPE – Efeito citopático

cRNA – Cópia complementar de RNA

DMEM – Meio Dulbecco mínimo essencial

EC₅₀ – Concentração da droga capaz de inibir 50% da replicação viral em células

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

HA – Hemaglutinina

IC₅₀ – Concentração da droga capaz de inibir 50% da atividade da neuraminidase viral

M1 – Proteína de matriz do vírus influenza

M2 – Canal iônico do vírus influenza

MDCK - Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cell (Célula epitelial de rim canino)

MOI – Multiplicidade de infecção

NA – Neuraminidase

NAI – Inibidores de neuraminidase

NEP/NS2 – Proteína de exportação nuclear/proteína não estrutural 2

NP – Nucleoproteína viral

OMS – Organização Mundial da Saúde

OST - Oseltamivir

PB – Polimerase Básica

PBS – Tampão salino fosfato

PDB – Protein Data Bank

URF – Unidades relativas de fluorescência

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

RNA_v – RNA viral

RNP – Ribonucleoproteína

rpm – Rotações por minuto

SFB – Soro fetal bovino

TCID₅₀ – Dose infectiva para 50% do tecido em cultura

TGF- β - Fator de transformação do crescimento β

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus Influenza – Características Estruturais

O vírus Influenza pertence à família *Orthomyxoviridae*, que é constituída pelos gêneros *Influenza virus A*, *Influenza virus B*, *Influenza virus C*, *Thogovirus*, *Isavirus* e, o recentemente identificado, *Influenza D* (1, 2). Contudo, o gênero A é o mais relevante para humanos, levando-se em consideração a sua epidemiologia (2). Os diferentes gêneros de influenza são distinguidos a partir das suas particularidades antigênicas, sua matriz proteica e proteínas nucleicas, além dos tipos de glicoproteínas de superfície que os compõem (3).

Os vírions da família *Orthomyxoviridae* apresentam, no geral, estrutura esférica com diâmetro entre 100 e 200 nm, porém já foi descrito que cepas produzidas em laboratório chegaram a 1000 nm (2). São vírus que exibem envelope lipídico e material genético composto por RNA segmentado, fita simples e com polaridade negativa. Nos gêneros A e B os oito fragmentos de RNA codificam para a transcrição de 10 proteínas virais essenciais, bem como diversas outras proteínas acessórias (1). Já os gêneros C e D exibem RNA segmentado em apenas sete fragmentos (1, 4). Esses segmentos contêm os genes: hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA), polimerase básica (PB) 1, PB2, PB2-S1, PA-X, PA-N155, PA-N182, M42 e NS3 (3), e em associação com nucleoproteínas (NP), formam os complexos denominados ribonucleoproteínas (RNP) (2).

Esses vírus têm duas glicoproteínas ancoradas na sua superfície: a HA e a NA. Além delas, também podem ser encontradas no envelope as proteínas M2, as quais formam canais iônicos nas partículas virais (figura 1). A matriz proteica do vírus é composta pela M1, que encontra-se por baixo do envelope lipídico e é determinante para a ligação das RNPs (2).

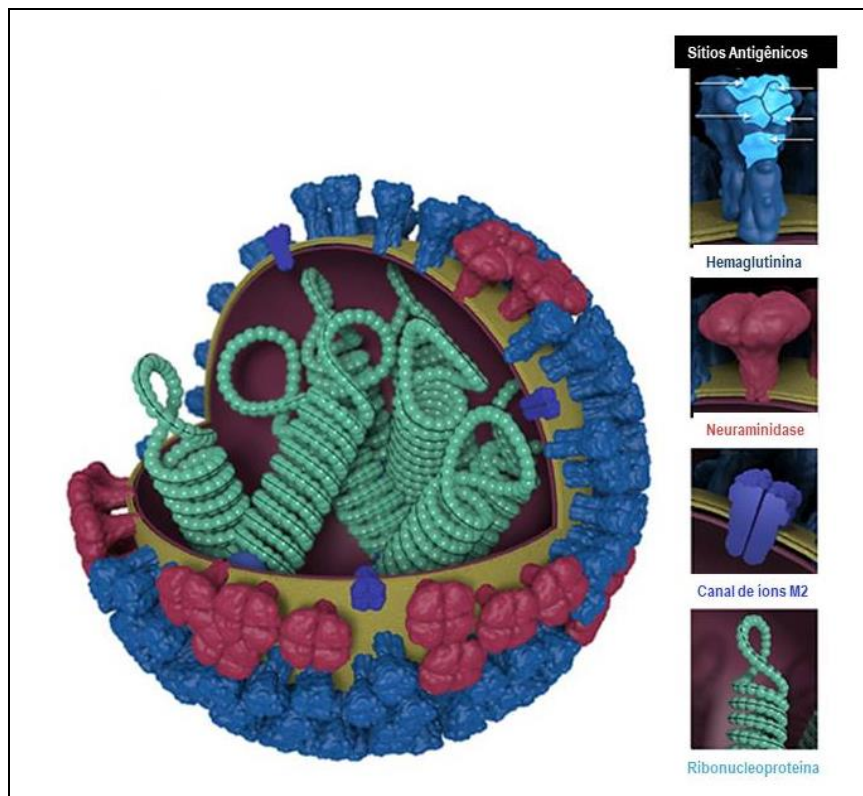


Figura 1 - Esquema representativo do vírus influenza A.

O vírus Influenza A apresenta um envelope lipídico no qual estão inseridas duas glicoproteínas de superfície: NA e HA, além do canal de íons M2. Seu genoma é constituído por um complexo formado com as nucleoproteínas e o RNAv, esse complexo é denominado ribonucleoproteína. Fonte: Adaptado de CDC (2014), disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/images/virus/fluvirus-antigenic-characterization-medium.jpg> (5).

As glicoproteínas de superfície são de extrema importância para a replicação do vírus e, também, é através das diferentes classificações que podem apresentar que o gênero A é dividido em subtipos. Já foram identificados 11 subtipos de NA e 18 de HA (6).

1.1.1 Hemaglutinina e Neuraminidase

A glicoproteína de membrana hemaglutinina (HA) do vírus influenza é constituída por três subunidades iguais que são formadas por uma região distal (HA1) e uma região proximal (HA2) que é menor, essas estruturas são polipeptídeos unidos por ligações dissulfeto (7). Alguns anticorpos ligam-se na região distal ou próximo à mesma, sendo esta configurada como um sítio receptor-ligante (além de formar a “cabeça” globular da HA), enquanto a região proximal é imunogênica, sendo alvo de anticorpos neutralizantes que impedem a fusão de membranas, uma das atribuições dessa proteína (figura 2) (7, 8).

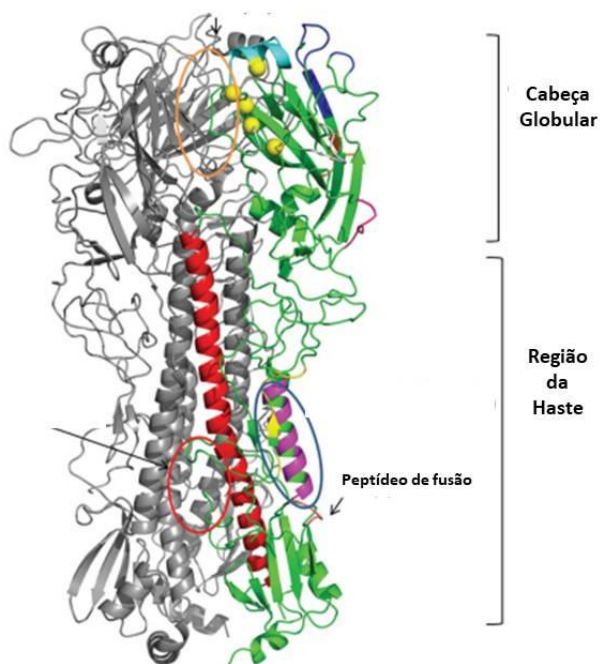


Figura 2 - Estrutura do trîmero da HA (subtipo H1)

O domínio receptor-ligante (esferas amarelas) e os sítios antigênicos (em azul claro, azul escuro, rosa e laranja) estão localizados na cabeça globular da HA. A região da haste é constituída por “loops” de alfa-hélice (em vermelho) e o peptídeo de fusão. O epítipo da região da haste que é receptor de anticorpos neutralizantes ao subtipo H1 está circulado em azul e o que é receptor de anticorpos neutralizantes aos subtipos H1 e H2 está circulado em vermelho. Número de acesso da estrutura retirada do PDB: 3LGZ. Fonte: Adaptado de Wong (2013) (8).

As HAs têm um importante papel no processo de fusão do vírus à célula hospedeira e também nas diferentes interações receptor-ligante (com antivirais ou anticorpos, por exemplo) (7, 9). Moléculas de ácido siálico de glicoproteínas e glicolípídios são os receptores celulares para adsorção dos vírus influenza. Esses vírus se ligam através da porção superior (que apresenta uma leve depressão) da HA, esta região é constituída por resíduos conservados em todos os subtipos de influenza, apesar das variações antigênicas sofridas pelos vírus (10). Outra área da HA também utilizada para mediação da entrada do vírus na célula hospedeira está localizada entre subunidades do trîmero da HA onde os domínios HA1 e HA2 estão muito próximos e sabe-se que, nesta região, ocorre uma dissociação quando a molécula muda sua conformação para que ocorra a fusão de membranas (durante o processo de entrada do vírus) (10).

A neuraminidase (NA) é constituída por um tetrâmero de quatro polipeptídeos iguais (figura 3), cada um deles apresenta aproximadamente 470 aminoácidos organizados em quatro domínios: uma sequência citoplasmática N-terminal, um

domínio transmembrana (ancorado à membrana) hidrofóbico e uma “cauda” fina com comprimento variável, terminando em uma “cabeça globular” que configura o sítio ativo da enzima e o quarto domínio (11).

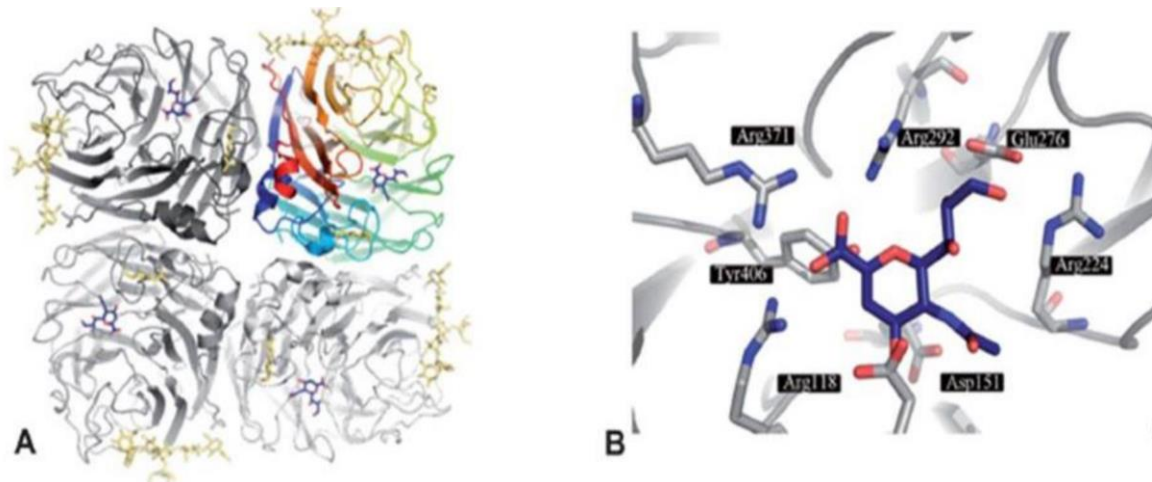


Figura 3 - Estrutura do tetrâmero que constitui a NA

a. Estrutura da NA como um tetrâmetro com o inibidor DANA (em azul) ligado ao sítio ativo dos quatro polipeptídeos. **b.** Sítio ativo da NA (subtipo N9) com o inibidor DANA acoplado. Número de acesso da estrutura retirada do PDB: 1F8B. Fonte: adaptado de Grienke (2012) (12).

As sequências de NA podem ser divididas, filogeneticamente, em dois grupos nos quais o grupo 1 inclui N1, N4, N5 e N8, e o grupo 2 engloba N2, N3, N7 e N9. Os tipos de NA, recentemente descritos, N10 e N11, os quais foram identificados em morcegos, aparentam estar mais afastados dos outros grupos por apresentarem funções distintas das atribuídas aos demais tipos de NA (13).

A NA é uma hidrolase de glicosídeo sendo, mais comumente, denominada como uma sialidase, graças à sua afinidade por moléculas de ácido siálico (12). A atividade “receptor-destruidora” do vírus influenza foi primeiramente observada por Hirst (14) e o resultado dessa atividade (que configura uma clivagem) foi identificado por Gottschalk (15) como um ácido N-acetilneuramínico, um tipo de ácido siálico, designando desta forma a enzima como uma NA (sialidase).

A NA é responsável por clivar resíduos de ácido siálico (α 2-6 e α 2-3) e, na maior parte dos subtipos de influenza, não participa do processo de entrada do vírus na célula hospedeira, mas sim na liberação das novas partículas virais (maduras) formadas, clivando os resíduos de ácido siálico presentes na superfície da célula (13). Assim, a NA possui um papel extremamente importante para a dispersão do vírus no tecido infectado e possibilita a transmissão do mesmo no decorrer da infecção (12). Estudos indicam que é possível que a NA seja determinante para

entrada do vírus na célula hospedeira no caso de morcegos, já que a HA não apresenta afinidade com receptores glicosilados (13).

A atividade enzimática da NA também apresenta uma função notória para facilitar a penetração do vírus no trato respiratório, uma vez que atua removendo receptores do glicocálix de células epiteliais, impedindo a formação de muco, que “prende” os vírus e impossibilita o acesso das partículas virais às outras regiões do epitélio (13). Por fim, a NA também exibe a capacidade de ativar o fator de transformação do crescimento β (TGF- β), que normalmente encontra-se em estado latente, desta forma, criando um estado “imunoprivilegiado” para propagação da infecção (13).

Levando em consideração os aspectos abordados, graças às atividades contrastantes da HA e da NA, é imprescindível o equilíbrio entre as funções das glicoproteínas de superfície viral para que a entrada e saída dos vírus ocorram de maneira efetiva (12). A NA com baixa atividade enzimática pode ter como consequência uma clivagem ineficiente de moléculas de ácido siálico e, posteriormente, um agrupamento de partículas virais e, por conseguinte, uma infecção com título viral reduzido, apesar do alto número de cópias genômicas virais. Por outro lado, uma afinidade de ligação baixa de HA associada a uma alta atividade de NA desequilibraria uma ligação efetiva dos vírus às células hospedeiras (16).

1.2 Ciclo Replicativo

Os vírus influenza utilizam glicoconjugados que possuem terminações compostas por resíduos de moléculas de ácido siálico presentes na membrana das células hospedeiras como receptores virais, sendo a HA, a glicoproteína viral responsável por essa interação (1, 2). Subsequentemente à adsorção do vírus à célula hospedeira, este é internalizado por endocitose, que pode ser clatrina-mediada ou através de macropinocitose. Já dentro da célula, o vírus é transportado para o endossoma, no qual o baixo pH interno ativa o canal de íons M2, provocando uma mudança conformacional na HA, tornando-a propensa à ação de digestão por protease (2). Essa ação de proteases ocasiona a exposição do peptídeo de fusão. A abertura do canal M2 também leva a uma acidificação no interior do vírion que leva à liberação das RNPs, dissociando-as da matriz M1, para o citoplasma da célula hospedeira (2, 17) (figura 4a).

A replicação do RNAv ocorre no núcleo da célula hospedeira (figura 4b), como as RNPs não possuem a capacidade de atravessar por meio de transporte passivo através dos poros nucleares, proteínas da família de importinas alfa são recrutadas. Essas importinas reconhecem sinais de localização nucleares nas RNPs e têm uma participação fundamental no processo de transporte do material genético viral para o núcleo (1). No interior do núcleo, a RNA polimerase viral é a responsável pela replicação e transcrição do RNAv, que é diretamente transcrito em mRNA e funciona como um modelo para uma cópia complementar (cRNA) que, por sua vez, é um modelo para o novo RNAv (17). Os cRNAs são produzidos por meio de um processo sem iniciadores que consiste na complementação de GTP ou ATP com a extremidade 3' do modelo de RNAv. A adição de nucleotídeos detém o modelo de RNAv no sítio ativo da RNA polimerase dentro da subunidade PB1 e, conseqüentemente, forma um dinucleotídeo A-G por intermédio do qual o cRNAv é alongado. Após retirar-se da enzima, o cRNA se agrega às novas NPs formadas e à uma única cópia de RNA polimerase para constituir uma cRNP (1). Assim, vale ressaltar que a afinidade com o receptor celular não garante a eficiência da replicação, tendo em vista que o "fitness viral" (partículas virais com capacidade infecciosa) é crucial para o crescimento dos vírus influenza (18).

A transcrição do RNAv também ocorre no núcleo (figura 4b), os mRNAs sintetizados são considerados cópias incompletas do modelo de RNAv e eles são "capeados" e poliadenilados (2). A polimerase viral obtém os primers dos mRNAs por meio de um mecanismo denominado "retirada de cap" e, para que isso ocorra, faz uso da subunidade PB2 para se ligar aos "caps" da extremidade 5' dos transcritos recentemente no hospedeiro e, do domínio de endonuclease da subunidade PA para clivar entre 10 e 13 nucleotídeos "downstream" do cap 5' (1). Então, um alongamento de resíduos de uridina é localizado e funciona como um sinal para poliadenilação. Alguns transcritos de mRNA podem sofrer "splicing", o que leva a um aumento da capacidade de codificação dos segmentos (2). Esse processo se dá a partir do recrutamento de "spliceossomas" da célula hospedeira que produzem transcritos "spliced" e codificam as proteínas M2 e NS2 (1).

Posteriormente ao transporte das RNPvs e mRNAv para o citoplasma (mediado pelas proteínas NEP, bem como as M1), a tradução do mRNA é dividida em dois sítios: ribossomos (para PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 e M1) e retículo endoplasmático granuloso (para HA, NA e M2) (1). Já no citoplasma, as RNPvs são transportadas para a membrana plasmática da célula hospedeira para a montagem

da nova partícula viral. As proteínas de superfície, após o processo de síntese no retículo, são processadas no complexo de Golgi e então transportadas também para a membrana da célula hospedeira (1) (figura 4c). As RNPs são então envelopadas por uma membrana bilipídica portando as proteínas de superfície, levando ao brotamento das novas partículas virais (figura 4d). Neste momento, a ação enzimática da NA é fundamental para a clivagem dos resíduos de moléculas de ácido siálico presentes na membrana da célula hospedeira para que a liberação dessas novas partículas virais ocorra de maneira efetiva (17).

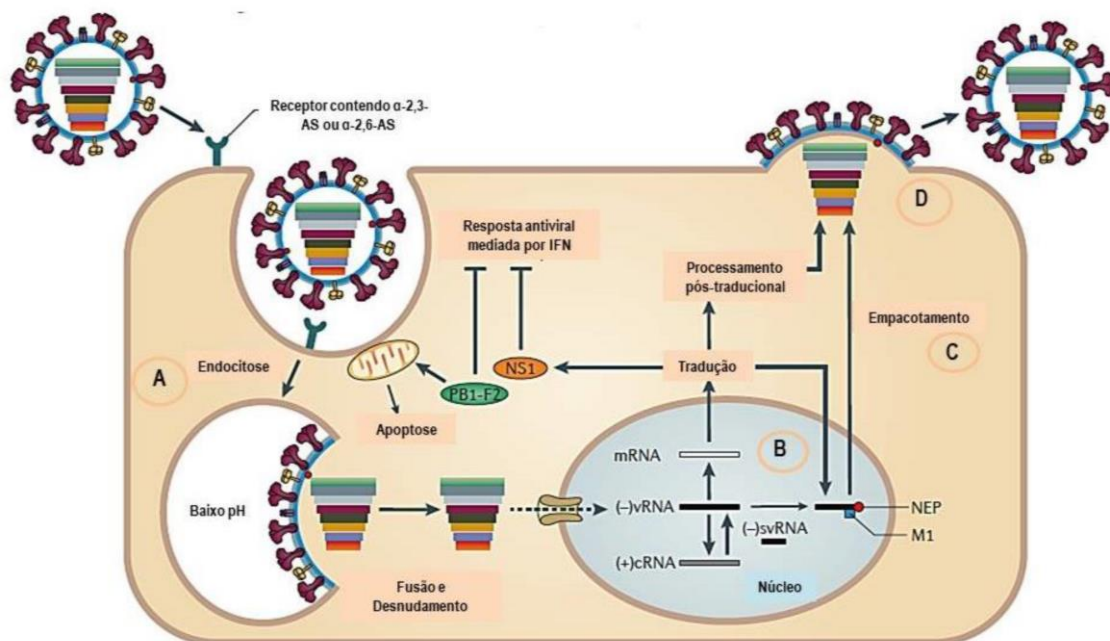


Figura 4 - Esquema representativo do ciclo replicativo do vírus influenza.

a. Após a adsorção (mediada pela HA) do vírus à célula, por intermédio de um processo de endocitose o mesmo entra na célula hospedeira e, devido ao baixo pH do endossoma, ocorre uma acidificação no interior do vírion (pela entrada de prótons através do canal M2). Essa alteração de pH resulta em mudanças conformacionais que geram uma exposição do peptídeo de fusão e também media a liberação do material genético viral (RNPs) para o citoplasma. As RNPs são transportadas para o núcleo, onde ocorre a replicação e transcrição. **b.** Replicação e transcrição viral mediadas pela enzima viral RNA polimerase. O mRNA sintetizado é transportado para o retículo endoplasmático granuloso, onde as proteínas de superfície viral são traduzidas e, posteriormente, processadas no complexo de Golgi, as demais proteínas são traduzidas no ribossomo. O RNAv é transcrito a partir da síntese de um cRNA, e é transportado para o citoplasma a partir da ação das proteínas NEP e M1. **c.** O empacotamento ocorre na membrana plasmática da célula hospedeira, onde as proteínas já estão ancoradas pós-tradução e processamento pós-traducional e para onde as novas RNPs são transportadas, essas então são envolvidas por uma membrana bilipídica contendo as demais proteínas. **d.** As novas partículas virais são liberadas por brotamento por intermédio da ação da NA que cliva os resíduos de ácido siálico presentes na membrana da célula hospedeira. Fonte: adaptado de Medina (2011) (18).

1.2.1 “Drift” e “Shift” Antigênicos

A RNA polimerase viral não apresenta a capacidade de reparar os possíveis erros gerados durante a transcrição, desta forma, diversas mutações podem se acumular no decorrer da replicação dos vírus influenza, conseqüentemente levando às mudanças nas proteínas traduzidas neste processo (17). Isto inclui os epítomos das proteínas de superfície NA e HA que, por sua vez, acabarão apresentando diferenças antigênicas, assim, os vírus influenza são classificados de acordo com os distintos tipos dessas proteínas que os compõem (17). Essas mutações que impedem ou limitam a ligação dos anticorpos, podem ser a causa de resistência a antivirais e dificulta o desenvolvimento de vacinas, sendo este evento denominado “drift” antigênico (figura 5a) (17, 19). Esse “drift” é responsável pela evolução antigênica dos vírus influenza A e é caracterizado pelas cepas sazonais que exibem alterações nos aminoácidos que constituem a NA e a HA, possibilitando a ocorrência de epidemias (18).

Devido à forma como o genoma viral se apresenta – segmentado -, a RNA polimerase pode rearranjar diferentes fragmentos, levando a uma mescla de genes, durante uma infecção concomitante de duas cepas do vírus influenza, esse processo é designado rearranjo genético (17, 18). Essas mudanças podem, em alguns casos, possibilitar a concepção de um novo subtipo de vírus, esse fenômeno é o “shift” antigênico (figura 5b), no qual o vírus une a capacidade de replicar em determinado hospedeiro com novas propriedades antigênicas (17). Geralmente, os “shifts” antigênicos estão associados com modificações na HA e, constituem a base de pandemias de vírus influenza (18).

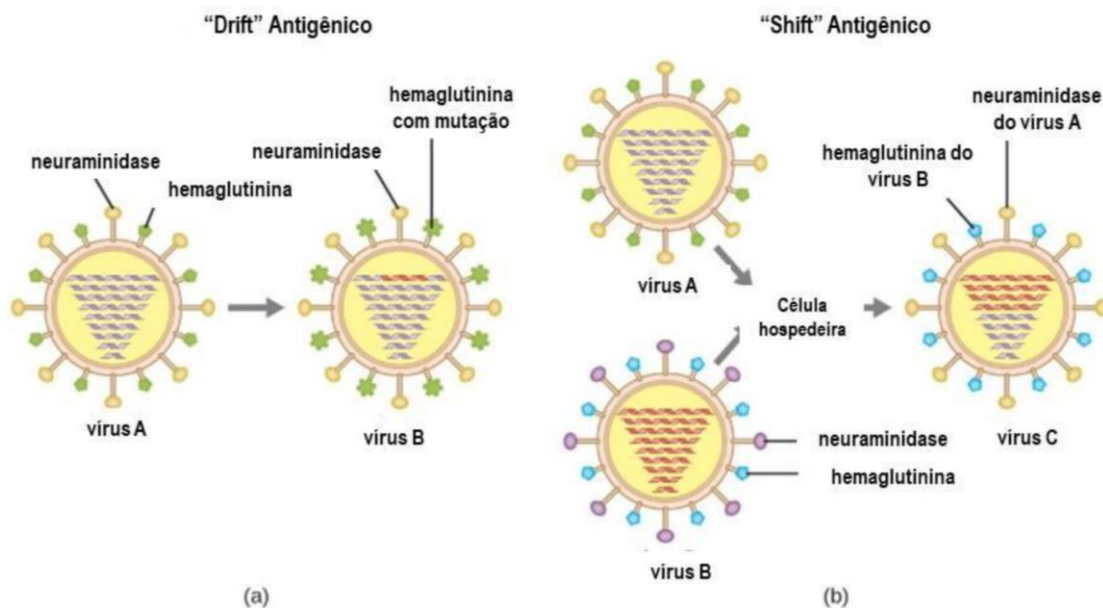


Figura 5 - Esquema representativo de "drift" e "shift" antigênicos.

a. O “drift” antigênico é caracterizado por mutações que ocorrem durante a replicação viral e que não são corrigidas pela RNA polimerase, levando à formação de novas proteínas de superfície NA e HA. **b.** O “shift” antigênico ocorre quando, durante uma infecção com dois tipos distintos de vírus influenza, ocorre um rearranjo entre os fragmentos do material genético de cada um (o fato de o RNA ser segmentado contribui para que esse rearranjo seja possível), gerando uma nova cepa viral. Fonte: adaptado de Lumen (2018) (20).

1.3 A Patologia dos Vírus Influenza

Os vírus influenza são responsáveis por infecções agudas no trato respiratório superior e inferior (21). Essas infecções são caracterizadas por início repentino de sintomas como tosse, coriza, febre alta, dor de cabeça, fadiga, mal-estar e inflamação do trato respiratório superior e traqueia, sintomas que persistem por 7-10 dias (19). Se o vírus difundir-se do trato broncoalveolar para os alvéolos pode levar a pneumonia viral e pneumonite intersticial com infiltração mononuclear e hemorragia e, por fim, lise do espaço interalveolar (17). A transmissão desses vírus ocorre por gotículas expelidas por indivíduos infectados e mãos contaminadas (17).

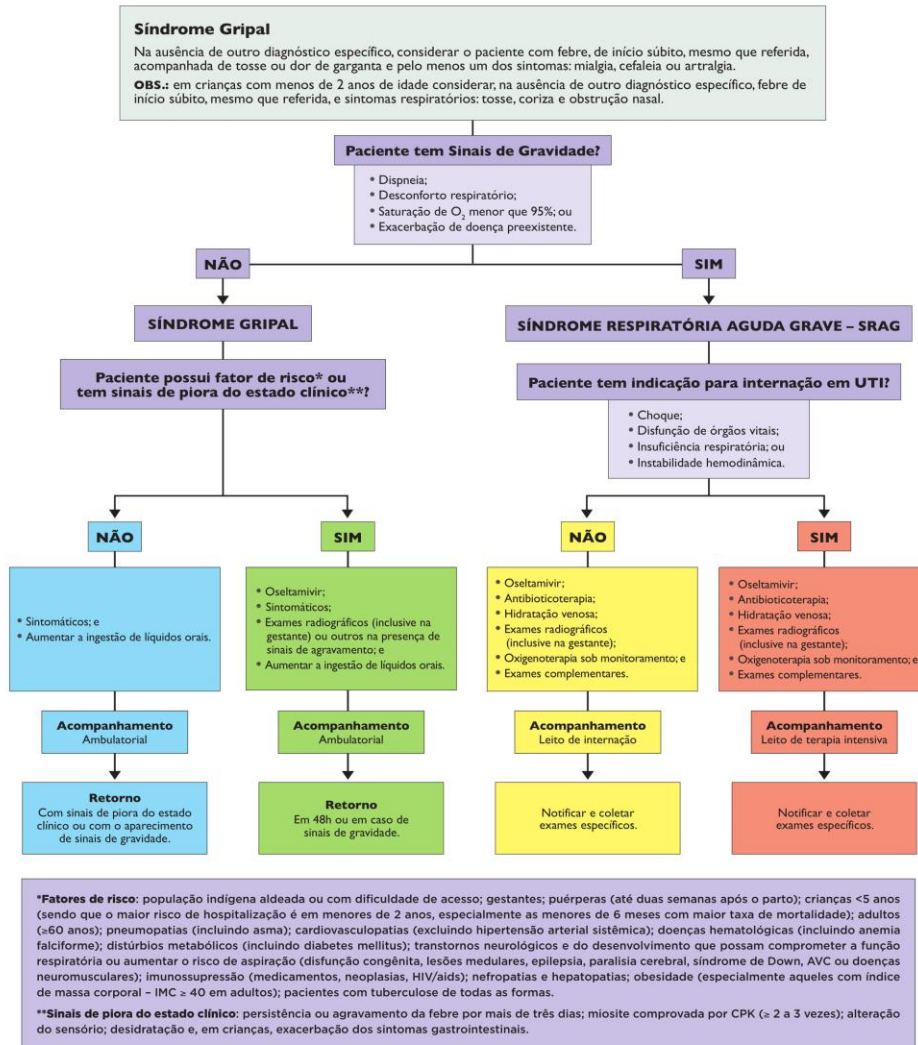
A infecção ocasiona lise das células epiteliais e maior produção de muco, além de edema e inflamação nos sítios de replicação, devido às citocinas liberadas para conter a infecção (17). No caso de uma cepa pandêmica, a qual o indivíduo nunca foi exposto, a combinação de alta taxa de replicação e consequente indução de secreção de citocinas é também aumentada, levando à destruição do epitélio, o que resulta em um influxo de fluidos para os alvéolos, hipóxia e síndrome da

insuficiência respiratória aguda, que pode causar a morte em 1-2 dias pós-início dos sintomas (17).

Os sintomas da infecção por influenza podem levar a dois possíveis diagnósticos: síndrome gripal (SG) ou síndrome respiratória aguda grave (SRAG) (22). A primeira é caracterizada por febre (de início súbito), acompanhada de tosse ou dor de garganta e ao menos um dos seguintes: mialgia, artralgia ou cefaleia, porém em crianças com idade abaixo de 2 anos considera-se SG a febre de início súbito em conjunto com outros sintomas respiratórios como tosse, coriza e obstrução nasal (22). Ao passo que, a SRAG é diagnosticada quando o paciente, além de apresentar os sintomas de SG, exibe dispneia, desconforto respiratório, saturação de oxigênio menor que 95% ou exacerbação de doença pré-existente (figura 6) (22).

SÍNDROME GRIPAL E SÍNDROME RESPIRATÓRIA AGUDA GRAVE

Classificação de Risco e Manejo do Paciente



Fonte: SAS

| DROGA | FAIXA ETÁRIA | POSOLOGIA | |
|---|--|--|---------------------------|
| Oseltamivir | Adulto | 75 mg, vo*, 12/12h, 5 dias | |
| | Criança maior de 1 ano de idade | ≤ 15 kg | 30 mg, vo, 12/12h, 5 dias |
| | | > 15 kg a 23 kg | 45 mg, vo, 12/12h, 5 dias |
| | | > 23 kg a 40 kg | 60 mg, vo, 12/12h, 5 dias |
| | > 40 kg | 75 mg, vo, 12/12h, 5 dias | |
| Criança menor de 1 ano de idade | 0 a 8 meses | 3 mg por kg, vo, 12/12h, 5 dias | |
| | 9 a 11 meses | 3,5 mg por kg, vo, 12/12h, 5 dias | |
| Zanamivir | Adulto | 10 mg: duas inalações de 5 mg, 12/12h, 5 dias | |
| | Criança | ≥ 7 anos 10 mg: duas inalações de 5 mg, 12/12h, 5 dias | |
| Dose para tratamento em recém-nascidos - Tratamento durante cinco dias | | | |
| Oseltamivir | 1 mg/kg/dose 12/12 horas - em prematuros | | |
| | 1 mg/kg/dose 12/12 horas de 37 a <38 semanas de idade gestacional | | |
| | 1,5 mg/kg/dose 12/12 horas de 38 a 40 semanas de idade gestacional | | |
| | 3 mg/kg/dose de 12/12 horas >40 semanas de idade gestacional | | |

*Via oral.

Figura 6 - Cartaz do Ministério da Saúde sobre SRAG, SG e como o tratamento deve ser realizado.

Fonte: Ministério da Saúde (2018) (23).

O vírus influenza A, graças à variação de subtipos, possui a capacidade de infectar diversos tipos de organismos (dentro das classes de mamíferos e aves). Epidemias já foram registradas em aves domésticas, porcos, cavalos, visons (mamíferos do gênero *mustela*), focas, morcegos, cachorros, furões e humanos (4, 24). Os vírus influenza aviários frequentemente infectam humanos, saindo de seus reservatórios normais que são as aves aquáticas, no entanto, essas infecções, salvo exceções, raramente são altamente transmissíveis. Contudo, os vírus influenza aviários que possuem como hospedeiros intermediários os suínos acabam apresentando uma transmissibilidade maior para humanos, possivelmente gerando pandemias (24).

Durante a infecção, o sistema imune, tanto inato quanto adaptativo, é ativado e, normalmente, restringe a replicação viral (17). Entretanto, frações populacionais com um sistema imune mais vulnerável como crianças de até 2 anos e idosos com idade acima de 65 anos, bem como pessoas com doenças imunossupressoras ou doenças crônicas constituem um grupo de risco (17). As infecções por influenza podem também causar otite aguda e já foram associadas com um risco aumentado de desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré (19).

Amostras histológicas são inconclusivas para o diagnóstico, visto que as alterações histológicas não são específicas deste tipo de infecção, desta forma o diagnóstico requer técnicas como isolamento viral, testes diagnósticos rápidos (como RT-PCR), ensaios sorológicos ou biópsia (ou autópsia) de uma secção de tecido confirmada por hibridização *in situ* ou imunohistoquímica (19).

1.4 O vírus Influenza – Histórico

Os dados de pesquisa em virologia envolvendo infecções pelo vírus influenza apenas têm alcance a partir da década de 1930 e, algumas outras informações são de poucas décadas anteriores. Assim, vale ressaltar que doenças documentadas em períodos precedentes com características epidemiológicas e clínicas semelhantes às infecções por influenza podem ter outros agentes etiológicos (25).

Epidemias de influenza, aparentemente, ocorrem desde a Idade Média, se não até mesmo em épocas prévias. E, além das epidemias sazonais, que ocorrem no inverno, cepas pandêmicas do vírus influenza A ocasionalmente emergem (26, 27). Nos últimos 120 anos, seis pandemias foram registradas: em 1889, 1918, 1957, 1968, 1977 e em 2009 (figura 7) (26). A pandemia de 1889, que ficou conhecida

como “Gripe Russa”, foi possivelmente causada pelo vírus influenza A/H3N2, com mais de 30 mil casos registrados (28, 29).

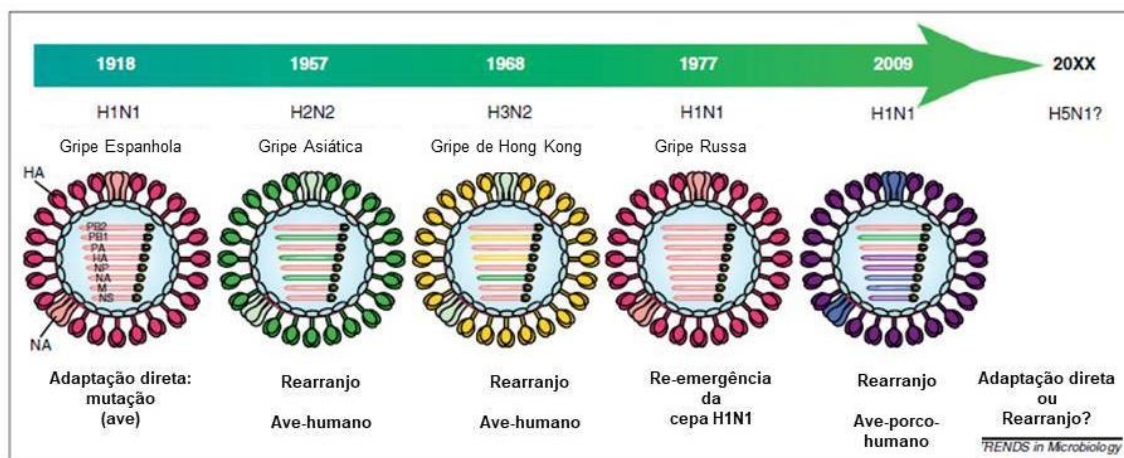


Figura 7 - Histórico de pandemias do vírus influenza A.

Foram registradas cinco grandes pandemias causadas pelo vírus influenza A (1918, 1957, 1968, 1977 e 2009), estas foram ocasionadas principalmente por conta dos “shifts antigênicos” que os vírus influenza têm capacidade de realizar e também por conta da diversidade de hospedeiros que o tipo A apresenta. Fonte: adaptado de Watanabe (2012) (30).

A pandemia de 1918 foi considerada uma das mais severas da história, com o maior número de mortes, conhecida como “A Gripe Espanhola”, sendo registrados cerca de 50 milhões (ou mais) de óbitos, além disso, estima-se que 500 milhões de pessoas ao redor do mundo foram infectadas (31). Análises do genoma viral em amostras de tecido de diversas vítimas indicaram que o patógeno causador da doença foi o vírus influenza A/H1N1 derivado de aves (26).

Na pandemia de 1957 o agente etiológico pertencia a uma linhagem distinta de influenza, denominada H2N2 asiático, esta era derivada da anterior, porém com a adição de três novos segmentos através de rearranjo com vírus desconhecido de origem aviária (26). Esse vírus substituiu o H1N1 circulante e se manteve em circulação até 1968 (31).

O vírus responsável pela pandemia de 1968 foi intitulado “H3N2 Hong Kong” e, teve sua origem também em um rearranjo entre um H2N2 humano já circulante e um vírus influenza A aviário, adquirindo um novo tipo de HA e segmentos do gene PB1 (26).

No ano de 1977, a pandemia que ocorreu teve como agente causador o vírus que foi nomeado H1N1 russo, este foi originado a partir da cepa de H1N1 de 1918. Como este vírus já estava há mais de 20 anos sem circular e é improvável que ele

tenha se mantido durante todo esse tempo sem mutações, acredita-se que esta pandemia aconteceu por conta da liberação acidental de uma cepa da década de 50 que estava congelada ou por uma falha na vacinação (26, 31).

Por fim, a pandemia de 2009 causada por um novo vírus influenza A/H1N1 derivado da combinação de duas cepas suínas: uma semelhante à cepa humana de 1918 e a outra de uma linhagem aviária europeia (26). Esta cepa foi derivada de um rearranjo entre cepas humanas, suínas e aviárias, sendo então mais complexa. Os genes PB2 e PA são originários de uma cepa de vírus influenza aviário, PB1 de um vírus humano e os outros segmentos de gene de duas outras linhagens de suínos (30). A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou em junho de 2009 a pandemia e, em agosto do mesmo ano mais de 170 mil casos já haviam sido confirmados entre 170 países com mais de 1400 óbitos registrados (32). No total, estima-se que 200 milhões de pessoas foram infectadas, globalmente, e isto resultou em aproximadamente 138 mil mortes (33).

Atualmente, vírus influenza dos subtipos H5, H7, H9 e H10 têm sido responsáveis por infecções zoonóticas, com os vírus H5 e H7, ocasionalmente, causando doenças severas. Desta forma, existe uma preocupação de que estes possam vir a evoluir e gerar a próxima pandemia (31).

1.5 Epidemiologia

Os vírus influenza sazonais se espalham facilmente, com transmissão rápida em locais com muitas pessoas, como escolas. Nas regiões de clima temperado, as epidemias ocorrem principalmente no inverno, enquanto nas regiões tropicais, as mesmas podem ocorrer em diferentes épocas do ano, sendo mais irregulares (34).

Infecções causadas pelos vírus influenza estão associadas com um alto grau de morbidade e altas taxas de mortalidade. Segundo a OMS, mais de 650 mil pessoas morrem (globalmente) de doenças respiratórias relacionadas ao influenza. Este número supera as estimativas anteriores de 250 a 500 mil óbitos anuais, sendo a nova conjectura de 290 a 650 mil mortes (35).

A maior parte das mortes ocorre entre pessoas com idade acima de 75 anos, em regiões mais pobres. Já os óbitos envolvendo crianças abaixo de 5 anos – outro grupo de risco das infecções por influenza – estão mais concentrados em países em desenvolvimento. Esses dados enfatizam o impacto socioeconômico gerado por essa doença globalmente (35).

No Brasil, no ano de 2018 foi registrada a circulação dos vírus influenza A/H3N2, A/H1N1pdm09 e Flu B e a sazonalidade do vírus é mais comumente observada no outono e no inverno, porém isto pode variar graças a alta variabilidade climática notada no país (23). Das amostras coletadas até a semana 40 de 2018 (30/09/18 a 06/10/18), 41.9% (de 1000 no total) das amostras para pacientes com síndrome gripal e 58.9% (de 3835 no total) dos pacientes com SRAG, apresentam predominância do vírus influenza A/H1N1pdm09. Do total de óbitos notificados por SRAG, 28.4% (de 1333) dos casos tiveram confirmação para o vírus influenza (36).

1.6 Tratamento e prevenção das infecções causadas pelo vírus Influenza

1.6.1 Vacinas

Atualmente a prevenção de infecções causadas pelo vírus influenza e, conseqüentemente, possíveis epidemias é feita majoritariamente através da vacinação anual. Contudo, devido à alta variabilidade genética desses vírus, a produção de uma vacina que seja efetiva contra todas as cepas circulantes é dificultada (37). A composição da vacina, de acordo com diretrizes da OMS, é constituída por cepas do *Myxovirus influenzae* inativados, purificados e fragmentados e, esta é denominada trivalente, pois protege contra três cepas do vírus influenza (23). As cepas que compuseram a vacina produzida para campanha do ano de 2018 foram influenza A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2-like) e B/Phuket/3073/2013 (Flu B-like). Nas vacinas são usados os antígenos de HA das cepas descritas anteriormente (23).

Contudo, um desafio para o pleno êxito deste método de prevenção das infecções ocasionadas pelos vírus influenza é: a vacinação não é completamente efetiva quando se pensa em indivíduos que adquirem uma infecção originada por uma cepa não incluída na vacina (38). Desta forma, os antivirais são de extrema importância para o tratamento da doença e também para reduzir os efeitos de uma pandemia emergente antes das vacinas efetivas estarem disponíveis (37, 39).

1.6.2 Antivirais

1.6.2.1 Inibidores do canal M2

Essa classe de antivirais tem como alvo os canais de íons M2, que medeiam o influxo de prótons para a partícula viral resultando na fusão do envelope da membrana do endossoma e consequente liberação das RNPs no citoplasma da célula infectada. A Amantadina e a Rimantadina são os principais compostos constituintes da classe dos Adamantanos, suas estruturas são compostas por aminas tricíclicas simétricas (figura 8) que bloqueiam a replicação dos vírus influenza A, através da inibição da ação do canal M2 (38). Essas moléculas foram utilizadas por décadas, no entanto desde 2003, a maior parte das cepas circulantes de influenza A são resistentes às mesmas. As substituições de aminoácidos (na estrutura dos vírus) que são responsáveis pela resistência se espalharam por diversos subtipos e por muitos países mesmo sem o uso recorrente de tais medicamentos em humanos, isto pode ser explicado pela administração desses compostos em aves, já que estes animais têm contato comumente com os humanos, além de algumas espécies fazerem parte da alimentação dos mesmos (40). Além disso, também foi observado que a doença era de alguma forma prolongada nas infecções causadas por cepas resistentes às adamantanas, indicando que estas são mais virulentas do que as sensíveis (40).

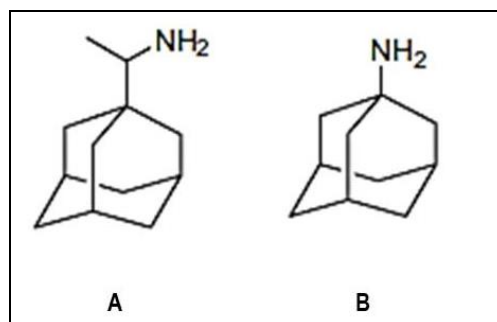


Figura 8 - Estrutura das Adamantanos.

A. Estrutura química da Rimantadina e **B.** estrutura química da Amantadina. Fonte: adaptado de Lew (2011) (32).

1.6.2.2 Inibidores da Neuraminidase (NAIs)

Para o tratamento de infecções causadas pelos vírus influenza, atualmente esta é a única classe de antivirais recomendada pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention) e aprovada pelo FDA (Food and Drugs Administration), os medicamentos compreendidos nessa classe que já têm aprovação para uso são: Oseltamivir (OST), Zanamivir, Peramivir e Laninamivir (37). Tanto o OST quanto o Zanamivir têm aprovação para uso globalmente, no entanto, o Peramivir somente é aprovado na China, Japão, Coréia do Sul e Estados Unidos e o Laninamivir unicamente no Japão (38, 41). Esses compostos são análogos da molécula de ácido siálico e inibem, especificamente, a atividade da NA dos vírus influenza A e B, interagindo competitivamente e reversivelmente com o sítio ativo dessa enzima (38).

Laninamivir octanoato é uma pró-droga que, nas vias aéreas, é convertida em laninamivir, o inibidor ativo de NA. É administrado via inalação, tanto para profilaxia quanto para o tratamento, sendo recomendadas doses únicas em menor e maior concentração de acordo com o objetivo do uso. Esse composto foi associado com uma atenuação mais rápida dos efeitos do vírus influenza H1N1, com a mutação H275Y, em crianças, em comparação com o tratamento padrão com OST (38).

O Peramivir é administrado por via intravenosa, pois apresenta biodisponibilidade baixa por via oral. A dose aprovada para uso desse composto é única e tem como população-alvo, adultos saudáveis (sem outras doenças) com infecção por influenza sem complicações, nos Estados Unidos, e estudos indicam que esse tratamento com dose única não é recomendado para pacientes com forma mais severa da doença. O Peramivir apresenta uma meia-vida entre 12 e 25 horas e eliminado majoritariamente por excreção renal (38).

O Zanamivir (Relenza™) também exhibe biodisponibilidade oral baixa, portanto é administrado por via intranasal (38). Esse composto foi o primeiro na classe de pequenas moléculas anti-influenza, descoberto a partir de uma abordagem de um design de drogas baseado na estrutura do ácido siálico (32). Ele é indicado para o tratamento de infecção aguda (sem complicações) causada pelos vírus influenza A e B em adultos e crianças a partir de 7 anos, com sintomas por não mais que 2 dias. A administração é realizada por meio de inalação com auxílio de equipamento autônomo de respiração (38). Esse composto foi associado com uma redução de 40% de complicações geradas pelo influenza no trato respiratório inferior, como pneumonia e bronquite que, geralmente, têm como consequência a necessidade do uso de antibióticos (38).

O OST (Tamiflu™) é o composto mais comumente utilizado no tratamento de infecções causadas pelos vírus influenza A e B (41). O OST é administrado oralmente na forma fosfatada, como uma pró-droga, e é recomendado para o tratamento e prevenção de infecções em adultos e crianças (32). O OST carboxilato, metabólito ativo do composto, apresenta uma biodisponibilidade de aproximadamente 80% e a meia-vida da eliminação plasmática ocorre entre 6 e 10 horas. A eficácia da profilaxia realizada com esse composto é de 84 a 92%, quando realizada por 10 dias a 8 semanas, em pacientes sem a proteção da vacina (38). O design da molécula do OST teve por base um ciclohexeno, pois este apresenta mais estabilidade enzimática, e também exibe maior suscetibilidade de melhor funcionamento com modificações químicas e por ser um bioisómero de um cátion positivo de oxigênio no estado de transição da clivagem do ácido siálico, realizada pela NA. Seguindo esse princípio os demais átomos foram sendo adicionados à estrutura (figura 9) para aumentar a potência do composto (32).

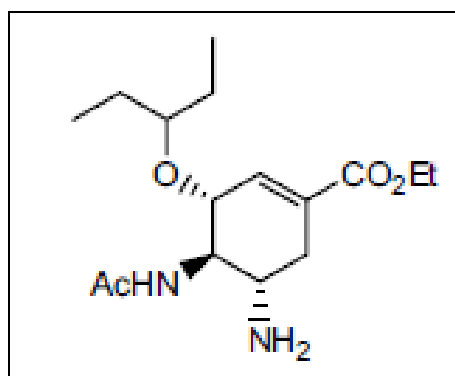


Figura 9 - Estrutura química do OST

Fonte: adaptado de Lew (2011) (32).

No entanto, grupos localizados de vírus influenza A com resistência ao OST já foram detectados, e também mutações que causam uma redução da sensibilidade ao OST de cepas de influenza B (42). Foi observada uma rápida emergência dessas cepas resistentes, principalmente nos anos de 2008 e 2009 durante a pandemia do influenza A/H1N1, e, essas mutações não geraram uma diminuição do “fitness” viral, podendo ser facilmente espalhadas por toda a população (41). Em um estudo realizado tanto com adultos quanto crianças, foi registrado que a taxa de emergência de resistência ao tratamento com NAIs é de 2,2%, ou seja, pode ser considerada baixa (40). Contudo, em 2008, foi verificado que a frequência de resistência ao OST

era de 90% na cepa sazonal de influenza A/H1N1, associada com a mutação tirosina-histidina na posição 275 (H275Y, N1) da NA. Atualmente, de 1-3% das cepas circulantes (H1N1pdm09) apresentam essa mutação (33).

O uso quase que exclusivo dos NAIs (e de basicamente dois deles) para o tratamento de infecções por influenza, tem evidenciado a necessidade do desenvolvimento de outros compostos com ação anti-influenza, que não só tenham sua potência aumentada em relação aos que vêm sendo utilizados, mas também que exibam uma menor propensão a apresentar resistência viral e que, além disso, sejam eficazes contra as cepas circulantes que já têm mutações de resistência (41).

1.7 Produtos Naturais e Atividade Biológica

Os produtos naturais têm sido uma ampla fonte de compostos biologicamente ativos e com um grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas (43). De acordo com a OMS, 80% da população em países em desenvolvimento depende de plantas tradicionais no quesito saúde, ou seja, para tratamentos caseiros (42). Produtos naturais como extratos de plantas, fitoconstituintes (compostos derivados de plantas), extratos de partes específicas das plantas têm diversas aplicações no tratamento de doenças, desde comuns e raras infecções até doenças não infecciosas (42). Ainda, segundo pesquisas, um quarto dos remédios usados frequentemente contém compostos derivados de plantas (42).

Moléculas provenientes de produtos naturais também têm sido cruciais para a descoberta de novas drogas com potencial antiviral. De 1981 a 2014, os compostos com origem em produtos naturais compreendem mais de 40% das drogas antivirais em uso clínico, podendo ser divididos em substâncias naturais (aproximadamente 6%) ou moléculas desenvolvidas utilizando produtos naturais como protótipos (aproximadamente 34%) (44). Mecanismos antivirais identificados em produtos naturais chamaram atenção para como os mesmos interagem com o ciclo de vida viral, como a entrada, ligação, replicação e liberação da célula hospedeira, assim como interações específicas dos vírus com o hospedeiro (43).

Com o crescente aumento de cepas virais com resistência aos tratamentos que vêm sendo utilizados, outras alternativas, principalmente de fontes naturais, têm sido exploradas (42). Subsequentemente à pandemia de 2009, a procura por inibidores dos vírus influenza A, essencialmente, dentre produtos naturais é um trajeto promissor para seleção de moléculas para estudo pré-clínico (45). Compostos

como lectinas, polifenóis, esteroides e flavonoides, por exemplo, já têm atividade anti-influenza descrita (42-44, 46, 47).

1.7.1 Flavonoides

Os flavonoides são um tipo de composto polifenólico frequentemente produzidos em plantas (47). Essas moléculas estão quase sempre presentes em células fotossintetizantes, portanto podem ser encontrados em uma grande diversidade de vegetais (48). A sua estrutura básica, representada na figura 10, é constituída por dois anéis benzênicos (anel A e anel B) ligados através de um anel “pirano” heterocíclico (anel C). Esses compostos são sintetizados em resposta a diferentes tipos de condições abióticas de estresse, como radiação ultravioleta e, tem uma importante atuação como agente de defesa contra patógenos de plantas e insetos (49).

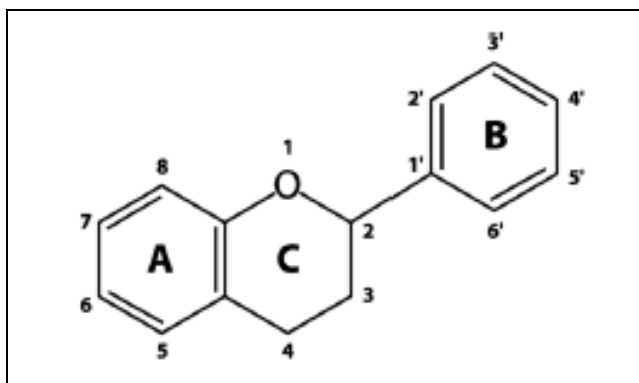


Figura 10 - Estrutura Básica dos Flavonóides

Fonte: Adaptado de Zakaryan (2017) (49).

Atualmente, cerca de 6000 distintos tipos de flavonoides já foram estruturalmente descritos (49). A classificação desses compostos é realizada de acordo com sua origem biossintética (48). Antocianidinas, flavonas, flavonóis, flavanas, isoflavonoides, biflavonoides são exemplos de classes (as principais) de flavonoides. Enquanto essas, e as demais, diferem estruturalmente no nível de oxidação e o padrão de substituição do anel “pirano”, as substâncias dentro de cada classe são distintos por conta do padrão de substituição dos anéis benzênicos (49).

A primeira evidência de atividade biológica dos flavonoides foi registrada em 1938 e, desde então, um amplo espectro de atividades tem sido descrito como anti-

inflamatório (por exemplo, controlando a ativação de células T, células B, mastócitos, neutrófilos e basófilos, modulando a inflamação cardíaca), antioxidante, antibacteriano, antiviral, anticâncer e neuroprotetor (49, 50). Ademais, alguns flavonoides podem apresentar a capacidade de inibição enzimática, principalmente devido à interação das enzimas com diferentes partes da estrutura do composto. Estudos indicam que os flavonoides inibem um grande número de enzimas eucarióticas e exibem uma ampla gama de atividades (48).

Diversos estudos descrevem a atividade antiviral dos flavonoides, incluindo ação inibitória de uma grande variedade de vírus como HIV-1, herpes vírus humano (HHV), vírus sincicial respiratório (RSV), vírus da Pólio, o vírus Simbis, entre outros. Os mecanismos de ação vão desde inibição da polimerase viral até ligação ácido nucleico viral ou proteínas do capsídeo viral (48). Também existem alguns trabalhos reportando a atividade anti-influenza de flavonoides (47, 51, 52).

As flavonas compõem a maior classe dos flavonoides e sua estrutura é baseada em um esqueleto composto de 2-fenil-1-benzopirano-4-ona. A atividade antiviral dessa classe já é descrita desde a década de 90, quando foi demonstrada a aplicação concomitante de apigenina com aciclovir resultando em aumento do efeito antiviral nos vírus HHV-1 e HHV-2 *in vitro*, o efeito anti-influenza de algumas flavonas também já foi descrito (49, 53, 54).

Os compostos biflavonoides exibem duas “unidades” estruturais de flavonoides idênticas ou não, conectadas por uma ligação glicosídica C-C ou C-O-C (figura 11) (49). Assim, podem ser descritos como dímeros flavonoide-flavonoide. Plantas que possuem biflavonoides como constituintes não são amplamente distribuídas, desta forma, essas moléculas são encontradas em poucas espécies (55). Esses compostos possuem diversas atividades biológicas/farmacológicas descritas: antibacteriana, antifúngica, anticâncer, antioxidante, antialérgica, imunossupressora e antiviral (55-57).

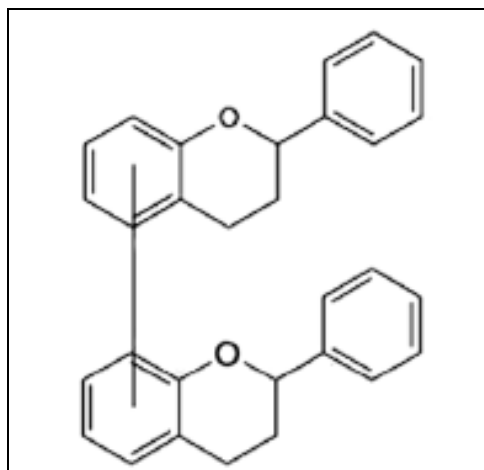


Figura 11 - Estrutura base dos biflavonoides.

Os compostos biflavonoides apresentam duas “unidades” idênticas ou não das estruturas base dos flavonoides, unidas por uma ligação glicosídica C-C ou C-O-C e, além disso, podem ter átomos ou outros grupamentos ancorados à sua estrutura. Fonte: adaptado de Zakaryan (2017) (49).

1.7.1.1 Agatisflavona

A agatisflavona (figura 12) é um biflavonoide que apresenta coloração amarela, massa molar de 538.457 g/mol e, pode ser encontrada em diferentes partes (folha, tronco, raiz, fruta) de algumas plantas como *Anacardium occidentale*, *Rhus parviflora* e *Caesalpinia pyramidalis*, essa molécula pode ser extraída de tais vegetais a partir de solventes polares ou de média polaridade tal como metanol e etanol (58).

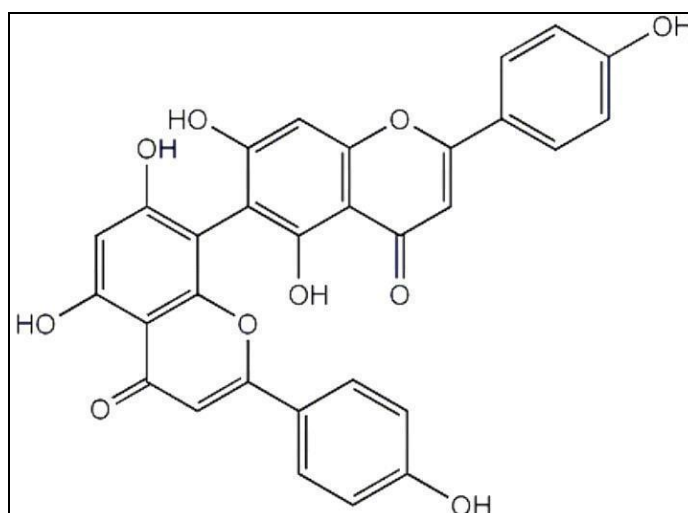


Figura 12 - Estrutura química da Agatisflavona

Estudos prévios descreveram que a agatisflavona apresenta algumas atividades biológicas como antimicrobiana, neuroprotetora, efeito hepatoprotetor, é

citotóxica para células cancerígenas, antioxidante e antiviral (58-61). Além disso, sua atividade anti-influenza foi descrita por Lin (1999), mas sem detalhes sobre o possível mecanismo de ação do composto (62).

1.8 Justificativa

As infecções causadas pelos vírus influenza fazem parte das doenças que causam um grande impacto na saúde pública e são responsáveis por epidemias sazonais. Essas infecções podem gerar inúmeras complicações, levando até mesmo ao óbito, principalmente em indivíduos considerados de alto risco, como crianças e idosos (63). Configurando uma questão de saúde pública, anualmente, esses vírus causam infecções severas em 3 a 5 milhões de pessoas no mundo todo. Além disso, continua sendo uma notável fonte de prejuízo econômico globalmente (64). A hospitalização devido ao influenza sazonal leva a perda de dias de trabalho, redução da qualidade de vida graças a infecções secundárias e aumento da utilização dos recursos hospitalares (64).

Os vírus influenza A são classificados como zoonóticos e algumas aves constituem o seu reservatório natural (65). No entanto, pode ocorrer transmissão tanto para outros organismos quanto para humanos, e esta pode se dar de modo direto ou por meio de rearranjo do genoma viral. A rota de transmissão direta compreende a infecção sem adaptação prévia do vírus nesse hospedeiro diferente das aves, como por exemplo, a transmissão do H5N1, que é altamente patogênico, de aves domésticas infectadas para humanos (65). Tendo em vista essa conexão entre humanos e o reservatório natural dos vírus influenza A, existe uma preocupação com o desenvolvimento de cepas resistentes aos antivirais aprovados para uso atualmente.

Subsequentemente à pandemia de 2009, esta cepa tornou-se a mais prevalente e, já foram descritos alguns grupos no Japão, Austrália e Estados Unidos, por exemplo, nos quais essa cepa (H1N1pdm09) apresenta resistência ao composto de referência OST, o mais usado no tratamento de infecções causadas por influenza (66). No Brasil, essas cepas com mutações foram detectadas em pacientes tratados e não tratados, o que destaca a transmissibilidade desses vírus resistentes (66). Além disso, mutações de resistência aos antivirais podem ocorrer ao caso, assim, surge a necessidade da busca por novos compostos que não apenas sejam capazes

de inibir as cepas circulantes do vírus influenza, como também as com mutação de resistência ao OST.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a ação anti-influenza *in vitro* da molécula agatisflavona derivada de *Anacardium occidentale L.*

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar os parâmetros farmacológicos, relacionados à potência de inibição da replicação do vírus influenza, e a citotoxicidade da agatisflavona;
- Aprofundar o estudo sobre o mecanismo de ação anti-influenza da agatisflavona (avaliar a capacidade e potência de inibição da atividade NA);
- Determinar possíveis mutações de resistência à agatisflavona, e verificar a existência de resistência cruzada entre este composto e o OST;
- Estudar o sítio de ligação da agatisflavona na neuraminidase viral através de modelagem molecular;
- Investigar a possibilidade de atuação sinérgica da agatisflavona em conjunto com o OST.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Células, vírus e compostos utilizados

3.1.1 Células

Células epiteliais de rim canino (MDCK) foram cultivadas em meio de manutenção DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Ambos os meios foram também suplementados com antibióticos (penicilina a 100 U/mL, e estreptomicina a 100 µg/mL). A cultura foi mantida em garrafas de poliestireno de 75 cm², em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO₂) a 37°C e acompanhadas diariamente ao microscópio óptico invertido de campo claro. Durante o repique as células foram lavadas com PBS (tampão salina fosfato) 1x pH 7,2 e tratadas com tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,25%.

3.1.2 Vírus

As cepas virais utilizadas nos experimentos foram influenza A/England/72/H3N2-like (H3N2), cepa sazonal do ano de 1972, A/07/California/2009/H1N1-like (H1N1), cepa proveniente da pandemia do ano de 2009 e influenza B/Perth/211/2001(Flu B), sensíveis ao OST e as cepas H3N2 E119V e H1N1 H275Y, resistentes ao OST. Durante a infecção para manutenção do vírus, as células MDCK foram tratadas com tripsina-EDTA e ressuspendidas em meio de inoculação (meio DMEM contendo 4% de albumina – BSA – e 0,4 mg/mL de tripsina). A cultura foi acompanhada até a observação do efeito citopático causado pelos vírus. Neste momento a cultura foi colocada à -70 °C até seu congelamento. O sobrenadante foi então coletado e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. O precipitado contendo os restos celulares foi descartado e o sobrenadante contendo os vírus foi coletado e congelado à -70°C até sua utilização.

3.1.3 Compostos

A agatisflavona (6,8'-Biapigenin-4H-1-benzopyran-4,4'-dione,5,5,7,7'-tetrahydroxy-2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)) foi extraída e purificada do extrato de folhas

da *Anacardium occidentale* L. (cajueiro) pelo grupo do Dr. Marco Rocha no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN5) de Farmanguinhos/FIOCRUZ, pós-doutorando neste projeto. Para isso, inicialmente, foi produzido um extrato etanólico das folhas do cajueiro, esse foi testado através do método de NAI (item 3.2). Esse extrato foi fracionado em solventes de diferentes polaridades que, mais uma vez, foram testados por meio de NAI e, as três frações com maior atividade anti-influenza foram novamente fracionadas (em 38 frações com solventes de polaridades distintas). A molécula resultante que obteve maior porcentagem de inibição da atividade da NA e que, subsequentemente, teve sua estrutura elucidada foi a agatisflavona.

O oseltamivir-carboxilato foi utilizado como controle positivo de inibição da replicação viral e foi cedido por Hoffman-La Roche Inc., Basel, Suíça.

3.2 Ensaios de inibição da atividade da neuraminidase (NAI)

Para avaliarmos a ação da agatisflavona sobre a atividade da neuraminidase (NA) do vírus influenza A/H3N2, A(H1N1)pdm09 e B, sensíveis ao OST, foram realizados ensaios funcionais sobre a atividade da neuraminidase (NAI). Posteriormente, também foram utilizadas as cepas H3N2 E119V e H1N1 H275Y, com mutações de resistência ao composto de referência OST. Este teste consiste na detecção da atividade da enzima viral neuraminidase através do kit NA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit (ThermoScientific) (67).

Primeiramente, foi necessário titular o vírus de acordo com sua atividade NA. Para tal titulação foram utilizadas placas de 96 poços brancas (provenientes do kit) e foi feita a diluição seriada do vírus das colunas 1 a 11. O vírus foi diluído no tampão do kit e na coluna 12 foi adicionado somente tampão, como controle (branco). Após agitação de aproximadamente 15 segundos, foi adicionado o substrato quimioluminescente da NA diluído 1000x em tampão. As placas foram novamente agitadas e incubadas por 15 minutos à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Imediatamente após a adição do acelerador foi feita a leitura de luminescência na leitora de placas (SpectraMax® M3). A titulação viral é o inverso da diluição que tiver um sinal 40 vezes maior que o ruído.

Para o ensaio de NAI, os vírus titulados anteriormente foram diluídos no tampão na proporção adequada para que o valor de controle sem droga seja 40 vezes maior o sinal do branco. A agatisflavona também foi diluída no tampão e

adicionada a uma nova placa de 96 poços na concentração de 50 µg/ml, em um primeiro ensaio e, posteriormente, nas concentrações de 100, 10, 1, 0.1 e 0.01 µg/ml em quadruplicata nas linhas A até F. O vírus diluído foi colocado nas linhas A até G, onde a linha G serviu de controle (somente vírus) e a linha H de branco (somente tampão). Após agitação e incubação de 15 minutos à 37°C e atmosfera de 5 % de CO₂, o substrato da neuraminidase foi adicionado diluído 1000x no tampão. Após mais uma incubação de 15 minutos à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, o acelerador foi adicionado e imediatamente foi feita a leitura na leitora de placas. Desta maneira, foram construídas curvas de inibição da atividade NA e o valor do IC₅₀ (concentração que inibe 50% da atividade NA) da agatisflavona foi calculado.

3.3 Determinação da Viabilidade Celular

Para avaliação da citotoxicidade da agatisflavona foram realizados ensaios de viabilidade celular através da técnica de redução do corante resazurina em resorufina. A resazurina é utilizada para medir a capacidade metabólica das células, funcionando como um indicador de viabilidade das mesmas. Células viáveis mantêm a capacidade de metabolizar a resazurina (que apresenta coloração azul escuro com baixa fluorescência intrínseca), reduzindo-a em resorufina, que é altamente fluorescente (exibe coloração rosa e altamente fluorescente) (68).

Nestes ensaios, células MDCK foram semeadas em placas de 96 poços, opacas, com fundo chato e transparente (5×10^4 células/poço), em meio de manutenção suplementado com 10 % de SFB. Após um período de 24 horas, foram tratadas com concentrações distintas da agatisflavona (2.2, 5.6, 11.2, 22.5, 45, 90, 180 e 360 µM) diluído em meio DMEM High Glucose com 2% de SFB. As células foram mantidas por 72 horas a 37°C e atmosfera a 5% de CO₂. Posteriormente às 72 horas foram adicionados 20 µL de resazurina em todos os poços da placa e a mesma foi mantida protegida da luz em estufa a 37°C e atmosfera a 5% de CO₂. Subsequente à incubação de 4 horas, foi realizada a leitura de fluorescência em uma leitora de placas (SpectraMax® M3) para a avaliação da metabolização da resazurina pelas células viáveis, com valor de excitação de 560 nm e 590 nm de emissão. A partir dos valores da leitura foi construída uma curva de regressão linear utilizando o programa Excel e, desta forma, o CC₅₀ (concentração que mantém 50% das células viáveis) foi calculado.

3.4 Ensaio de Inibição da Replicação Viral (Yield Reduction Assay – YRA)

Com o fim de analisar o efeito da agatisflavona sobre a replicação viral, células MDCK foram semeadas em placas de 24 poços (10^5 células/poço) e mantidas com meio de manutenção. Após 24 horas e com confluência de aproximadamente 80% de células em cada poço, o meio foi retirado, as células foram lavadas duas vezes, sendo a primeira com PBS e a segunda com meio de inoculação (1 μ M de tripsina bovina, 4% de BSA e meio DMEM High Glucose) e, em seguida, foram infectadas com o vírus influenza A/H3N2 em um MOI (multiplicidade de infecção – relação vírus/célula) de 0,01 e mantidas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ durante 1 hora. Depois da incubação, o inóculo foi removido e as células foram tratadas com diferentes concentrações do nosso composto diluído em meio de inoculação. Os sobrenadantes dos poços foram coletados após 24 horas de tratamento e armazenados em freezer a -70°C até a sua utilização.

Para titulação dos sobrenadantes, células MDCK foram semeadas em placas de 96 poços (5×10^4 células/poço) e cultivadas em meio de manutenção. Após 24 horas, quando atingiram a confluência de aproximadamente 80%, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes, uma com PBS e outra com o meio de inoculação. Os sobrenadantes coletados foram então utilizados para infectar esta nova placa. Foi realizada uma diluição seriada de base 10 destes sobrenadantes, da primeira até a décima coluna das placas. As colunas 11 e 12 foram usadas como controle negativo de células não infectadas. As células foram infectadas e mantidas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ durante um período de 1 hora. Após esse período, o inóculo foi removido e as células foram mantidas com meio de manutenção suplementado com 2% de SFB a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, a infecção foi quantificada indiretamente por meio da determinação de viabilidade celular através do kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, de acordo com as especificações estabelecidas pelo fabricante (69). Esta técnica visa a quantificação de células viáveis a partir da quantificação de ATP, visto que o mesmo indica a presença de células metabolicamente ativas. Após a quantificação foram determinadas as porcentagens de células viáveis pós-infecção pelo vírus influenza e foram construídas curvas de regressão linear de dose-resposta para cálculo do EC₅₀ (concentração do composto que inibe 50% da replicação viral em células) da agatisflavona.

3.5 Ensaio Sinérgico

Para avaliação do efeito do tratamento combinado da agatisflavona e o composto de referência OST, foi realizado um ensaio similar ao anterior. Em placa de 24 poços foram semeadas células MDCK (10^5 células/poço) e as mesmas foram mantidas durante 24 horas com meio de manutenção (DMEM High Glucose + 10% de SFB) a 37°C e atmosfera de 5 % de CO₂. Após esse período as células foram infectadas com o vírus influenza A/H3N2 (com MOI de 0.5) e submetidas a uma incubação de 1 hora. Posteriormente, o inóculo foi retirado e realizou-se o tratamento com agatisflavona nas concentrações de 50 e 100 μ M, OST a 15 e 30 nM e agatisflavona e OST simultaneamente nas maiores e menores concentrações (agatisflavona 50 μ M + OST 15 nM e agatisflavona 100 μ M + OST 30 nM) e o sobrenadante foi coletado depois de um período de 24 horas. A titulação deste ensaio foi realizada a partir do método de TCID₅₀ visual. Foram preparadas placas de 96 poços nas quais foram semeadas células MDCK (5×10^4 células/poço), estas foram mantidas durante 24 horas com meio de manutenção (DMEM High Glucose + 10% de SFB) a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Então, foi utilizado o sobrenadante do ensaio anterior para infectar essas células, sendo o mesmo utilizado sem diluição e diluído 100, 1000 e 10000 vezes e o efeito citopático foi observado após 24 horas de infecção e quantificado para calcular o título viral, a partir do método de TCID₅₀, em cada condição testada, no Excel.

3.6 Determinação de possíveis mutações de resistência

Para avaliar se determinada cepa do vírus influenza pode se tornar resistente ao nosso composto e, em caso afirmativo, quais as mutações de resistência, foram realizadas diversas passagens do vírus com adição de concentrações crescentes da agatisflavona. Inicialmente, foi preparada uma placa de 24 poços de células MDCK (com 10^5 células/poço), esta foi mantida por um período de 24 horas com meio de manutenção (DMEM High Glucose + 10% de SFB) a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, o meio foi retirado e as células foram lavadas duas vezes, a primeira com PBS e a segunda com meio de inoculação (DMEM High + BSA + Tripsina TPCK), e infectadas com a cepa A/H3N2 com o MOI de 0.01, a placa foi então incubada por uma hora a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Subsequentemente, o inóculo foi retirado e as células foram tratadas com a

agatisflavona na concentração de 20 μ M (valor do IC₅₀ do composto). Após 24 horas, o sobrenadante foi coletado, armazenado para as próximas fases do ensaio e também titulado por meio de um ensaio de NA Star (segundo o protocolo descrito no tópico 3.2).

Para a segunda passagem, foi preparada uma placa de 24 poços de células MDCK (com 10⁵ células/poço), esta foi mantida por um período de 24 horas com meio de manutenção (DMEM High Glucose + 10% de SFB) a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após esse intervalo, as células foram infectadas (segundo o modelo descrito acima) com o sobrenadante do ensaio anterior e tratadas com o dobro da concentração do nosso composto. Também foram realizadas passagens sequenciais de um controle infectado e sem tratamento para avaliação das possíveis mutações que as passagens poderiam gerar no vírus e um controle utilizando o composto de referência OST. Na terceira passagem, o mesmo procedimento foi repetido. Na quarta, a concentração de agatisflavona foi reduzida pela metade, pois, de acordo com o NA Star, o título viral estava muito baixo e, conseqüentemente, inviabilizaria a realização de uma nova passagem. Para a quinta passagem foi mantida a concentração utilizada na quarta passagem, para possibilitar que o vírus continuasse replicando e não ocasionasse uma inibição total da infecção. Parte de todos os sobrenadantes foi armazenada em freezer a -70°C para posterior sequenciamento.

3.6.1 Síntese de cDNA

Primeiramente, foi realizada extração do RNA dos sobrenadantes previamente armazenados em freezer a -70°C utilizando o kit QIAamp® Viral RNA Mini, de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante (70). Para a síntese do cDNA total foram utilizados *primer* UNI-12 para influenza, seguindo o protocolo do Health Protection Agency (HPA) de Londres (Tabela 1).

Tabela 1 - Reagentes para a síntese de cDNA

| Reagentes | Concentrações |
|-----------------------------|------------------|
| Água RNA/DNase free | - |
| Tampão | 5x |
| DTT | 0.1 M |
| Mistura de dNTP | 10 mM |
| <i>Primer</i> UNI-12* | 25 pmol/ μ L |
| Transcriptase reversa SSIII | 200 U/ μ L |

*Sequência do *primer* UNI-12: 5' AGCAAAGCAGG 3'.

A ciclagem foi de 90 minutos a 42°C e 3 minutos a 95°C. Todas as reações de transcrição reversa citadas ocorreram no termociclador Verity da Applied Biosystems.

3.6.2 PCR para amplificação dos genes da NA

Foram amplificados os segmentos 4 e 6 do genoma do vírus influenza, que equivalem, respectivamente, aos genes da NA do subtipo de influenza A. A reação de PCR foi realizada seguindo o protocolo do HPA de Londres. A mistura da reação está detalhada na tabela 2 e os iniciadores utilizados descritos na tabela 3.

Tabela 2 - Reagentes para amplificação dos genes HA e NA

| Reagentes | Concentrações |
|------------------------------------|------------------|
| Água RNA/DNase free | - |
| Tampão | 10x |
| <i>Primer</i> direto | 10 pmol/ μ L |
| <i>Primer</i> reverso | 10 pmol/ μ L |
| Mistura de dNTPs | 10 mM |
| MgSO ₄ | 50 mM |
| <i>Platinum</i> pfx DNA polimerase | 2.5 U/ μ L |
| cDNA | 100 ng/ μ L |
| Volume final | 50 μ L |

Tabela 3 - Relação dos iniciadores utilizados para amplificação dos genes da NA

| NA | | |
|----------|------------|-----------------------|
| Código | Sentido | Sequência 5'-3' |
| N2-550F | Senso | ATGGTCCAGCTCAAGTTGTCA |
| N2-1430R | Antissenso | TAGGCATGAGATTGATGTCC |

Após a desnaturação durante 10 minutos a 94°C, foram realizados 35 ciclos de 94°C/30 segundos, 55°C/30 segundos e 68°C/2 minutos, que correspondem aos processos de desnaturação, hibridização e extensão, respectivamente. E, finalmente, a extensão final se deu a 68°C durante 10 minutos. Os produtos da reação de PCR, juntamente com os *primers* para sequenciamento (AH3II – GCTTCCATTTGGAGTG/ N2-645 – CCATCGTAAATGAAGCTAGC) foram

enviados para a empresa GenScript® para que o sequenciamento propriamente fosse realizado lá. Subsequentemente, os eletroferogramas foram analisados com o programa Sequencher 5.4.6. As sequências foram então alinhadas através do *software* MEGA-X e, comparadas com o intuito de buscar diferenças entre as sequências da última passagem e da NA isolada de sobrenadante sem tratamento com a agatisflavona.

3.7 Ensaio in silico

Para estudarmos o possível sítio de ligação da agatisflavona na NA viral, foi realizado um ensaio de *docking in silico*. A estrutura da agatisflavona foi desenhada no *software* Accelrys Draw 4.1 (Accelrys, Inc)®. O composto foi então “docado” em toda a proteína, utilizando a opção "Dock a Ligand" do *software* Arguslab 4.0.1 (Planaria Software LLC). Foram utilizadas as estruturas cristalizadas das NAs tipo 2 (N2) com mutação de resistência ao OST (PDB - 1L7G) e selvagem (PDB – 4GZP), NAs tipo 1 (N1) com mutação de resistência ao OST (PDB – 3CI0) e selvagem (PDB – 3TI6) e NA proveniente do vírus influenza B selvagem (PDB – 4CPM). Todas foram obtidas através do Protein Data Bank e possuíam o OST ligado ao seu sítio de ligação. Não há estrutura cristalizada da proteína NA resistente ao OST do vírus influenza B armazenada no Protein Data Bank. Antes do docking, a estrutura das proteínas foi “limpa” através da remoção de moléculas de água e ligantes externos, com exceção do OST. As estruturas alteradas foram salvas no formato pdb para serem utilizadas em todos os estudos *in silico*. O resultado foi analisado através do *software* PoseView®.

3.8 Ensaio de avaliação do efeito da agatisflavona in vivo

Para avaliar se o composto agatisflavona possui atividade anti-influenza *in vivo*, foram realizados ensaios com camundongos C57bl/6 (machos) de 8 a 12 semanas. Os animais foram separados em quatro grupos, com 10 camundongos cada: 1. Grupo controle, infectado com o vírus influenza e não tratado com a agatisflavona; 2. Grupo infectado e tratado com 10 mg/kg do composto; 3. Grupo infectado e tratado com 50 mg/kg do composto; 4. Grupo infectado e tratado com 100 mg/kg do composto.

Primeiramente, os animais foram pesados e seus pesos foram registrados para cálculo da quantidade de anestésico, volume da solução preparada com o nosso composto para o tratamento dos animais e para acompanhamento do peso pós-infecção e tratamento. Estes foram anestesiados por via intra-dérmica com 15 mg/kg de cetamina e 0.6 mg/kg de xilazina. Em seguida, os animais foram inoculados com o vírus influenza A/H1N1 adaptado a camundongo (PR8) por via intranasal. Após 3h de infecção, foi administrada uma dose única, por via oral, de agatisflavona em diferentes concentrações (10, 50 ou 100 mg/kg). Os animais foram então acompanhados diariamente, durante oito dias, sendo avaliada a mortalidade e a perda de peso destes animais.

O CEUA utilizado para adquirir os animais foi o 050-2015 "Estudo da imunomodulação durante a infecção pelo vírus influenza A na seleção da resistência a antivirais".

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da Agatisflavona sobre a atividade da NA

Inicialmente avaliamos a atividade anti-NA da molécula agatisflavona em uma concentração única (50 μ M). Neste ensaio sem células, foram utilizadas três cepas de influenza, duas do tipo A (H3N2 ENG e H1N1pdm09) e uma do tipo B (Perth/211/2011), além do composto de referência OST (na concentração de 1 μ M), utilizado como um controle. Então, a partir deste experimento, foi possível calcular a porcentagem de inibição da atividade da NA, das cepas testadas, que o tratamento com o nosso composto foi capaz de gerar: 91% para o H3N2 e influenza B e, 89 % para o H1N1 (Tabela 4). Já que o nosso composto foi capaz de inibir consideravelmente a atividade da NA das cepas mencionadas, foram realizados mais testes com concentrações diversificadas e também com outras cepas.

Tabela 4 - Porcentagem de Inibição da atividade da NA dos vírus influenza A/H3N2, A/H1N1 e B após tratamento com Agatisflavona e OST

| Cepas de Influenza | Inibição da atividade da NA (%) | |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------|
| | Agatisflavona | OST |
| A/England/72/H3N2-like | 91 \pm 0,5 | 99 \pm 0,05 |
| A/California/07/2009/H1N1-like | 89 \pm 1,9 | 97 \pm 0,31 |
| B/Perth/211/2001 | 91 \pm 2,7 | 99 \pm 0,02 |

Subsequentemente ao ensaio anterior, a agatisflavona foi submetida ao mesmo tipo de teste, contudo, desta vez utilizando mais concentrações, a fim de calcular o seu IC₅₀ (concentração que inibe em 50% a atividade da NA) e também cepas de influenza com mutações de resistência ao OST. Neste ensaio, foram comparadas as variações no valor do IC₅₀ observado para cada composto em cepas sensíveis e resistentes ao fármaco de referência (Tabela 5). Desta forma, foi observado que a molécula alvo deste trabalho apresentou uma mudança menor nos seus valores de IC₅₀ (correlacionando cepas sensíveis com as resistentes), em comparação com OST, apesar de mostrar-se menos potente que o mesmo em todas as cepas de influenza testadas. Assim, pode-se concluir que a agatisflavona possui a capacidade inibição da atividade da NA não só de cepas sensíveis como de cepas com mutações de resistência ao OST.

Tabela 5 - Potência de Inibição da atividade da NA (IC₅₀) da Agatisflavona e do OST em cepas selvagens e com mutações de resistência ao OST

| Cepas de Influenza | IC ₅₀ | | Alteração no valor do IC ₅₀ (média IC ₅₀ resistente/IC ₅₀ sensível) | |
|--------------------|--------------------|--------------|---|--------|
| | Agatisflavona (µM) | OST (nM) | Agatisflavona | OST |
| A/H3N2 selvagem | 19,8 ± 2,6 | 0,04 ± 0,005 | NA | NA |
| A/H3N2 E119V | 2,1 ± 0,58 | 2,58 ± 1,04 | 0,11 | 64,50 |
| A/H1N1 selvagem | 27,8 ± 1,7 | 0,08 ± 0,024 | NA | NA |
| A/H1N1 H275Y | 3,4 ± 0,91 | 11,23 ± 1,52 | 0,12 | 140,38 |
| B selvagem | 19,3 ± 3,8 | 1,38 ± 0,006 | NA | NA |

NA – não se aplica

4.2 “Docking” *in silico* em diferentes tipos de NA

Como foi constatado que a agatisflavona possui a capacidade de inibir a atividade da NA, tanto em cepas selvagens de influenza, quanto em cepas com mutações de resistência ao OST, foi realizado um ensaio de “docking” do nosso composto interagindo com diversos tipos de NA. Neste experimento, foi verificado que a molécula em questão foi capaz de se ligar aos distintos tipos de NA testados (N1 WT, N1 R, N2 WT, N2 R e NB), estabelecendo interações com os resíduos de aminoácidos das proteínas (figura 13). Dessas interações entre a molécula testada e as proteínas virais vale ressaltar as ligações de hidrogênio e as ligações do tipo Pi-stacking, que têm relação com os anéis aromáticos, característica dos biflavonoides. Além disso, foi notado que o sítio de ligação da agatisflavona não é semelhante ao do OST, ou seja, ela não se liga na mesma região do sítio ativo da enzima.

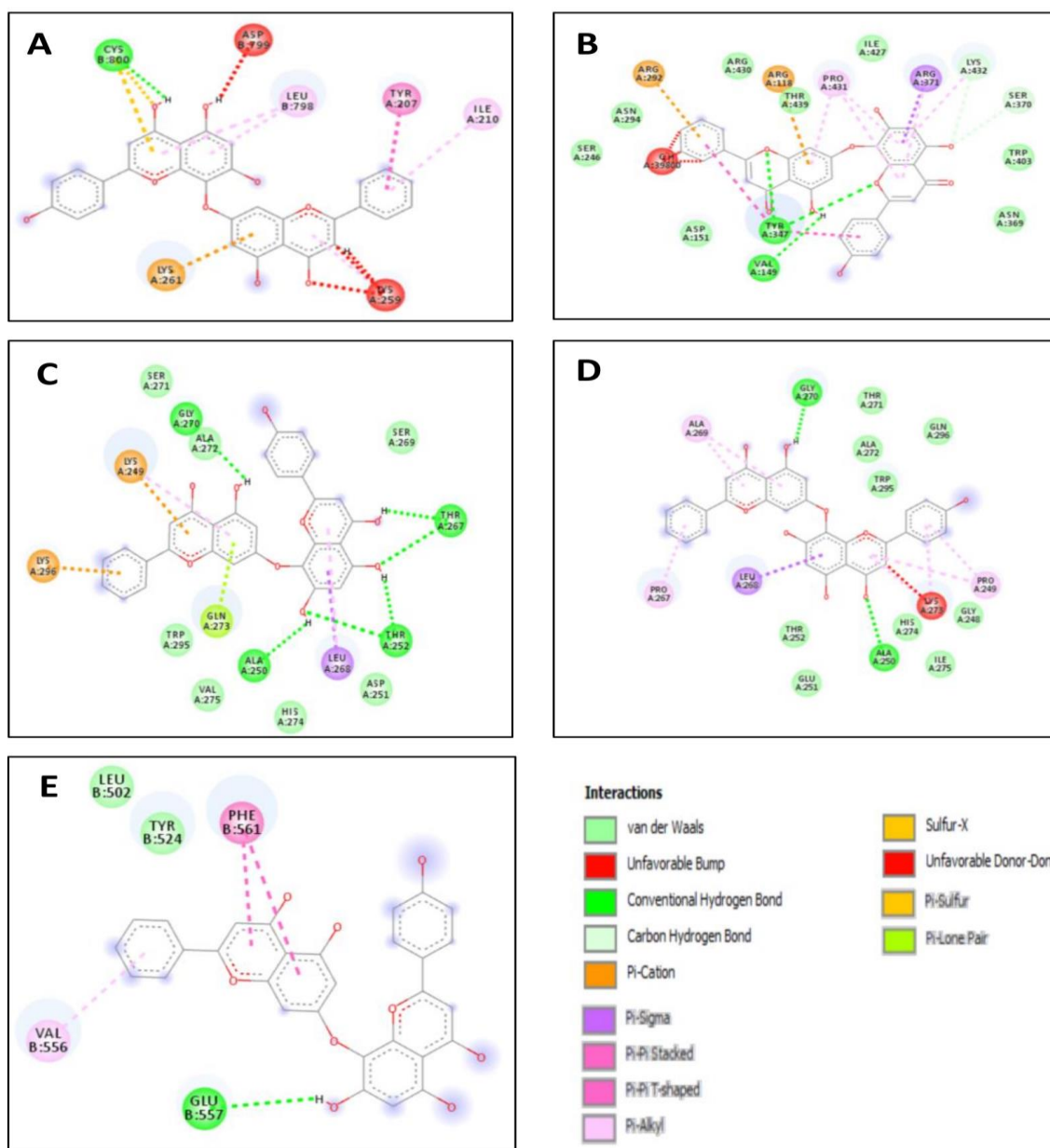


Figura 13 - "Docking" *in silico* da Agatisflavona em diferentes tipos de NA.

Figuras esquemáticas 2D da estrutura da Agatisflavona acoplada a diferentes isoformas de NA: tipo 1 selvagem (**A**), com mutações de resistência ao OST (**B**), NA do tipo 2 selvagem (**C**) e resistente ao OST (**D**), do tipo B (**E**) e as interações entre da sua estrutura com aminoácidos da NA.

Ademais, a partir do mesmo ensaio, foi possível também averiguar a energia de ligação (em Kcal/mol) necessária para que a agatisflavona se ligue aos diversos tipos de NA testados e comparar com o OST (Tabela 6). Pode-se destacar que os valores encontrados para o nosso composto foram comparáveis aos exibidos pelo OST, indicando que os dois se ligam "mais espontaneamente" às isoformas de NA testadas (valores entre -9.88 e -7.44).

Outrossim, foram analisadas as ligações de hidrogênio estabelecidas entre os compostos testados e os distintos gêneros de NA, ressaltando também quais os aminoácidos envolvidos nestas (Tabela 6). Neste caso, notou-se que o OST estabelece um número maior de ligações de hidrogênio que a agatisflavona, na qual o maior número de ligações observado foi de 4 com a isoforma N2 WT, enquanto para o OST foram exibidas 10 ligações para o mesmo subtipo de NA. Portanto, a molécula estudada neste trabalho parece ser mais fraca que o composto de referência.

Tabela 6 - Análise do ensaio *in silico* (energia de ligação, ligações de H e resíduos de aminoácidos nessas ligações)

| Tipo de NA | Agatisflavona | | | OST | | |
|-----------------------|-------------------------------|---------------------|---|-------------------------------|---------------------|--|
| | Energia de ligação (Kcal/mol) | Nº de Ligações de H | Resíduos de aminoácidos envolvidos em ligações de H | Energia de ligação (Kcal/mol) | Nº de Ligações de H | Resíduos de aminoácidos envolvidos em ligações de H |
| N1 (WT/PDB – 3TI6) | -8.50 | 1 | Cys 800 | -7.44 | 6 | Arg 188, 152, 292, 371; Glu 119; Asp 151 |
| N1 (H275Y/PDB – 3CL0) | -9.88 | 2 | Tyr 347, Val 149 | -7.98 | 7 | Arg 118, 152, 292, 371; Glu 119; Tyr 347 |
| N2 (WT/PDB – 4GZP) | -8.13 | 4 | Ala 250; Gly 270; Thr 252, 267 | -8.57 | 6 | Glu 119; Asp 151; Arg 152, 282, 371 |
| N2 (E119V/PDB – 1L7G) | -8.93 | 2 | Ala 250, Gly 270 | -8.20 | 10 | Arg 118, 152, 292, 371; Asp 151; Trp 178; Glu 227; Tyr 406 |
| NB (WT/PDB – 4CPM) | -9.16 | 1 | Glu 557 | -7.99 | 7 | Arg 115, 149, 291, 373; Glu 116; Asp 148 |

4.3 Efeito Inibitório *in vitro*, Citotoxicidade e Índice de Seletividade (SI) da Agatisflavona

Para avaliação da potência da agatisflavona *in vitro*, foram realizados ensaios em células MDCK que foram infectadas com o vírus influenza A/H3N2, tratadas com algumas concentrações do nosso composto e, posteriormente, o título viral de cada condição do experimento foi verificado e, então, foi calculado o EC₅₀ (concentração que inibe em 50% a replicação do vírus). Neste ensaio também foi utilizado o composto de referência OST e os valores de EC₅₀ observados encontram-se na Tabela 7. A partir desse ensaio pode-se observar que o nosso composto apresenta também a capacidade de inibir a replicação viral *in vitro*.

Tabela 7 – Potência *in vitro*, citotoxicidade e Índice de Seletividade da Agatisflavona e do OST

| Composto | EC ₅₀ (μM) | CC ₅₀ (μM) | SI (CC ₅₀ /EC ₅₀) |
|---------------|-----------------------|-----------------------|---|
| Agatisflavona | 1,3±0,5 | 349±17,5 | 205,3 |
| OST | 0,03±0,0023 | 2132 | 66625 |

Ainda sobre os ensaios *in vitro* com células MDCK, foi também avaliada a citotoxicidade da agatisflavona, a fim de calcular o seu CC₅₀ (concentração que mantém 50% das células viáveis), valor descrito na Tabela 7. Apesar, do seu CC₅₀ ser inferior ao do composto de referência, a molécula alvo deste trabalho também apresenta um baixo grau de citotoxicidade.

Com os valores de EC₅₀ e CC₅₀, foi possível verificar o grau de segurança para utilização *in vitro*, denominado índice de seletividade (SI, do inglês “Selectivity Index”), do nosso composto. Esse cálculo é feito a partir da razão entre os valores de CC₅₀ e EC₅₀ e o valor encontrado está exposto da Tabela 7. O SI da agatisflavona indica que a mesma é segura para utilização *in vitro*, visto que existe uma margem de mais 260 vezes entre os valores de EC₅₀ e CC₅₀.

4.4 Efeito do tratamento combinado de Agatisflavona e OST *in vitro*

Com base nos resultados de “docking” (tópico 4.2) que demonstraram que os sítios de ligação do nosso composto e o de referência são distintos, foi realizado um experimento para averiguar a possibilidade de atividade sinérgica entre as duas substâncias. Neste, células MDCK foram infectadas com o vírus influenza A/H3N2 e tratadas com duas concentrações de cada composto, concomitante ou separadamente e foi então realizada uma análise da porcentagem de inibição da replicação viral (Figura 14). A menor condição de tratamento de agatisflavona apresentou uma porcentagem de inibição de $12,9\pm 0,09\%$, a maior de $86,82\pm 0,02\%$, a menor de OST $98,8\pm 0,04\%$, a maior $99,45\pm 0,03\%$ e ambas as combinações entre os compostos inibiram $90\%\pm 0,06\%$ da replicação viral *in vitro* ($n=3$).

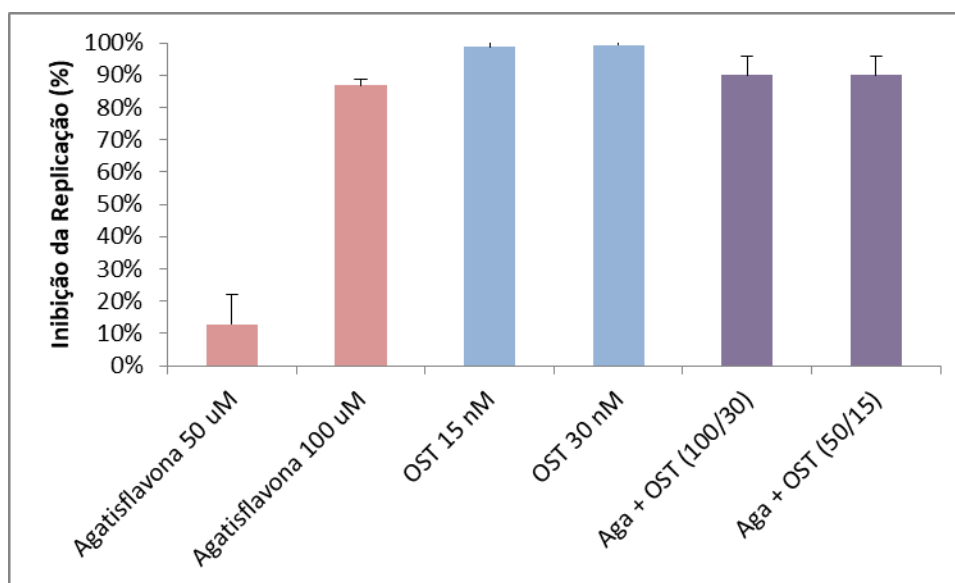


Figura 14 – Tratamento combinado de agatisflavona com o composto de referência OST.

Células MDCK foram semeadas em placas de 24 poços (10^5 células/poço), infectadas com o vírus influenza A/H3N2 e tratadas com duas concentrações diferentes de Agatisflavona e OST e também com os dois compostos combinados nas maiores ou menores concentrações de cada um. Após 24h de incubação, o sobrenadante foi coletado e depois titulado pelo método de $TCID_{50}/100 \mu L$.

A partir desse ensaio foi possível verificar que o tratamento combinado com agatisflavona e OST não supera a eficiência do tratamento somente com o segundo, portanto, aparentemente, não existe um efeito sinérgico entre os dois compostos. Também pode-se inferir que, a partir desse ensaio, não é possível descrever com propriedade qual o efeito gerado pelo tratamento combinado dos dois compostos, sendo necessária a repetição do mesmo com mais concentrações de ambos e outras análises.

4.5 Efeito de passagens sequenciais do vírus e tratamento com Agatisflavona em possíveis mutações de resistência

Com a finalidade de avaliar se existe a possibilidade de o tratamento com o nosso composto gerar mutações de resistência na cepa viral testada, foram realizadas cinco passagens sequenciais com concentrações até 4 vezes o valor do IC₅₀ da agatisflavona para o A/H3N2 (19,8 µM). Foram encontradas 3 mutações nos aminoácidos: R-249, A-250 e A-253, as quais representaram uma substituição de arginina por serina, alanina por serina e arginina por glutamina, respectivamente. Aparentemente, essas mutações não comprometem o fitness viral. Contudo, por configurarem, não só mudanças drásticas nos aminoácidos que compõem a NA da cepa viral testada foram observadas, mas também um aumento na porcentagem de replicação quando maiores concentrações de agatisflavona foram utilizadas e, ao reduzir a concentração, notou-se uma redução novamente na replicação (Figura 15). Assim, conclui-se que, apesar de terem sido identificadas mutações de resistência à molécula testada, essa mutação parece ser reversível.

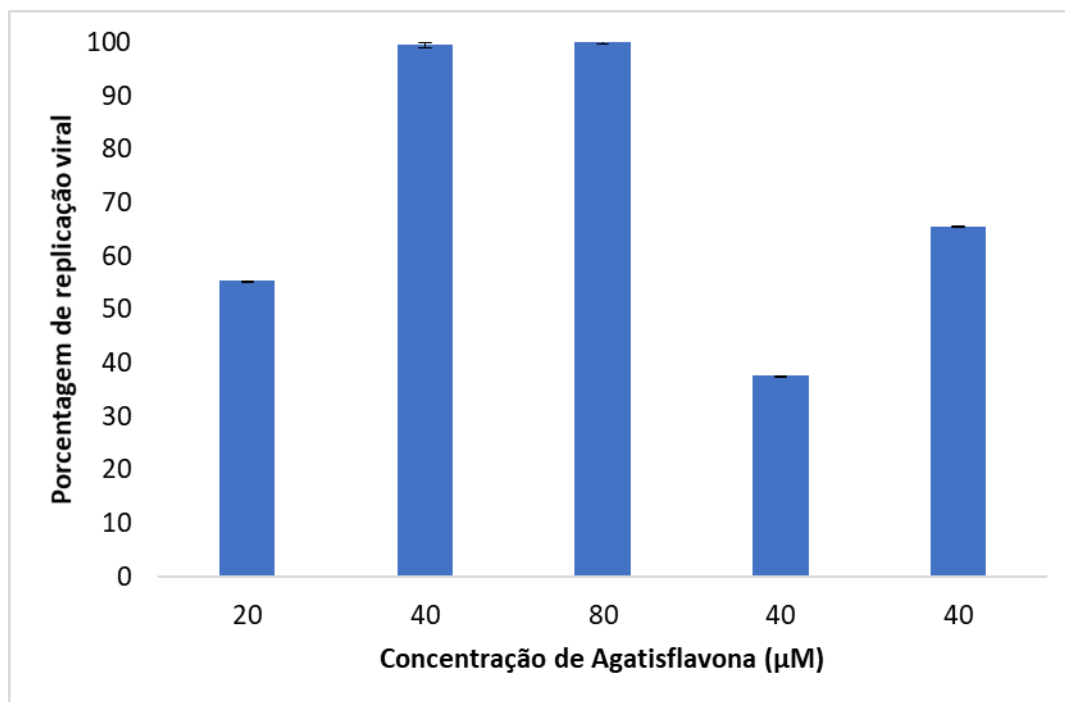


Figura 15 - Porcentagem de replicação viral em cada passagem sequencial do vírus na presença da agatisflavona.

Foram realizadas passagens sequenciais do vírus influenza A H3N2 na presença de concentrações crescentes de agatisflavona. Na primeira passagem foi utilizada uma concentração de 20 μM , na segunda o 40 μM , na terceira 80 μM e na quarta e quinta passagens 40 μM novamente.

4.6 Impacto do tratamento com Agatisflavona *in vivo*

Para avaliação do efeito da agatisflavona *in vivo*, foi realizado um ensaio piloto com camundongos C57bl/6. Neste, os animais foram tratados com uma dose única do nosso composto e o seu peso foi observado, diariamente, durante 8 dias (Figura 16).

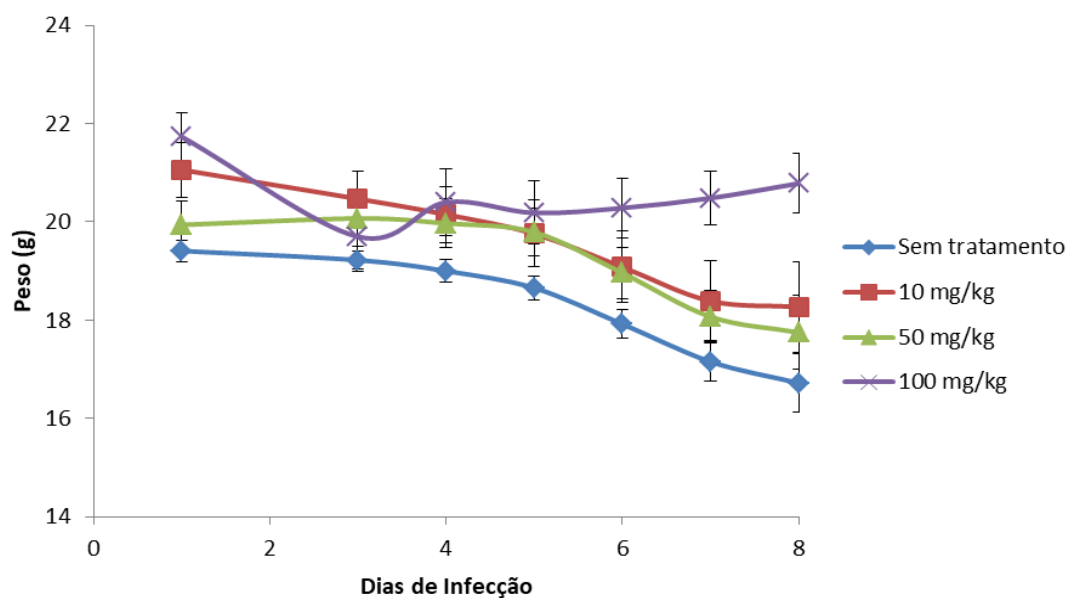


Figura 16 – Efeito do tratamento com Agatisflavona *in vivo*

Camundongos C57bl/6 foram infectados com o vírus influenza A/H1N1 (PR8 – cepa adaptada) e tratados com uma dose única de agatisflavona (10, 50 ou 100 mg/Kg). Cada grupo tinha 10 animais e, além dos grupos nos quais foi realizado tratamento, também se manteve um (grupo) controle somente infectado. Esses animais foram observados por 8 dias com o intuito de avaliar a perda de peso no decorrer da infecção. $p < 0,05$.

A partir deste ensaio foi possível verificar que o tratamento com a agatisflavona foi capaz de reduzir a perda de peso que a infecção causa nos animais. Inclusive, nos animais tratados com a maior concentração do composto, houve uma prevenção dessa perda de peso nos dias subsequentes aos três dias iniciais de infecção e não somente uma redução da mesma.

5 DISCUSSÃO

A busca por novas moléculas com atividade anti-influenza é uma questão fundamental e os produtos naturais representam uma ampla fonte de compostos com atividade biológica, configurando desta forma um grupo interessante para aprofundamento de pesquisa, visando o isolamento de compostos ativos que podem se tornar fármacos (43). Dentro deste contexto, levando-se em consideração a alta diversidade da flora brasileira e como muitas espécies ainda têm seu potencial antiviral pouco estudado ou desconhecido, foi realizada uma coleta de amostras de diferentes partes da *Anacardium occidentale* (cajuzeiro) no município de Igarapé-Miri (PA) e, a partir desta coleta, uma triagem de extratos foi guiada por meio de ensaios de inibição da NA. Desses extratos o que se destacou foi o proveniente das folhas e, o mesmo foi purificado de forma que a molécula “final” com maior potencial anti-influenza foi a agatisflavona, um biflavonoide.

Os primeiros ensaios com a agatisflavona demonstraram a sua capacidade de inibição da atividade da NA, tanto em concentração única em cepas sensíveis ao OST, quanto frente a cepas com mutações de resistência ao OST. Esta habilidade representa uma vantagem para o nosso composto, visto que, no caso, de um aumento na prevalência dessas cepas resistentes, a molécula exibe um potencial para se tornar um antiviral. Ainda, quando calculado o IC₅₀, pode-se notar que, nas cepas com mutações de resistência, foi observada uma diminuição de 9,4 e 8,2 nos valores de IC₅₀ da agatisflavona na inibição da atividade da NA dos vírus influenza A H3N2 e H1N1 com mutações de resistência ao OST, respectivamente, sugerindo uma potência maior da mesma nas cepas resistentes em comparação com as sensíveis ao OST.

Além disso, a partir dos testes realizados *in vitro*, foi possível calcular o EC₅₀ e o CC₅₀ do nosso composto. A agatisflavona se mostrou menos potente que o composto de referência no ensaio com células MDCK e ao analisar o resultado do ensaio de citotoxicidade, a molécula apresentou um alto valor de CC₅₀ (349 ± 17,5 µM), sendo, portanto, considerada pouco tóxica para as células. A partir desses valores foi possível calcular o SI do composto, que apesar de ser menor que o observado para o OST, ainda pode ser considerado bastante seguro para utilização *in vitro*, vide a margem, de 347,7 µM, existente entre os valores de CC₅₀ e EC₅₀. Dados da literatura corroboram com os resultados em relação à potência do

composto de origem natural testado, tendo em vista que fitoquímicos são, comumente, menos potentes que moléculas com outras origens (principalmente sintética) (48). Desta forma, considerando-se a necessidade de novas moléculas com atividade antiviral promissora, este composto representa uma alternativa favorável.

Posteriormente, levando em consideração a capacidade da agatisflavona de inibir a atividade da NA de cepas sensíveis e resistentes ao OST, foram realizados ensaios de “docking” *in silico*. Nestes, o nosso composto foi acoplado em diferentes isoformas de NA (1 e 2 WT e resistente e B WT) com baixa energia de ligação, indicando que a molécula se liga mais espontaneamente às diferentes NAs testadas. Inclusive, nosso composto exibiu valores de energia livre de ligação inferiores ao do OST, sugerindo que a agatisflavona apresenta maior afinidade com as isoformas de NA, já que quanto menor a energia de ligação, melhor a conformação do complexo formado (71).

Ainda sobre o ensaio *in silico*, foram realizadas análises das interações observadas entre a estrutura da agatisflavona e resíduos de aminoácidos das isoformas de NA testadas. Nesse outro “set” de investigação do “docking”, podem ser destacadas as ligações de hidrogênio e as ligações do tipo Pi (envolvendo os anéis aromáticos), o que confere maior estabilidade para a interação (72). Contudo, apesar de o nosso composto, aparentemente estabelecer uma ligação estável com a NA do vírus, o OST apresenta um número maior de interações a partir de ligações de hidrogênio, o que, possivelmente, torna o seu acoplamento à enzima ainda mais estável que a agatisflavona. Vale ressaltar que o “docking” foi realizado com a estrutura do OST ligada ao sítio ativo das enzimas testadas, assim pode-se concluir que a nossa molécula não se liga no mesmo local, do sítio ativo da enzima, que o OST.

O sítio ativo da NA é extremamente conservado e exibe uma natureza altamente polar (32). A maior parte dos inibidores mais potentes têm uma parte da sua estrutura constituída por um ácido carboxílico negativamente carregado, e fazem ligações fortes com três resíduos de Arginina que formam um lado do sítio ativo (32). Do lado oposto, inibidores com parte de sua estrutura composta por um grupamento N-acetil, realizam interações hidrofóbicas e polares com Arginina 152, Triptofano 178 e Leucina 222 (32). O restante do sítio ativo pode ser dividido em três subsítios: “bolso” 1, com resíduos altamente polares que interagem com o fragmento constituído por glicerol do substrato, também é capaz de realizar interações

hidrofóbicas; “bolso 2”, é pequeno e característico de um sítio de ligação hidrofóbico, além de não ser utilizado pelo substrato (ácido siálico); e o “bolso” 3 com caráter polar devido à presença dos resíduos de aminoácido Glutamato 119, Asparagina 151 e Glutamato 227 (32). Sabe-se que OST interage com o “bolso” 1, portanto efetuando interações polares e hidrofóbicas, assim, possivelmente este pode ser um dos motivos pelos quais, mesmo não se ligando tão espontaneamente, como a agatisflavona, sua potência antiviral seja elevada. De acordo com a estrutura da agatisflavona que confere um caráter mais hidrofóbico à mesma, é possível que esta molécula interaja com o “bolso” 2 da NA, mas para averiguação desta hipótese, outros testes são necessários.

Outros fatores relevantes que podem ser levados em consideração são as constantes de associação (k_{on}) e dissociação (k_{off}) das enzimas, existe a possibilidade de o OST possuir uma constante de equilíbrio com valor maior e, portanto, a ligação que este inibidor estabelece com a NA é mais forte que a convencionalizada pela agatisflavona.

Por consequência do ensaio *in silico*, foi verificado que os compostos OST e agatisflavona não interagem com a mesma região da NA, podendo assim existir um efeito sinérgico no tratamento combinado com os dois, desta forma, foi realizado um ensaio para averiguação dessa possibilidade. A partir deste experimento não foi possível avaliar com propriedade se os compostos atuam sinergicamente, sendo necessária a repetição do mesmo com um número maior de variáveis: mais concentrações dos compostos utilizados no tratamento tanto combinados quanto separadamente.

Foram realizados ensaios com passagens sequenciais do vírus e tratamento com o nosso composto para possível geração de cepas com mutações de resistência à agatisflavona. Após cinco passagens com tratamento de até quatro vezes o valor do IC_{50} da molécula, foram observadas três mutações na NA (R-249, A-250 e A-253). Segundo *Ferraris* (2008), oito aminoácidos estão associados ao sítio catalítico da enzima NA devido ao contato direto com o substrato ou porque são fundamentais para o *fitness* viral, são eles R-118, D-151, R-152, R-224, E-276, R-292, R-371 e Y-406 (73). Além destes, outros onze têm relação com a estabilidade da estrutura do sítio ativo da proteína viral (E-119, R-156, W-178, S-179, D198, 1-222, E-227, E-277, N-294, e E-425) (73). Assim, como as mutações encontradas no genoma da cepa viral testada não compreenderam nenhum dos aminoácidos supracitados, infere-se que o tratamento continuado com a agatisflavona, a princípio,

não é capaz de gerar mutações que comprometem o *fitness* viral. Contudo, por constituírem mudanças drásticas de aminoácidos e por ter sido observado um aumento da porcentagem de replicação quando a concentração de agatisflavona utilizada foi mais alta, essas mutações podem ser consideradas como de resistência. Porém, como, ao reduzir a concentração da droga nas passagens subsequentes, foi notado uma redução na porcentagem de replicação (comparável à observada com as menores concentrações no tratamento), essa resistência aparenta ser reversível, o que configura um ponto positivo neste âmbito.

Para verificação da atividade anti-influenza *in vivo* da agatisflavona foi realizado um ensaio piloto em camundongos. A perda de peso é um dos parâmetros utilizados para avaliar a severidade da infecção causada pelos vírus influenza (74, 75). Portanto, neste teste, a perda de peso dos animais foi analisada frente à infecção e tratamento com dose única do nosso composto. A partir deste ensaio foi possível comprovar que o biflavonoide testado apresenta capacidade de inibição da replicação viral também *in vivo*, tendo em vista que o tratamento foi responsável por uma menor perda de peso, em relação aos animais somente infectados, nas condições de concentração inferiores e, na maior foi observado, inclusive, um aumento do peso dos animais. Outros parâmetros precisam ser avaliados *in vivo*, contudo, com os resultados encontrados pode-se inferir que o nosso composto não atua somente *in vitro*.

Diante do exposto, pode-se concluir que a agatisflavona é um molécula promissora para o desenvolvimento de um possível antiviral e, mesmo não sendo mais potente que o composto de referência, está dentro da classificação considerada boa em relação a flavonoides com capacidade de inibição da NA ($IC_{50} < 40 \mu M$) (12). Ademais, vantagens como ser um derivado de produto natural, inibir cepas resistentes ao OST e atuar também *in vivo* constituem perspectivas favoráveis para o aprofundamento do estudo desse biflavonoide no tratamento de infecções causadas pelos vírus influenza.

6 CONCLUSÕES

A molécula, biflavonoide, agatisflavona:

- Inibe a atividade da neuraminidase dos vírus influenza, tanto em cepas sensíveis, quanto resistentes ao composto de referência, OST;
- Liga-se às distintas isoformas de NA com baixa energia de ligação, portanto, mais espontaneamente;
- É pouco citotóxico para células MDCK;
- Inibe a replicação do vírus influenza H3N2 *in vitro*;
- Não exibe resistência cruzada com o OST;
- Possui a capacidade de minimizar os efeitos do vírus *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DOU D, *et al.* Influenza A virus Cell entry, Replication, virion Assembly and Movement. *Frontiers in Immunology*. 2018.
2. Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E. Introduction to molecular biology of influenza a viruses. *Acta Biochimica Polonica*. 2014.
3. FUJIKURA D, MIYAZAKI T. Programmed Cell Death in the Pathogenesis of Influenza. *International Journal of Molecular Sciences* 2018. p. 2065.
4. McFee RB. Emerging Respiratory Disease - Influenza Virus Overview. *Disease-a-Month* 2017. p. 240-78.
5. CDC. Images of Influenza Viruses. 2014 [Available from: <https://www.cdc.gov/flu/images/virus/fluvirus-antigenic-characterization-medium.jpg>].
6. TONG *Sea*. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathogens*. 2013. p. e1003657.
7. BENTON DJ *ea*. Influenza hemagglutinin membrane anchor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018. p. 109 -127.
8. WONG S, WEBBY RJ. Traditional and new influenza vaccines. **Clinical microbiology reviews** , v. 26, n. 3, p. 476-92.
9. WEIS *Wea*. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature*. 1988. p. 426.
10. SKEHEL JJ, WILEY DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry* 2000. p. 531-69.

11. AIR GM. Influenza neuraminidase. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2012. p. 245-56.
12. GRIENKE U, SCHMIDTKE M, VON GRAFENSTEIN S, KIRCHMAIR J, LIEDL KR, ROLLINGER JM. Influenza neuraminidase: A druggable target for natural products. *Natural product reports*. 2012. p. 11-36.
13. WOHLBOLD TJ, KRAMMER F. In the shadow of hemagglutinin: a growing interest in influenza viral neuraminidase and its role as a vaccine antigen. *Viruses*. 2014. p. 2465-94.
14. HIRST GK. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*. 1941. p. 22-3.
15. GOTTSCHALK A. Neuraminic acid: the functional group of some biologically active mucoproteins. *Yale J Biol Med*. 1956. p. 525-37.
16. DE GRAAF M, FOUCHIER RAM. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *The EMBO Journal*. 2014. p. 823-41.
17. PLESCHKA S. Overview of influenza viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2013. p. 1-20.
18. MEDINA RA, GARCÍA-SASTRE A. Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews Microbiology*. 2011. p. 590.
19. Taubenberger JK, Morens DM. The Pathology of Influenza. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:499-522.

20. Lumen. Virulence Factors of Bacterial and Viral Pathogens|Microbiology. 2018 [Available from: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/virulence-factors-of-bacterial-and-viral-pathogens/>].
21. GORDON A, REINGOLD A. The Burden of Influenza: a Complex Problem. Current Epidemiology Reports. 2018. p. 1-9.
22. Saúde Md. Síndrome Gripal/SRAG - Classificação de Risco e Manejo do Paciente. 2013.
23. Saúde Md. Informações Técnicas e Recomendações sobre a Sazonalidade da Influenza 2018. 2018 [Available from: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/gripe/informacoes-tecnicas>].
24. PARRISH CR, MURCIA PR, HOLMES EC. Influenza A virus reservoirs and intermediate hosts: dogs, horses, and new possibilities for human infections. Journal of virology. 2014.
25. MORENS DM, TAUBENBERGER JK. Pandemic influenza: certain uncertainties. Reviews in medical virology. 2011. p. 262-84.
26. TAUBENBERGER JK, KASH JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. Cell host & microbe. 2010. p. 440-51.
27. TAUBENBERGER JK, MORENS DM. Pandemic influenza - including a risk assessment of H5N1. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics); 2009. p. 187 -202.
28. VALLERON A, et al. Transmissibility and geographic spread of the 1889 influenza pandemic. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010. p. 00886.

29. SKOG L, et al. Spatiotemporal characteristics of pandemic influenza. BMC infectious diseases. 2014. p. 378.
30. WATANABE Y, et al. The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). Trends in microbiology. 2012. p. 11-20.
31. SUTTON T. The Pandemic Threat of Emerging H5 and H7 Avian Influenza Viruses. Viruses. 2018. p. 461-82.
32. Lew W, Wang MZ, Chen X, Rooney JF, Kim C. Neuraminidase Inhibitors as Anti-Influenza Agents. In: Clercq ED, editor. Antiviral Drug Strategies. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. 2011. p. 351-76.
33. TREURNICHT FK, et al. Replacement of neuraminidase inhibitor susceptible influenza A (H1N1) with resistant phenotype in 2008 and circulation of susceptible influenza A and B viruses during 2009 ,2013, South Africa. Influenza and other respiratory viruses. 2018.
34. WHO. Influenza (seasonal) World Health Organization (WHO) . 2018 [Available from: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))).
35. WHO. Up to 650.000 people die of respiratory diseases linked to seasonal flu each year. 2017 [Available from: <http://www.who.int/news-room/detail/14-12-2017-up-to-650-000-people-die-of-respiratory-diseases-linked-to-seasonal-flu-each-year> .
36. Saúde Md. Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2016: Ministério da Saúde; 2016 [Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-influenza> .

37. KOONIN LM, PATEL AAjoph, v. 108, n. S3, p. S215-S220, 2018. Timely Antiviral Administration During an Influenza Pandemic: Key Components. American journal of public health. 2018. p. S215-S20.
38. ISON MG. Antiviral treatments. Clinics in chest medicine. 2017. p. 139-53.
39. ROOSENHOFF R, et al. Influenza A/H3N2 virus infection in immunocompromised ferrets and emergence of antiviral resistance. PloS one. 2018. p. e0200849.
40. MASON S, et al. Comparison of antiviral resistance across acute and chronic viral infections. Antiviral Research. 2018.
41. DAVIDSON S. Treating Influenza infection, from now and into the future. Frontiers in immunology. 2018. p. 1-14.
42. GANJHU RK, et al. Herbal plants and plant preparations as remedial approach for viral diseases. Virus disease. 2015. p. 225-36.
43. KHWAZA V, OYEDEJI O, ADERIBIGBE B. Antiviral Activities of Oleanolic Acid and Its Analogues. Molecules. 2018. p. 2300.
44. XIAO S, et al. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. Medicinal research reviews. 2018. p. 951-76.
45. HOSSAN MS, et al. Antiviral activity of Embelia ribes Burm. f. against influenza virus in vitro. Archives of virology. 2018. p. 1-11.
46. MAKAU JN, et al. Antiviral Activity of Peanut (Arachis hypogaea L.) Skin Extract Against Human Influenza Viruses. Journal of medicinal food. 2018.

47. KHALIL H, et al. Guava flavonoid glycosides prevent influenza A virus infection via rescue of P53 activity. *Journal of medical virology*. 2018.
48. Cushnie T, A.J L. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005. p. 343-56.
49. ZAKARYAN H, et al. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of virology*. 2017. p. 2539-51.
50. ASHRAF MU, et al. *Cydonia oblonga* M., a medicinal plant rich in phytonutrients for pharmaceuticals. *Frontiers in pharmacology*. 2016.
51. YAN H, et al. Cirsimaritin inhibits influenza A virus replication by downregulating the NF- κ B signal transduction pathway. *Virology journal*. 2018. p. 88.
52. ROSCHEK JR B, et al. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection in vitro. *Phytochemistry*. 2009. p. 1255-61.
53. MEHRBOD P, et al. Immunomodulatory properties of quercetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside from *Rapanea melanophloeos* against influenza a virus. *BMC complementary and alternative medicine*. 2018. p. 184.
54. CHUNG S-T, et al. Synthesis and anti-influenza activities of novel baicalein analogs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2014. p. 415-21.
55. KIM HP, et al. Biochemical pharmacology of biflavonoids: implications for anti-inflammatory action. *Archives of pharmacal research*. 2008. p. 265-73.
56. COULERIE P, et al. Structure-activity relationship study of biflavonoids on the Dengue virus polymerase DENV-NS5 RdRp. *Planta medica*. 2013. p. 1313-8.
57. HUANG W-H, et al. A new biflavonoid with antiviral activity from the roots of *Wikstroemia indica*. *Journal of Asian natural products research*. 2012. p. 401-6.

58. ANDRADE AWL, et al. In vitro antioxidant properties of the biflavonoid agathisflavone. *Chemistry Central Journal*. 2018. p. 75.
59. VELAGAPUDI R, et al. Agathisflavone isolated from *Anacardium occidentale* suppresses SIRT1-mediated neuroinflammation in BV2 microglia and neurotoxicity in APPS we₂₃-transfected SH-SY5Y cells. *Phytotherapy Research*. 2018.
60. Konan NAea. Cytotoxicity of cashew flavonoids towards malignant cell lines. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2012. p. 435-40.
61. DE SOUSA LRF, et al. Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: Inhibition kinetics and docking studies. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2015. p. 466-70.
62. LIN Y-M, et al. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta medica*. 1999. p. 120-5.
63. KANG YK, et al. Evaluation of the field-protective effectiveness of seasonal influenza vaccine among Korean children aged < 5 years during the 2014-2015 and 2015-2016 influenza seasons: a cohort study. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2018.
64. SAMBALA EZ, et al. Burden of seasonal influenza in sub-Saharan Africa: a systematic review protocol. *BMJ Open*. 2018. p. e022949.
65. JÄRHULT JD. Environmental resistance development to influenza antivirals: a case exemplifying the need for a multidisciplinary One Health approach including physicians. *Acta veterinaria Scandinavica*. 2018. p. 1-6.
66. MATOS AR, et al. Susceptibility of Brazilian influenza A (H1N1) pdm09 viruses to neuraminidase inhibitors in the 2014-2016 seasons: Identification of

strains bearing mutations associated with reduced inhibition profile. Antiviral research. 2018. p. 35-43.

67. Biosystems A. NA-Star® Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit. 2006 [Available from: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042610.pdf .

68. Promega. CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. 2016 [Available from: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol.pdf>.

69. PROMEGA. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. 2015.

70. QIAGEN. QIAamp® Viral RNA Mini Handbook. 2018.

71. DAMAYANTI DS, UTOMO DH, KUSUMA C. Revealing the potency of *Annona muricata* leaves extract as FOXO1 inhibitor for diabetes mellitus treatment through computational study. In silico pharmacology. 2017. p. 3.

72. FAN Y-B, et al. Design and synthesis of substituted pyrido [3, 2-d]-1, 2, 3-triazines as potential Pim-1 inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2016. p. 1224-8.

73. FERRARIS O, LINA B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. Journal of Clinical Virology. 2008. p. 13-9.

74. HAGAN RS, TORRES-CASTILLO J, DOERSCHUK CM. Myeloid TBK1 Signaling Contributes to the Immune Response to Influenza. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2018.

75. AN S, et al. Initial Influenza virus replication can be limited in allergic asthma through rapid induction of type III interferons in Respiratory epithelium. *Frontiers in immunology*. 2018. p. 1-14.