

Actividad antiviral de un extracto acuoso del alga roja *Laurencia obtusa* frente a virus influenza A y B

Antiviral activity of an aqueous extract from the red alga *Laurencia obtusa* against influenza A and B viruses

MSc. Amilcar Pérez-Riverol,^I Dr. Alexander Piñón Ramos,^{II} Luis Francisco Morier Díaz,^{II} Lic. Yuneysi Torres López,^{III} Téc. Dianeya Mendoza Llanes,^{II} Dra. Gloria del Barrio Alonso^{IV}

^I Laboratorio de Biología Molecular. Dpto de Biología. Instituto de Biociencias. Universidad Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Rio Claro-SP, Brasil.

^{II} Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Influenza. Departamento de Virología. Laboratorio de Cultivo de Células. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

^{III} Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR), La Habana, Cuba.

^{IV} Grupo de Antivirales Naturales. Dpto. de Microbiología y Virología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. Cuba.

RESUMEN

Introducción: la terapia antiviral frente a las infecciones provocadas por virus influenza se basa en empleo de inhibidores de las proteínas M2 y neuraminidasa (NA). Sin embargo, la emergencia de cepas estacionales resistentes a ambos grupos de fármacos motiva la búsqueda de nuevos fármacos anti-influenza. Los extractos de algas pueden ser utilizados como fuente para la obtención de estos compuestos, teniendo en cuenta la diversidad de metabolitos descrita en estos organismos.

Objetivo: evaluar la actividad antiviral *in vitro* de un extracto acuoso del alga roja *Laurencia obtusa* frente a virus influenza A (H1N1), A (H3N2) e influenza B.

Métodos: se evaluó la citotoxicidad en células MDCK, mediante cálculo de la viabilidad celular, en presencia de concentraciones crecientes del extracto. Los efectos sobre la replicación viral se cuantificaron mediante determinación de los niveles de la hemaglutinina (HA) y de la inhibición del efecto citopático (ECP). El índice selectivo (IS) se calculó a partir de la relación $IS = CC_{50} / CE_{50}$.

Resultados: el extracto acuoso de *Laurencia obtusa* posee actividad antiviral *in vitro* frente a virus influenza B, A (H3N2) y A (H1N1) con valores de IS de 7,73; 11,79 y 12,95; respectivamente.

Conclusiones: *Laurencia obtusa* inhibe la replicación de virus influenza de elevada importancia clínica. La realización de ensayos secundarios de caracterización de la actividad biológica, así como de caracterización molecular del extracto, podrían permitir el desarrollo de novedosos compuestos antivirales. Este trabajo constituye el primer informe de actividad inhibitoria de esta especie de macroalga frente a virus influenza.

Palabras clave: influenza, antiviral, *Laurencia obtusa*, extractos naturales, algas.

ABSTRACT

Introduction: antiviral therapy against infections caused by influenza viruses is based on the use of inhibitors of M2 protein and neuraminidase (NA). However, the emergence of seasonal strains resistant to both drug groups has led to the search for new anti-influenza medications. Extracts from algae may be used as a source of compounds, considering the diversity of metabolites described for these organisms.

Objective: evaluate the *in vitro* antiviral activity of an aqueous extract from the red alga *Laurencia obtusa* against influenza A (H1N1), A (H3N2) and B viruses.

Methods: cytotoxicity was evaluated in MDCK cells by cell viability estimation in the presence of growing concentrations of the extract. The effects over viral replication were quantified by determining hemagglutinin (HA) levels and inhibition of the cytopathic effect (CPE). The selective index (SI) was estimated by $SI = CC_{50}/CE_{50}$.

Results: the aqueous extract of *Laurencia obtusa* showed *in vitro* antiviral activity against influenza B, A (H3N2) and A (H1N1) viruses with SI values of 7.73, 11.79 and 12.95, respectively.

Conclusions: *Laurencia obtusa* inhibits the replication of influenza viruses, a fact of great clinical importance. Secondary assays to characterize the biological activity and molecular composition of the extract may lead to the development of novel antiviral compounds. The present paper is the first report on the inhibitory activity of this macroalga species against influenza viruses.

Key words: influenza, antiviral, *Laurencia obtusa*, natural extracts, algae.

INTRODUCCIÓN

Anualmente los virus influenza A y B provocan 340 millones de infecciones y causan la muerte a 500 000 seres humanos.¹ Estos datos, unidos a la emergencia de cepas con potencialidad de causar eventos pandémicos y la ocurrencia de infecciones en humanos provocadas por virus influenza aviar A (H5N1) altamente patogénica, resaltan la importancia de contar con estrategias eficientes de prevención y tratamiento.

En la actualidad el enfrentamiento a las infecciones se basa fundamentalmente en el uso de vacunas estacionales y en la terapia antiviral empleando inhibidores de las proteínas virales M2 y la NA.^{2, 3} Las limitaciones asociadas al diseño, obtención y suministro de la vacuna, así como el desarrollo de respuesta inmune inadecuada, comprometen el éxito de la vacunación. El empleo de drogas antivirales está amenazado por el surgimiento de variantes virales resistentes a ambos grupos de fármacos. Un estudio global mostró que en el año 2006, el 90,4 % de los virus influenza A (H3N2) analizados, poseían los marcadores moleculares que confieren resistencia a los inhibidores de la proteína M2.⁴ En el año 2008, se informó sobre el aumento en la circulación de virus resistentes a los inhibidores de la NA.⁵ En Cuba, un estudio publicado recientemente demostró la circulación de variantes de virus influenza que poseen las mutaciones que confieren resistencia a ambos grupos de fármacos.⁶ Esta situación motiva la búsqueda de compuestos con actividad anti-influenza que adicionalmente actúen sobre otras moléculas virales.

Las algas constituyen una fuente atractiva para la obtención de metabolitos con actividad antiviral. En macroalgas (Rhodophyte, Phaeophyta, Chrolophyte) se identificaron varios compuestos con acción inhibitoria sobre entidades virales de elevada importancia clínica.⁷ Polisacáridos sulfatados de las algas rojas (Rhodophyte) *Gymnogongrus griffithsiae* y *Cryptonemia crenulata* inhiben los eventos tempranos del ciclo replicativo de virus dengue.⁸ Griffithsin, una proteína obtenida a partir del extracto acuoso de *Griffithsia* sp impide el reconocimiento CD4-gp120 durante la etapa absorción del virus de la inmunodeficiencia humana.⁹ Por su parte, polisacáridos sulfatados identificados en *Undaria pinnatifida*¹⁰ y *Gracilaria lemaneiformis*¹¹ inhiben la replicación de virus influenza A. Lectinas de unión a manosa, aisladas de dos especies de macroalgas poseen actividad anti-influenza cuando son evaluadas en sistemas in vitro.^{12,13}

Laurencia obtusa (Hudson) J.V. Lamouroux, 1813 es un alga roja muy común en la plataforma insular de Cuba. Varios trabajos informaron la presencia de terpenos y otros metabolitos de interés farmacéutico en miembros del género *Laurencia*.^{14,15} Recientemente, en esta especie se describió la presencia de sesquiterpenos (Laurene) que poseen actividad antitumoral y antimicrobiana.¹⁶ Al menos un estudio demostró la actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* de *Plasmodium falciparum* cuando se emplean extractos etanólicos de las especies *L. obtusa* y *L. corallopsis*.¹⁷ Teniendo en cuenta estos resultados y la ausencia de estudios de actividad antiviral de miembros del género, en este trabajo se evaluó la actividad inhibitoria de un extracto acuoso de *L. obtusa* frente a virus influenza A (H1N1), A (H3N2) e influenza B.

MÉTODOS

Extracto del alga

El muestreo de *L. obtusa* se realizó en la Playa Guanabo, al este de La Habana, perteneciente a la costa norte Occidental de Cuba (23°10'48"N 82°06'02"W), en el período mayo de 2008 a noviembre de 2009. Se procedió a la identificación taxonómica de la especie por el Dr. Arsenio Areces Mallea, Investigador del Instituto de Oceanología según Littler y Littler¹⁸ y a su homologación con la especie depositada en la colección Vaucher del Acuario Nacional de Cuba.

El extracto acuoso se preparó a partir de la maceración en buffer fosfato 0,1 M, pH 7,2 siguiendo el procedimiento descrito por Shiomi, Kamiya y Shimizu.¹⁹ Previo a

la extracción, las muestras fueron molidas y homogeneizadas y el extracto se preparó, en proporción 1:10 (alga: buffer). El extracto se mantuvo a 10 °C, con agitación periódica, se filtró, centrifugó a 10000 x g, concentró al vacío por evaporación rotatoria a 50 °C y se secó por liofilización con N líquido. Para la realización de los ensayos el extracto se disolvió en Medio MEMgane a una concentración final de 5 mg/mL.

Cepas virales

En los ensayos de actividad antiviral se emplearon las cepas A/HABANA/190/2006 y B/HABANA/84/2006 de virus influenza A (H1N1) e influenza B; respectivamente. Ambas cepas se obtuvieron a partir del banco de muestras clínicas del Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Influenza del IPK. Adicionalmente se empleó la cepa patrón A/PANAMÁ/2007/1999 de virus influenza A (H3N2); donada por el Centro Colaborador para la Influenza de la OMS en Londres (Tabla 1).

Medios de cultivo y línea celular

Tabla 1. Datos de los cepas virales tomados del libro de trabajo del Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Influenza del IPK

Cepa	Virus	Fuente	No. de Pases	Sensibilidad a los antivirales disponibles
A/HABANA/190/2006	Influenza A (H1N1)	Exudado nasofarínge	5	Sensible
A/PANAMÁ/2007/1999	Influenza A (H3N2)	Cepa patrón	6	Sensible
B/HABANA/84/2006	Influenza B	Exudado nasofarínge	6	Sensible

Medio de crecimiento: Medio MEMgane (Medio Esencial Mínimo suplementado con glutamina y aminoácidos no esenciales) (Gibco™, EUA) y suero fetal bovino inactivado (SFBI) al 10 % (SIGMA®, EUA).

Medio de Inoculación: Medio MEMgane (Gibco™, EUA) suplementado con Tripsina (Himedia®, España) a 2 µg/mL y Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen®, EUA) a 5 unid/mL. Los ensayos de citotoxicidad y de evaluación de actividad se realizaron en la línea celular MDCK (ATCC-CCL34). Se emplearon los subcultivos del 18-30.

Ensayo de citotoxicidad

Para la determinación de la citotoxicidad del extracto en las células MDCK, se empleó el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT) (SIGMA, EUA) a una concentración final de 0,5 mg/mL.²⁰ El rango de concentraciones del extracto de *L. obtusa* evaluado fue de 1000-5000 µg/mL. Los cristales de formazan se resuspendieron empleando 100 µL de dimetil-sulfóxido anhidro (Panreac®, India) por pocillo. La lectura de los resultados se realizó a una absorbancia de 560 nm, con filtro de referencia de 620 nm, empleando un espectrofotómetro lector de placas multipozos (MRX Revelation, Dynex Technologies, EUA) con el programa integrado Dynex Revelation 4.02. Se determinó el valor de la CC₅₀ mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis- porcentaje de viabilidad celular y empleando dos réplicas del experimento.

Evaluación de la actividad antiviral in vitro

Ensayo de inhibición del ECP

Para la evaluación primaria de la actividad antiviral se empleó inicialmente el método de lectura de ECP,^{21,22} con modificaciones. Se adicionaron 100 uL del extracto disuelto en medio de inoculación a monocapas confluentes de MDCK, cubriendo un rango de concentraciones 3000 µg/mL- 0,025 µg/mL. Se incubaron las placas durante una hora, a 37 °C, en atmósfera con 5 % de CO₂ (Binder®, EUA). Pasado este tiempo, se adicionaron 20 µL de virus con 100TCID₅₀/mL a cada pocillo, exceptuando la columna correspondiente al control de células. Las placas se incubaron a 37 °C, en atmósfera con 5 % de CO₂ (Binder®, EUA) y se observaron diariamente durante 72 horas. Para cada concentración del extracto se determinó el porcentaje de pocillos con ECP. Se calculó el valor de CI₅₀ mediante regresión lineal a partir de la ecuación de la línea de tendencia de la curva dosis-respuesta. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Ensayo de hemaglutinación

Este ensayo se realizó siguiendo el procedimiento propuesto en el Manual para el diagnóstico de laboratorio y la vigilancia virológica de influenza.²³ Se utilizaron eritrocitos de gallo (0,5 %) provenientes del vivario del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" diluidos en solución salina tamponada con fosfato (0,01M; pH=7).

Índice selectivo

El índice selectivo se determinó a partir de la relación $IS = CC_{50}/CI_{50}$. Se empleó el valor de CI₅₀ del ensayo de inhibición de ECP, teniendo en cuenta el resultado del análisis comparativo realizado con respecto al valor obtenido en el ensayo de hemaglutinación.

Procesamiento estadístico

Se empleó la prueba de Shapiro Wilk para comprobar la normalidad de los datos de absorbancia a 560 nm obtenidos en el ensayo de citotoxicidad. La dependencia lineal entre el porcentaje de viabilidad celular, del ECP y de positividad a hemaglutinación frente a las dosis del extracto, se comprobó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA). Se realizó análisis de regresión lineal para determinación de los valores de CC₅₀ y CI₅₀. Los valores de CI₅₀ determinados por ECP y por hemaglutinación para cada cepa, fueron comparados mediante análisis de significación estadística de pendientes, a partir de las curvas de regresión, empleando el paquete del Programa StatGraphics Plus 2.1. Los gráficos se construyeron empleando el paquete Microsoft Office Excel® 2007.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran los resultados del ensayo de determinación de la CC₅₀ del extracto acuoso *L. obtusa* en células MDCK. El extracto no es tóxico en el rango de concentraciones evaluadas (1000-5000µg/mL).

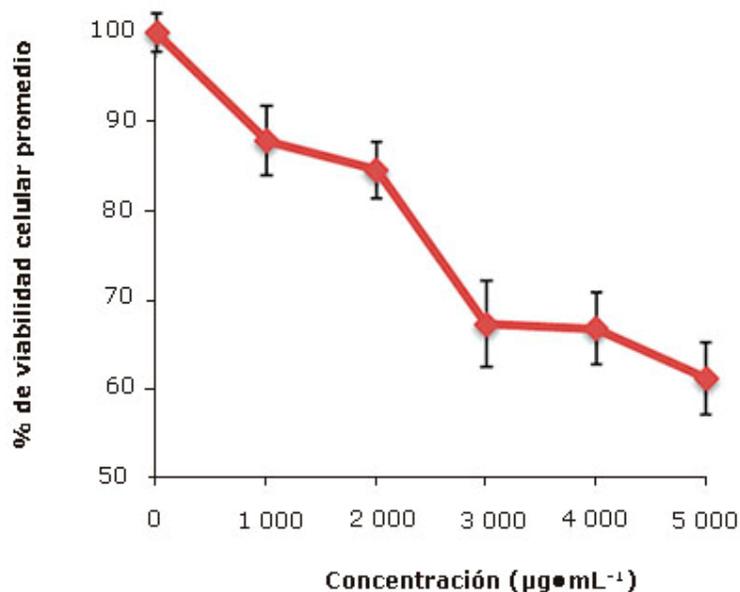


Fig.1. Viabilidad de células MDCK en presencia del extracto de *L.obtusa* evaluada mediante ensayo de reducción MTT. Cada punto representa la media de dos experimentos.

La figura 2 muestra los resultados del ensayo empleando el extracto de *L. obtusa* frente a la cepa B/HABANA/84/2006 a partir de la lectura de ECP (a) y de hemaglutinación (b). En ambos casos se evidenció un comportamiento lineal en la curva de relación dosis-porciento de ECP y dosis-porciento de hemaglutinación. La determinación de los valores de CE₅₀ empleando la ecuación de las curvas obtenidas en cada ensayo, mostró valores de CE₅₀ de 646,56 ± 12.1µg/mL y 720,42 ± 5.1µg/mL. El análisis estadístico evidenció que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores (p<0,005). El valor de IS para *Laurencia obtusa* frente a influenza B fue superior a 7,73.

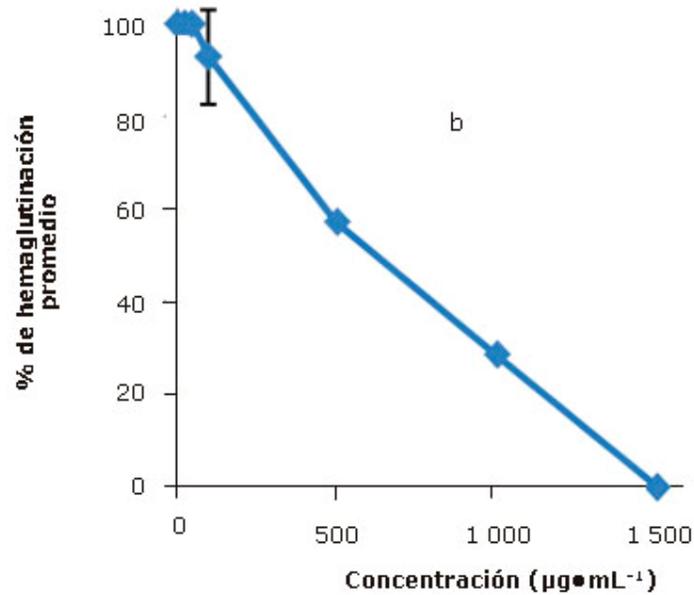


Fig. 2. Actividad inhibitoria del extracto de *L.obtusa* frente a virus influenza B teniendo en cuenta el porcentaje de ECP (a) y de hemaglutinación (b), para cada dosis evaluada.

La figura 3 muestra la relación dosis- porcentaje de ECP para el caso de las cepas de influenza A (H1N1), 3a y A (H3N2), 3b. El análisis estadístico de los valores de CE₅₀ determinados a partir de los ensayos de inhibición de ECP y de hemaglutinación (no se muestra) para cada subtipo viral, evidenció que no existen diferencias estadísticamente significativas entre estos valores ($p < 0,005$). Como se observa en la figura 3, para estos virus también se estableció una dependencia lineal en la relación porcentaje de ECP-dosis del extracto. El cálculo de CE₅₀ empleando las ecuaciones de las rectas resultantes, evidenció valores de $424 \pm 10,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ para A (H3N2) y $386 \pm 8,2 \mu\text{g}/\text{mL}$ para A (H1N1) con IS $> 11,79$ y $12,95$; respectivamente. La tabla 2 resume los valores de CC₅₀, CE₅₀ e IS calculados para el extracto acuoso de *L. obtusa* frente a virus influenza A (H1N1), A (H3N2) e influenza B.

Tabla 2. Resumen de la evaluación de actividad antiviral del extracto acuoso de *Laurencia obtusa* frente a virus influenza

Extracto	Cepa	CC ₅₀ (µg.m ⁻¹)	CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	IS
	A/HABANA/190/2006		$386 \pm 8,2$	$> 12,95$
<i>Laurencia obtusa</i>	A/PANAMÁ/2007/1999	> 5000	$424 \pm 10,5$	$> 11,79$
	B/HABANA/84/2006		$646,56 \pm 12,1$	$> 7,73$

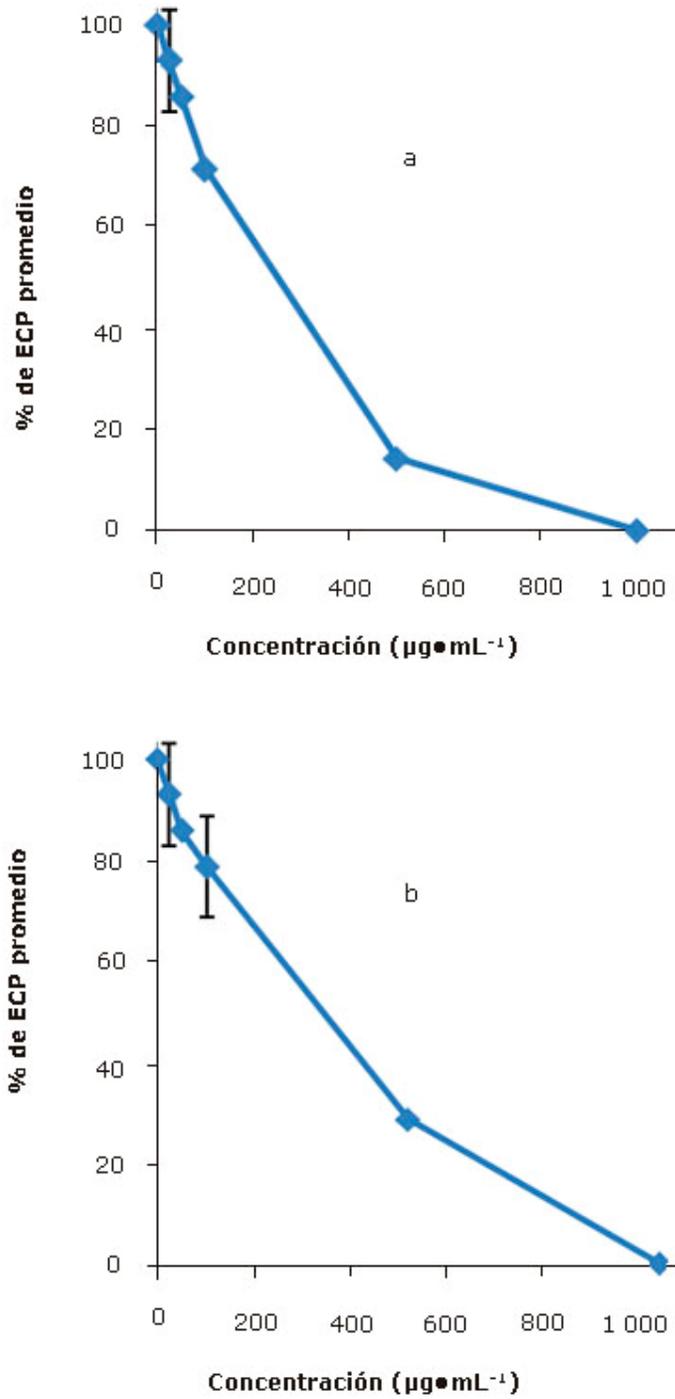


Fig.3. Actividad inhibitoria del extracto de *L.obtusa* frente a virus influenza A (H1N1)(a) y A (H3N2) (b), teniendo en cuenta el porcentaje de ECP para cada dosis evaluada.

DISCUSIÓN

Los virus influenza A y B provocan un elevado número de infecciones y muertes cada año a nivel mundial.¹ Los niveles de morbilidad y mortalidad asociados a la infección son del 65 % en individuos inmunocomprometidos o en edades extremas de la vida. En Cuba, durante el año 2011, se produjeron 5 495 muertes debido a la influenza asociada a neumonía.²⁴ Adicionalmente un estudio informó la circulación de estas variantes virales que poseen los marcadores moleculares de resistencia a los inhibidores de M2 y NA,⁶ lo que destaca la necesidad de desarrollar nuevas fármacos anti-influenza.

Hasta el momento son escasos los trabajos relacionados con la determinación de actividad antiviral de especies pertenecientes al género *Laurencia*. En un estudio en el que se evaluó la actividad inhibitoria de sesquiterpenos halogenados de *L. obtusa* frente a virus con genoma de ARN y ADN²⁵ no se evidenció inhibición. Sin embargo, en este trabajo se empleó un grupo de metabolitos en particular y no extractos del alga los cuales contienen variedad de metabolitos, lo que aumenta la probabilidad de ocurrencia de acción inhibitoria. Por otra parte, las variaciones en cuanto a características estructurales, moleculares y de las etapas del ciclo replicativo de virus influenza con respecto a las entidades virales empleadas en ese estudio, podrían explicar la diferencia entre nuestros resultados y los informados por esos autores.

Los valores de citotoxicidad (CC₅₀) del extracto acuoso de *L. obtusa*, determinados en este trabajo, son semejantes a lo informado²⁶ para extractos de algas. *L. obtusa* no es tóxica en el rango de concentraciones evaluadas lo que constituye un resultado muy positivo en los trabajos de evaluación de un candidato antiviral. Los ensayos de actividad inhibitoria mostraron que el extracto es activo frente a virus influenza A (H1N1), A (H3N2) e influenza B. El IS obtenido en cada caso, es indicativo de ocurrencia de inhibición *in vitro* teniendo en cuenta el criterio establecido por Vanden Berghe²⁷ para extractos de origen natural. Los valores de IS son semejantes a los informados un extracto del alga roja *Ceramium rubrum*,²⁸ del alga *Aphanotece sacrum*²⁶ y de la planta *Alchemilla mollis*²⁹ frente a virus influenza. Sin embargo, a diferencia de este trabajo, esos autores sólo emplearon cepas de virus influenza A. El hallazgo de actividad del extracto de *L. obtusa* frente a virus influenza B constituye un resultado significativo, teniendo en cuenta los niveles de infección,³⁰ hospitalización³¹ y aparición de neumonía infantil³⁰ informados para este subtipo viral. Adicionalmente, el hecho de que la mayoría de los trabajos de evaluación de candidatos para el desarrollo de fármacos con actividad anti-influenza no incluyen cepas del subtipo B, destacan el valor de este resultado.

Los virus influenza A y B poseen diferencias en cuanto a las secuencias y las características estructurales y antigénicas de las proteínas M2 y NA. La ocurrencia de inhibición determinada en este trabajo sobre la tres cepas, con valores semejantes de IS, podría sugerir que la actividad inhibitoria se ejerce sobre una diana molecular de secuencia y estructura conservada entre los dos tipos virales. Teniendo en cuenta la elevada circulación de virus influenza que poseen los marcadores de resistencia a los inhibidores de las proteínas M2 y NA, el hallazgo de un extracto con potencial actividad inhibitoria sobre una nueva diana viral constituiría un resultado significativo para la búsqueda de nuevos fármacos anti-influenza.

Los estudios de tamizaje fitoquímico de especies *Laurencia* muestran la presencia de esteroideos, alcaloides, flavonoides, saponinas y taninos,¹⁵ así como de compuestos halogenados, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y C₁₅ acetogéninas.¹⁴ Según Johnson y colaboradores¹⁵ el extracto acuoso de la especie *L.*

obtusa contiene fundamentalmente saponinas y taninos. Varios trabajos informaron la actividad anti-influenza de ambos grupos de compuestos. Un tanino identificado en extractos de hojas de las plantas *Camellia sinensis* var. *sinensis* y *C. sinensis* var. *assamica* inhibe la replicación de virus influenza A.³² Los ensayos de determinación de mecanismo de acción mostraron que el compuesto actúa en la etapa de hemifusión de membranas durante los eventos tempranos del ciclo replicativo viral, aunque su inhibición no está relacionada con la actividad de la proteína M2. Persimmon, un tanino extraído de la planta *Diospyros kaki* inhibe la adsorción *in vitro* de virus influenza A en células MDCK.³³ En algas, taninos obtenidos a partir de *Ecklonia cava* inactivaron la NA viral mostrando en algunos casos sinergismo con el oseltamivir.³⁴ Por otra parte, compuestos derivados de saponinas inhibieron la etapa de entrada a la célula de virus influenza A H5N1 en un ensayo *in vitro*. La acción antiviral de este grupo de moléculas está relacionada con el bloqueo de la interacción entre el receptor celular (moléculas de ácido siálico) y la HA viral.³⁵ Un trabajo publicado recientemente³⁶ mostró que los extractos acuosos y etanólicos de la planta *Jatropha curcas* poseen elevados niveles de taninos y saponinas. Ensayos *in vitro* realizados con ambos extractos demostraron la inhibición de la HA viral. Todos estos trabajos, unidos a los estudios de tamizaje molecular del extracto acuoso de *L. obtusa* informados previamente, indican que la actividad del extracto informada en este trabajo podría estar relacionada con la presencia de taninos y saponinas. Teniendo en cuenta estos estudios, podríamos postular que la actividad anti-influenza del extracto acuoso de *L. obtusa* está relacionada con la presencia de este tipo de moléculas y que involucra fundamentalmente las etapas de absorción y fusión de membranas del ciclo replicativo viral. Sin embargo, teniendo en cuenta la variabilidad en cuanto a la composición de los extractos naturales, no descartamos la posibilidad de la presencia de otras familias de compuestos en el extracto y por tanto la ocurrencia de actividad inhibitoria sobre otras etapas del ciclo replicativo viral.

Teniendo en cuenta los datos epidemiológicos relacionados con la infecciones por virus influenza A y B, el potencial de estos virus de provocar eventos pandémicos y la elevada circulación a nivel mundial de virus resistentes a los fármacos anti-influenza aprobados para su uso, los resultados informados en este trabajo constituyen una alternativa para la búsqueda de variantes terapéuticas eficientes frente a la infección.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer la colaboración de los miembros del Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios del IPK, Dr.C. Odalys Valdés Ramírez, Téc. Bárbara Hernández por su apoyo en los ensayos de evaluación de actividad antiviral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gripe estacional. Nota descriptiva, No 211. [Citado enero 2012]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>
2. Kanga SM, Songa JM, Compans RW. Novel vaccines against influenza viruses. *Virus Research*. 2011; 162: 31-38.

3. Pizzorno AS, Abed Y, Boivin G. Influenza Drug Resistance. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2011; 32: 409-422.
4. Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, et al. Surveillance of Resistance to Adamantanes Among Influenza A (H3N2) and A (H1N1) Viruses Isolated Worldwide. J Infect Dis. 2007; (196): 249-255.
5. Gubareva LV, Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten R, Xu X. Surveillance for Neuraminidase Inhibitor Resistance among Human Influenza A and B Viruses Circulating Worldwide from 2004 to 2008. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(9): 3284-3292.
6. Piñón A, Herrera A, Valdés O, Pérez A, Arencibia A, Savón C, et al. Adamantane and neuraminidase inhibitor resistance among circulating human influenza A viruses in Cuba during 2006-2010. Int J Antimicrob Agents. 2013; 49:94-99.
7. El Gamal AA. Biological importance of marine algae. Saudi Pharmaceutical J. 2010; 18: 1-25.
8. Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RGM, Faría PC, Nosedá MD, Duarte ME. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. Antiviral Research. 2005; 66: 103-110.
9. Mori T, O'Keefe BR, Sowder RC, Bringans S, Gardella R, Berg S. Isolation and characterization of griffithsin, a novel HIV-inactivating protein, from the red alga *Griffithsia* sp. J Biol Chem. 2005; 280: 9345-9353.
10. Hayashi K, Lee JB, Nakano T, Hayashi T. Anti-influenza A virus characteristics of a fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity. Microbes and Infection. 2013; 15: 302-309.
11. Chen M, Xie H, Yang L, Liao Z, Yu J. In vitro anti-influenza virus activities of sulfated polysaccharide fractions from *Gracilaria lemaneiformis*. Virologica Sinica. 2010; 25(5): 341-351.
12. Sato Y, Morimoto K, Hirayama M, Hori K. High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011; 405: 291-296.
13. Sato Y, Hirayama M, Morimoto K, Yamamoto N, Okuyama S, Hori K. High mannose-binding lectin with preference for the cluster of alpha1-2-mannose from the green alga *Boodlea coacta* is a potent entry inhibitor of HIV-1 and influenza viruses. J Biol Chem. 2011; 286: 19446-19458.
14. da S Machado F, Kaiser C, Costa S, Gestinari L, Soares A. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. Braz J Pharmacognosy. 2010; 20(3): 441-452.
15. Johnson M, Babu A, Janakiraman R, Malar T. Phytochemical studies on *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. Int J Biomed Adv Res. 2012; 3(4): 225-232.
16. Alarif W, Al-Lihaibi S, Ayyad SE, Abdel-Rhman M, Badria F. Laurene-type sesquiterpenes from the Red Sea red alga *Laurencia obtuse* as potential antitumor and antimicrobial agents. Europ J Med Chem. 2012; 55: 462-466.

17. Mendiola-Martínez J, Hernández H, Acuña D, Esquivel M, Scull-Lizama R, Abreu-Payrol J. Actividad inhibidora del crecimiento in vitro de *Plasmodium falciparum* de extractos de algas del género *Laurencia*. Rev Cubana Med Trop. 2005; 57(3): 192-195.
18. Littler DS, Littler MM. Rhodophytes (Red Algae). En: Littler DS eds. Caribbean Reef Plants. Washington, USA. Off Shore Graphics; 2000:201-221.
19. Shiomi K, Kamiya H, Shimizu Y. Purification and characterization of an agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera*. Biochim Biophys Acta. 1979; 576: 118-127.
20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth. 1983; (65): 55-63.
21. del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. J Ethnopharmacol. 2010; (72): 317-322.
22. Alvarez AL, del Barrio G, Kourí V, Martínez PA, Suárez B, Parra F. In vitro anti-herpetic activity of an aqueous extract from the plant *Phyllanthus orbicularis*. Phytomedicine. 2009; 16(10): 960-966.
23. WHO. Manual for the laboratory and virological surveillance of influenza. Suiza. WHO Press. 2010.
24. Anuario estadístico de salud. MINSAP. 2012. [Citado diciembre 2012]. Disponible en: <http://files.sld.cu/dne/files/2013/04/anuario2012.pdf>
25. Iliopoulou D, Roussis V, Pannecouque C, De Clercq E, Vagias C. Halogenated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. Tetrahedron. 2002; 58: 6749-6755.
26. Ogura F, Hashayi K, Lee JB, Kanekiyo K, Hashayi T. Evaluation of an Edible Blue-Green Alga, *Aphanotece sacrum*, for Its Inhibitory Effect on Replication of Herpes Simplex Virus Type 2 and Influenza Virus Type A. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2010; 74(8): 1687-1690.
27. Vanden Berghe A, Vlietinck AJ, Van Hoof L. Plant products as potential antiviral agents. Bull. Pasteur Institute. 1986; 84: 101-147.
28. Serkedjieva J. Antiviral Activity of the Red Marine Alga *Ceramium rubrum*. Phytother. Res. 2004; 18: 480-483.
29. Nzambi Makau J, Watanabe K, Kobayashi K. Anti-influenza activity of *Alchemilla mollis* extract: Possible virucidal activity against influenza virus particles. Drug Discoveries & Therapeutics. 2013; 7(5): 189-195.
30. Wang H, Fu C, Li K, Lu J, Chen Y, Lu E, et al. Influenza associated mortality in Southern China, 2010-2012. Vaccine. 2013; doi: 0.1016/j.vaccine.2013.12.013.

31. Thompson W, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, Fukuda K. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*. 2003;(289):179-186.
32. Saha RK, Takahashi T, Kurebayashi Y, Fukushima K, Minami A, Kinbara N, et al. Antiviral effect of strictinin on influenza virus replication. *Antiviral Research*. 2010;(88):10-18.
33. Ueda K, Kawabata R, Irie T, Nakai Y, Tohya Y, Sakaguchi T. Inactivation of Pathogenic Viruses by Plant-Derived Tannins: Strong Effects of Extracts from Persimmon (*Diospyros kaki*) on a Broad Range of Viruses. *PlosOne*. 2013;8(1):e55343.
34. Ryu YB, Jae-Jeong H, Young-Yoon S, Park JY, Min- Kim Y, Park SY, et al. Influenza Virus Neuraminidase Inhibitory Activity of Phlorotannins from the Edible Brown Alga *Ecklonia cava*. *J Agric Food Chem*. 2011;(59):6467-6473.
35. Ding N, Chen Q, Zhang W, Ren S, Guo Y, Li Y. Structure-activity relationships of saponin derivatives: A series of entry inhibitors for highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Europ J Med Chem*. 2012;(53):316-326.
36. Patil D, Roy S, Dahake R, Rajopadhye S, Kothari S, Deshmukh R, Chowdhary A. Evaluation of *Jatropha curcas* Linn. Leaf extracts for its cytotoxicity and potential to inhibit hemagglutinin protein of influenza virus. *Indian J Virol*. 2013;24(2):220-226.

Recibido: 2 de septiembre de 2013.

Aprobado: 28 de febrero de 2014.

Dra. Gloria del Barrio Alonso. Facultad de Biología, Universidad de La Habana, calle 25, No.455, entre J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba, CP: 10400. Correo electrónico: gbarrio@infomed.sld.cu
Telf. 836 79 41.