

## Tesis de Posgrado

# Actividad antiviral y mecanismo de acción de polisacáridos sulfatados obtenidos a partir de las algas *Nothogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea*

Pujol, Carlos Alberto

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Pujol, Carlos Alberto. (1995). Actividad antiviral y mecanismo de acción de polisacáridos sulfatados obtenidos a partir de las algas *Nothogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2738\\_Pujol.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2738_Pujol.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pujol, Carlos Alberto. "Actividad antiviral y mecanismo de acción de polisacáridos sulfatados obtenidos a partir de las algas *Nothogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2738\\_Pujol.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2738_Pujol.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y MECANISMO DE ACCION DE POLISACARIDOS  
SULFATADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS ALGAS  
*Nothogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea*

AUTOR: Lic. Carlos Alberto Pujol

DIRECTORA: Dra. Elsa Beatriz Damonte

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Virología  
Departamento de Química Biológica  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.  
U.B.A.

Tesis presentada para optar por el título de  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elsa B. Damonte por la dedicación y el apoyo que me brindó a lo largo de estos años que hicieron posible este trabajo de tesis y por la ayuda que recibí de su parte en momentos difíciles.

A la Dra. Celia E. Coto por haberme permitido trabajar con total libertad en el Laboratorio de Virología y por la lectura crítica del manuscrito.

Al Dr. Alberto S. Cerezo y a su grupo de trabajo, en particular a la Dra. María C. Matulewicz y a la Lic. María I. Errea por la provisión y el análisis químico-estructural de los compuestos derivados de las algas *Nothogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea*.

Al Dr. Carlos A. Stortz por la provisión de las fracciones del alga *Corallina officinalis*.

A mis compañeros del Laboratorio de Virología quienes me brindaron en todo momento su ayuda desinteresada e hicieron muy ameno mi trabajo a su lado.

A mis compañeros de Inmunquímica junto a los que me formé profesionalmente y a quienes agradezco que me consideren su amigo.

A todos los integrantes del Area de Microbiología en general con los que pasé gratos momentos y con quienes compartí debates enriquecedores a la hora del almuerzo.

Pido perdón por no poner los nombres de todas las personas a las que indirectamente aludo en los párrafos

anteriores pero, después de trabajar 15 años en esta Area, son tantas las personas que me brindaron su ayuda que sería injusto olvidarme de alguna. Les pido perdón también por mencionar sólo a una persona: a la Dra. Laura Alché, a quien le agradezco por haberme orientado en la elección del camino correcto.

## **ABREVIATURAS**

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>ACP:</b>            | acción citopatogénica                     |
| <b>BSA:</b>            | albúmina sérica bovina                    |
| <b>CC50:</b>           | concentración citotóxica 50 %             |
| <b>CI50:</b>           | concentración inhibitoria 50 %            |
| <b>DICT50:</b>         | dosis infectiva en cultivo de tejido 50 % |
| <b>gC:</b>             | glicoproteína C de herpes simplex virus   |
| <b>GRC:</b>            | glóbulos rojos de carnero                 |
| <b>HCMV:</b>           | citomegalovirus humano                    |
| <b>HIV:</b>            | virus de la inmunodeficiencia humana      |
| <b>HSV:</b>            | virus herpes simplex                      |
| <b>IS:</b>             | índice de selectividad                    |
| <b>IV:</b>             | índice virucida                           |
| <b>m:</b>              | multiplicidad de infección                |
| <b>MC:</b>             | medio de crecimiento celular              |
| <b>MEM:</b>            | medio esencial mínimo                     |
| <b>MM:</b>             | medio de mantenimiento celular            |
| <b>MP:</b>             | medio de plaqueo                          |
| <b>PBS:</b>            | solución salina de fosfatos               |
| <b>p.i.:</b>           | post infección                            |
| <b>PrV:</b>            | virus de pseudorrabia                     |
| <b>RSV:</b>            | virus respiratorio sincicial              |
| <b>SIDA:</b>           | síndrome de inmunodeficiencia adquirida   |
| <b>TK<sup>-</sup>:</b> | virus deficientes en timidina quinasa     |
| <b>UFP:</b>            | unidades formadoras de placa              |

ina de vero  
estomatitis

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| I. INTRODUCCION.....   | 1  |
| A. Características de la familia <i>Herpesviridae</i> .....    | 2  |
| 1. Morfología.....   | 2  |
| 2. Distribución en la naturaleza.....                          | 3  |
| 3. Principales propiedades biológicas.....                     | 3  |
| 4. Nomenclatura y clasificación.....                           | 4  |
| 5. Ciclo de replicación viral.....                             | 6  |
| 6. Manifestaciones clínicas de algunos herpesvirus..           | 8  |
| a. Virus herpes simplex.....                                   | 8  |
| b. Citomegalovirus humano.....                                 | 9  |
| c. Virus de pseudorrabia.....                                  | 10 |
| B. Quimioterapia antiviral.....                                | 10 |
| 1. Sustancias antivirales efectivas contra<br>herpesvirus..... | 10 |
| 2. Problemas de la terapia antiviral.....                      | 16 |
| 3. Polisacáridos como agentes antivirales.....                 | 18 |
| 4. Antivirales de origen natural.....                          | 20 |
| II. OBJETIVOS.....   | 26 |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>III. MATERIALES Y METODOS.....</b>  | <b>27</b> |
| 1. Obtención y fraccionamiento de los polisacáridos sulfatados.....                            | 27        |
| a. A partir del alga <i>Nothogenia fastigiata</i> .....  | 27        |
| b. A partir del alga <i>Pterocladia capillacea</i> .....                                       | 28        |
| c. A partir del alga <i>Corallina officinalis</i> .....  | 31        |
| 2. Células.....  | 34        |
| 3. Medios de cultivo.....  | 34        |
| a. Medio de crecimiento celular (MC).....  | 34        |
| b. Medio de mantenimiento celular (MM).....  | 34        |
| c. Medio de plaqueo (MP).....  | 35        |
| 4. Ensayo de citotoxicidad.....  | 35        |
| 5. Virus.....  | 35        |
| a. Preparación de las suspensiones virales.....  | 36        |
| b. Marcación de viriones con radioisótopos y purificación.....                                 | 37        |
| 6. Ensayos de infectividad.....  | 38        |
| a. Titulación en cultivo de células por UFP.....   | 38        |
| b. Titulación en cultivo de células por el método de punto final (acción citopática: ACP)..... | 39        |
| 7. Determinación de la actividad antiviral.....  | 40        |
| a. Reducción del número de placas.....   | 40        |
| b. Inhibición del rendimiento viral.....   | 40        |
| c. Inhibición de la acción citopática.....   | 41        |
| 8. Efecto virucida de los polisacáridos.....   | 41        |
| 9. Influencia del tiempo de adición del compuesto  |           |

|   |    |
|---|----|
| antiviral.....  | 42 |
| 10. Ensayos de adsorción viral.....                                     | 42 |
| a. Adición de los compuestos durante o después de<br>la adsorción.....  | 42 |
| b. Cinética de adsorción viral.....                                     | 43 |
| 1. Determinada por infectividad.....                                    | 43 |
| 2. Determinada por la unión de viriones<br>radioactivos.....            | 44 |
| c. Influencia de la concentración de F6 y S1<br>sobre la adsorción..... | 44 |
| 1. Determinada por infectividad.....                                    | 44 |
| 2. Determinada por la unión de viriones<br>radioactivos.....            | 45 |
| 11. Internalización viral.....  | 45 |
| 12. Inhibición de la expresión de proteínas virales...                  | 46 |
| a. Preparación de suero inmune anti HSV-1.....                          | 46 |
| b. Purificación de IgG de conejo anti HSV-1.....                        | 47 |
| c. Reacción de inmunofluorescencia indirecta.....                       | 47 |
| 13. Inhibición de la formación de rosetas.....                          | 49 |
| a. Sensibilización de los glóbulos rojos de<br>carnero.....             | 49 |
| b. Obtención de células Vero infectadas con HSV-1.                      | 50 |
| c. Realización de la técnica de rosetas.....                            | 50 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>IV. RESULTADOS.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>A. Muestreo de la actividad antiviral y citotóxica<br/>de los polisacáridos sulfatados.....</b>            | <b>51</b> |
| 1. Actividad antiviral contra HSV-1 de las<br>distintas fracciones de polisacáridos.....                      | 51        |
| 2. Citotoxicidad de los polisacáridos.....  | 54        |
| 3. Espectro de acción de F6 y S1 contra otros<br>virus.....   | 58        |
| 4. Actividad antiviral de F6 y S1 contra<br>herpesvirus.....  | 60        |
| <b>B. Determinación de la actividad antiviral de F6 y<br/>S1 en distintas condiciones experimentales.....</b> | <b>62</b> |
| 1. Actividad antiviral de F6 y S1 contra HSV-1 en<br>distintas líneas celulares.....                          | 63        |
| 2. Influencia de la multiplicidad de infección.....   | 65        |
| 3. Determinación de la CI50 empleando distintas<br>técnicas.....  | 65        |
| <b>C. Mecanismo de acción de F6 y S1.....</b>   | <b>67</b> |
| 1. Efecto virucida de los polisacáridos sobre<br>HSV-1.....   | 67        |
| 2. Influencia del tiempo de adición de F6 sobre<br>la replicación de HSV-1.....                               | 69        |
| 3. Acción de F6 y S1 sobre la adsorción viral.....  | 72        |
| a. Efecto de F6 y S1 agregados durante o<br>después de la adsorción de HSV-1.....                             | 72        |

|  |            |
|--|------------|
| b. Efecto de F6 y S1 sobre la adsorción de<br>HSV-1 medida por infectividad.....   | 74         |
| c. Acción inhibitoria de F6 y S1 sobre la<br>unión a células Vero de HSV-1 marcado<br>radioactivamente.....                      | 77         |
| 4. Efecto de F6 y S1 en la internalización viral...  | 80         |
| 5. Efecto de F6 y S1 sobre la expresión de<br>proteínas virales.....   | 80         |
| 6. Importancia de los grupos sulfato presentes<br>en el compuesto F6 en relación a su actividad<br>contra HSV-1.....             | 90         |
| 7. Inhibición por F6 y S1 de la interacción<br>entre la glicoproteína C de HSV-1 (gC) y el<br>fragmento C3b del complemento..... | 92         |
| <br>   |            |
| <b>V. DISCUSION.....</b>   | <b>97</b>  |
| <br>   |            |
| <b>VI. CONCLUSIONES.....</b>   | <b>113</b> |
| <br>   |            |
| <b>VII. BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>115</b> |

## I. INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas ocasionadas por virus representan aún en muchos casos un problema a resolver dentro del campo de la medicina humana. Es conocido que la forma más efectiva de combatirlas es mediante la prevención por la aplicación de vacunas específicas, tal como ha ocurrido por ejemplo con la viruela, la poliomielitis y el sarampión. Sin embargo, hoy en día existen muchas enfermedades virales para las que no se han podido desarrollar vacunas efectivas. Tal es el caso de las infecciones herpéticas originadas por virus herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), citomegalovirus humano (HCMV) y varicella-zoster (VZV), diarreas producidas por rotavirus, algunas enfermedades respiratorias ocasionadas por adenovirus y virus respiratorio sincicial (RSV), y por último, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) producido por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). En todos estos casos la única forma de enfrentar la enfermedad es mediante la quimioterapia.

La detección de un número creciente de casos de SIDA con su secuela de enfermedad y muerte es precisamente uno de los factores que más ha motivado e impulsado el desarrollo de antivirales. Dado que en los pacientes con SIDA como en otros procesos de inmunodepresión se manifiestan con mayor severidad las infecciones con HSV y HCMV, además de ensayar drogas que sean efectivas contra HIV, también se trabaja

intensamente en la búsqueda de compuestos activos contra dichos agentes.

El presente trabajo de tesis constituye un aporte dentro de este campo, abordando el estudio y la caracterización de la actividad antiherpética de polisacáridos sulfatados aislados a partir de algas marinas.

## **A. Características de la familia *Herpesviridae***

### **1. Morfología**

Los miembros de la familia *Herpesviridae* se caracterizan por la arquitectura del virión. Un virión típico presenta un diámetro de 120 a 200 nm. Está formado por cuatro componentes estructurales que son, de adentro hacia afuera: un "core" que contiene un ADN lineal de doble cadena, una cápside icosaédrica con un diámetro aproximado de 100 a 110 nm conteniendo 162 capsómeros (150 hexámeros y 12 pentámeros) con un canal a lo largo del eje mayor, un material amorfo y a veces asimétrico rodeando la cápside al cual se lo designa tegumento, y una envoltura que presenta en su superficie numerosas espículas constituidas por glicoproteínas (112).

## 2. Distribución en la naturaleza

Los virus correspondientes a la familia *Herpesviridae* están ampliamente distribuidos en la naturaleza. De aproximadamente 100 herpesvirus caracterizados parcialmente, siete han sido aislados de humanos: HSV-1, HSV-2, HCMV, VZV, virus de Epstein-Barr (EBV), y herpesvirus humanos 6 y 7 (HHV6 y HHV7); cinco fueron aislados de caballos, por lo menos cuatro de bovinos, dos de cerdos: virus de pseudorrabia (PrV) y citomegalovirus porcino, y tres a partir de aves: el virus de la laringotraqueitis infecciosa y dos virus asociados con la enfermedad de Marek.

## 3. Principales propiedades biológicas

Los herpesvirus conocidos comparten cuatro propiedades biológicas significativas:

1- Todos los herpesvirus codifican un gran número de enzimas involucradas en el metabolismo del ácido nucleico (timidina quinasa, timidilato sintetasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa), síntesis de ADN (ADN polimerasa) y posiblemente en el procesamiento de proteínas (proteína quinasa). No obstante, estas proteínas pueden variar de un herpesvirus a otro.

2- La síntesis del ADN viral y el ensamblaje de las nucleocápsides tiene lugar en el núcleo de la célula

infectada. La envoltura de las nucleocápsides ocurre durante su paso a través de la membrana nuclear.

3- La producción de la progenie viral infecciosa es acompañada invariablemente por la destrucción irreversible de las células infectadas.

4- Los herpesvirus son capaces de permanecer en estado latente en sus huéspedes naturales. En las células portadoras de virus latente, el genoma viral toma la forma de una molécula circular cerrada y sólo se expresa un pequeño número de genes virales.

#### 4. Nomenclatura y clasificación

Los miembros de la familia *Herpesviridae* han sido clasificados por el Grupo de Estudio de Herpesvirus del Comité Internacional en Taxonomía de Virus en tres subfamilias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*, sobre la base de sus propiedades biológicas (111).

Actualmente no se aplica una nomenclatura binomial formal. La recomendación del Grupo de Estudio mencionado anteriormente es la de designar a los herpesvirus utilizando un número arábigo y la familia (en la mayoría de los casos) o la subfamilia (para primates y algunos animales), incluyendo el huésped natural del virus (por ejemplo: herpesvirus 6 humano, herpesvirus 1 cercopitecino).



*Alfaherpesvirinae*: Los miembros de esta subfamilia se clasifican sobre la base de un espectro de huésped variable, ciclos reproductivos relativamente cortos, rápida diseminación en cultivo, destrucción eficiente de las células infectadas y capacidad de establecer infecciones latentes primarias preponderantemente en ganglios sensoriales. Esta subfamilia contiene los géneros *Simplexvirus* (HSV-1, HSV-2, herpesvirus 1 cercopitecino, virus de la mamilitis bovina) y *Varicellovirus* (VZV, PrV y herpesvirus 1 equino).

*Betaherpesvirinae*: Una característica no exclusiva de los miembros de esta subfamilia es el espectro restringido de huésped. El ciclo reproductivo es largo y la infección progresa lentamente en cultivos de células. Las células infectadas frecuentemente se agrandan (citomegalia). El virus en estado latente puede ser mantenido en células de glándulas secretorias, células linforeticulares, en el riñón y otros tejidos. Esta subfamilia contiene el género *Citomegalovirus* (HCMV) y *Muromegalovirus* (citomegalovirus murino).

*Gammaherpesvirinae*: Todos los miembros de esta subfamilia replican in vitro en células linfoblastoideas, y algunos también causan infecciones líticas en algunos tipos de células epitelioides y fibroblásticas. Los virus en este grupo son específicos para linfocitos T o B. Se puede detectar virus en estado latente en tejido linfoide. Esta subfamilia contiene dos géneros: *Linfocriptovirus* (EBV) y *Radinovirus* (herpesvirus ateles y herpesvirus saimiri)

## 5. Ciclo de replicación viral

El ciclo de replicación viral puede ser dividido en varias etapas:

1) Adsorción: Para iniciar la infección, el virus debe unirse a los receptores presentes en la superficie celular. Se ha demostrado que el heparan sulfato es el principal receptor celular para diferentes herpesvirus de humanos y animales, que incluyen HSV-1, HSV-2, HCMV, PrV y herpesvirus bovino (63, 85, 92, 96, 118, 136).

2) Penetración y desnudamiento del ácido nucleico: Luego de la unión inicial, la fusión de la envoltura con la membrana plasmática ocurre rápidamente. La nucleocápside es transportada posteriormente hasta el núcleo donde es liberado el ADN. El citoesqueleto probablemente contribuya al transporte de las nucleocápsides de herpesvirus hasta el núcleo (66).

3) Transcripción y traducción de proteínas: El ADN viral es transcrito en el núcleo celular a lo largo del ciclo replicativo por la ARN polimerasa II del huésped con la participación, en todas las etapas de la infección, de distintos factores virales. La expresión de los genes virales está coordinadamente regulada y ordenada secuencialmente en forma de cascada, dando aproximadamente setenta productos génicos. De acuerdo a su orden de expresión los genes virales han sido divididos en tres grandes grupos denominados  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La mayoría de los productos de los genes  $\alpha$  y  $\beta$  son

proteínas regulatorias y enzimas involucradas en la replicación del ácido nucleico, en tanto que las proteínas  $\tau$  son proteínas estructurales sintetizadas luego que ocurre la replicación del ADN viral.

4) Síntesis del ácido nucleico: Una característica de los herpesvirus es la de poseer un gran número de enzimas involucradas en la síntesis del ADN. La mayor parte del ácido nucleico viral es sintetizado por un mecanismo denominado de "círculo rodante", dando concatémeros que son clivados en monómeros y luego incluidos en las cápsides. En células infectadas con HSV, se detecta síntesis de ADN a las 3 horas p.i. y continúa por otras 12 horas más (110).

5) Ensamblaje de viriones: Luego que el ADN se incorpora a la cápside preensamblada, el virus madura y adquiere infectividad al atravesar la membrana nuclear. Es en esta etapa donde el virión adquiere su envoltura mediante un proceso de brotación a partir de zonas de la membrana nuclear modificadas por la inserción de glicoproteínas virales.

6) Traslocación de viriones a través del citoplasma al espacio extracelular: Una vez envueltos, los viriones se acumulan en el espacio comprendido entre las lamelas interna y externa de la membrana nuclear. Según lo propuesto por Johnson y Spear (62), los viriones atravesarían el citoplasma y serían secretados a través del aparato de Golgi, siguiendo un camino similar al utilizado por las proteínas solubles. No obstante, observaciones posteriores sugieren que este proceso sería mucho más complejo.

## 6. Manifestaciones clínicas de algunos herpesvirus

a. **Virus herpes simplex:** Antiguamente el término "herpes" fue utilizado para describir lesiones cutáneas de variada etiología. Con el tiempo, el término fue restringido a las erupciones de la piel con un componente vesicular.

Los virus herpes simplex tipo 1 y 2 se asocian generalmente con lesiones mucocutáneas faciales, oftálmicas o genitales, ya sean primarias o recurrentes. El tipo 1 produce generalmente lesiones orales y oculares, mientras que el tipo 2 ocasiona infecciones genitales y anales.

El hombre es el huésped natural del virus herpes simplex. En general, la infección inicial se produce en niños de 6 a 18 meses, y en la mayoría de los casos es leve. Sin embargo, 10 a 15 % de los niños infectados presentan una enfermedad primaria, habitualmente la gingivostomatitis herpética, caracterizada por la formación de numerosas vesículas en las mucosas de la boca, acompañada de fiebre, malestar y diarrea. La enfermedad primaria puede complicarse en algunos casos y producir meningoencefalitis, erupciones variceliformes de Kaposi y eccema herpético. Hay una respuesta del sistema inmune contra la infección primaria, alcanzándose el título máximo de anticuerpos específicos aproximadamente a los 14 días.

Las lesiones, por lo general, son localizadas y reflejan una relación parásito-huésped en la cual el virus establece una infección latente en las neuronas del ganglio que inerva

el área donde se produjo la lesión primaria. El virus puede reactivarse periódicamente y causar lesiones cutáneas autolimitantes a repetición en la misma región inervada. En los pacientes inmunocomprometidos, como en los casos particulares de individuos con SIDA, la recurrencia de HSV-1 y HSV-2 causa graves lesiones que son refractarias a los reiterados tratamientos con drogas antivirales (34)

A pesar de que el hombre es el único huésped natural del HSV, también son sensibles al virus ratones lactantes o adultos, cobayos, hamsters y conejos, huéspedes que permiten hacer un mejor estudio del virus.

**b. Citomegalovirus humano:** Este virus ha elaborado diferentes estrategias de replicación y persistencia en el huésped. Las infecciones fetales durante la gestación se asocian con un alto grado de morbilidad y mortalidad (132), mientras que las infecciones primarias posteriores al período neonatal son generalmente asintomáticas.

Las infecciones producidas por HCMV son graves en pacientes con defectos en la inmunidad mediada por células, particularmente en pacientes transplantados (transplantes de médula ósea) y en pacientes con SIDA (86, 98). En estos últimos, las infecciones se manifiestan como retinitis, enfermedades gastrointestinales, neumonitis y, con menos frecuencia, encefalitis.

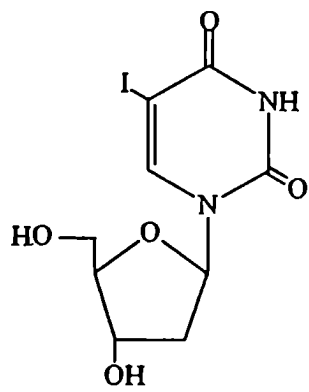
c. **Virus de pseudorrabia:** Es un importante patógeno de cerdos. La enfermedad se caracteriza por alteraciones nerviosas, desórdenes respiratorios y fallas en la reproducción tales como abortos, momificaciones y nacimientos de fetos muertos. Los abortos son por lo general el resultado de la replicación intraplacentaria e intrafetal del virus (91).

## **B. Quimioterapia antiviral**

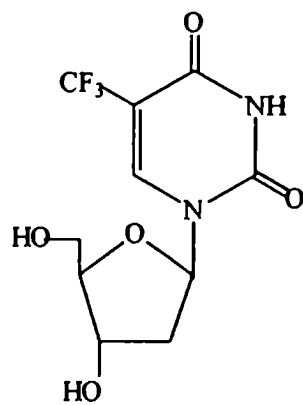
### **1. Sustancias antivirales efectivas contra herpesvirus**

La principal propiedad que debe presentar una sustancia antiviral es la de ser selectiva, es decir, poseer la capacidad para inhibir la replicación viral sin alterar las funciones de la célula huésped. Debido a que los virus multiplican intracelularmente utilizando la maquinaria metabólica de la célula infectada, se pensó por muchos años que era imposible lograr una inhibición específica de la replicación viral. Los experimentos llevados a cabo con los primeros compuestos antivirales corroboraron esta idea; las drogas eran demasiado tóxicas o poco potentes como para ser utilizadas (124).

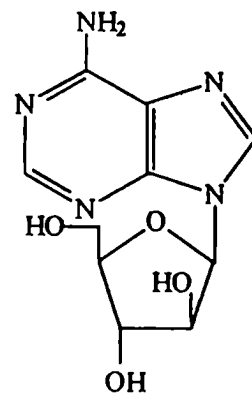
Dos drogas que ilustran lo mencionado anteriormente son la idoxuridina (5-iodo-2'-deoxiuridina) y trifluorotimidina (5-trifluorometil-2'-deoxiuridina)(Figura 1). Idoxuridina fue



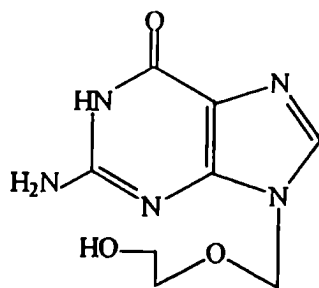
IDOXURIDINA



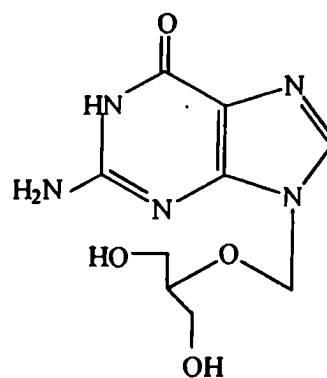
TRIFLUOROTIMIDINA



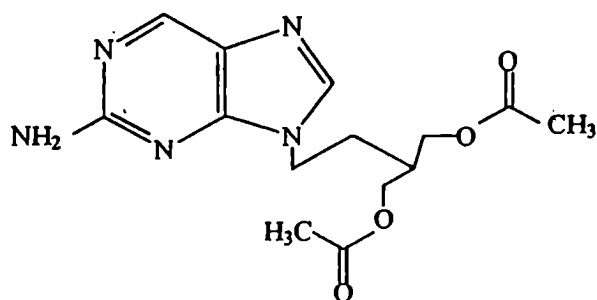
VIDARABINA



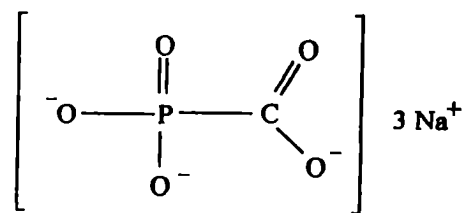
ACICLOVIR



GANCICLOVIR



FAMCICLOVIR



FOSCARNET

Figura 1: Compuestos aprobados para el tratamiento de infecciones herpéticas.

sintetizada por primera vez en 1959 por Prusoff (103) y posteriormente se demostró su capacidad para inhibir varios ADN virus (104). Sin embargo, cuando se la administró a pacientes por vía sistémica no disminuyó el riesgo de muerte por encefalitis herpética sino que por el contrario causó demielinización en la mayoría de los pacientes que fueron tratados con dicha droga. Por el contrario, la droga fue efectiva y mucho menos tóxica cuando se la administró en forma de tópicos a pacientes con queratitis herpética. Hoy en día se sigue usando con este propósito. La droga trifluorotimidina, desarrollada en un principio como agente antitumoral, fue utilizada para inhibir la replicación de HSV *in vitro*, pero su índice de selectividad era muy bajo comparado con el de otros agentes (25) y se la descartó para el uso sistémico. Esta droga, como la mencionada anteriormente, se utiliza también para el tratamiento tópico de la queratitis herpética. A pesar de las dificultades mencionadas, estas sustancias fueron importantes por cuanto demostraron la factibilidad de una terapia antiviral en pacientes. Por otra parte, mantuvieron el interés en la búsqueda ininterrumpida de agentes más selectivos.

En principio, todos los pasos que constituyen el ciclo de replicación viral ya descritos son blancos potenciales para ser interferidos por una droga antiviral. Sin embargo, para herpesvirus los mayores logros se obtuvieron al ensayar inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos. Esto se debe al hecho de que enzimas como las nucleósido quinasas y las



ADN polimerasas son codificadas tanto por el virus como por las células, pero las propiedades de dichas enzimas pueden diferir en gran medida con respecto a la especificidad por el sustrato, la afinidad de unión por dicho sustrato y la susceptibilidad a la inhibición por distintos compuestos (30, 64). Diferencias como éstas han hecho posible la identificación de algunos pocos compuestos que inhiben selectivamente las funciones virales y permiten una terapia antiviral exitosa.

Vidarabina (9-beta-D-arabinofuranosiladenina) (Figura 1), fue el primer agente antiviral con licencia para ser usado por vía intravenosa en los Estados Unidos en el año 1978. Es un análogo del nucleósido adenosina y fue originariamente sintetizado y estudiado como agente antitumoral a principios de la década del 60. Luego se encontró que era activo *in vitro* contra HSV, VZV, HCMV, viruela y algunos virus ARN oncogénicos (114). Su forma de acción no ha sido completamente delineada, pero involucra la fosforilación del nucleósido por enzimas celulares (101) y la incorporación en la cadena creciente del ADN viral y celular, con la consiguiente reducción de la velocidad de síntesis (99).

El agente antiviral más efectivo para reducir la severidad de las infecciones causadas por HSV ha sido sin duda el aciclovir, 9-(2-hidroxietoximetil) guanina (Figura 1), descubierto al promediar la década del 70 (115). El compuesto es un análogo de guanosina, pero en vez de poseer

un anillo completo de ribosa unido a la base de purina, tiene una cadena lateral acíclica. El aciclovir difunde libremente al interior de las células pero se acumula y activa sólo en las células infectadas con herpesvirus debido a que el primer paso en la activación, la fosforilación de la posición 5' de la cadena lateral, es catalizado por una timidina quinasa codificada por el virus y no por quinasas celulares (30). Las siguientes fosforilaciones dando compuestos di y trifosfato, este último activo, son llevadas a cabo por enzimas celulares (87).

Durante la replicación del ADN, el aciclovir compite con el sustrato natural, dGTP, por la ADN polimerasa. Al poseer una mayor afinidad por la enzima, es incorporado preferencialmente a la cadena naciente de ADN (123). Dado que la molécula de aciclovir unida carece del hidroxilo 3', el siguiente nucleótido no se puede unir y se paraliza la replicación del ADN (28, 41). Además, el aciclovir se une a la polimerasa viral en forma irreversible, inactivándola completamente (42, 106). Tomando en consideración estas propiedades, aciclovir es un potente antiviral con un mínimo efecto sobre las funciones celulares. La inhibición de HSV-1 se consigue con una concentración de droga 3000 veces inferior a la necesaria para inhibir el crecimiento celular (30). Un análogo del aciclovir es el valaciclovir, éster obtenido por la adición del aminoácido valina (12). Si bien sus propiedades antivirales serían similares a las de

aciclovir se espera obtener mejores resultados al ser administrado por vía oral.

Ganciclovir, 9-(1,3-dihidroxi-2-propoximetil) guanina (Figura 1), es un análogo de nucleósido similar a aciclovir con la diferencia que contiene un átomo de carbono con un grupo hidroxilo unido en la posición 3' del anillo de ribosa. Es activo contra todos los herpesvirus humanos y es cien veces más activo contra HCMV que aciclovir (120). Es también más tóxico y por esta razón sólo se lo utiliza en el tratamiento de infecciones severas causadas por HCMV en pacientes inmunocomprometidos. El reemplazo del átomo de oxígeno del éter en la cadena lateral acíclica del ganciclovir por un grupo metilo produce un derivado denominado penciclovir (16). El perfil antiviral es similar al de aciclovir, con actividad contra HSV y VZV, pero no es efectivo contra HCMV. La biodisponibilidad de penciclovir es muy baja cuando se lo administra por vía oral y por eso una prodroga denominada famciclovir (Figura 1), que es el 6 deoxi diacetil derivado del penciclovir, fue desarrollada para este tipo de formulaciones (50).

Foscarnet (fosfonoformato trisódico) (Figura 1), es un análogo de pirofosfato. Se desarrolló hacia fines de la década del 70 como una alternativa menos tóxica y más efectiva que el ácido fosfonoacético, otro análogo del pirofosfato con propiedades antivirales (55). En la actualidad se lo utiliza para tratar la retinitis causada por HCMV en pacientes con SIDA (33). También es efectivo para el

tratamiento de infecciones por herpesvirus resistentes a aciclovir (21, 113). A diferencia de los análogos de nucleósidos, el foscarnet no necesita ser activado por quinasas celulares o virales. Por el contrario, la molécula se une directamente a los lugares de unión del pirofosfato de las ARN y ADN polimerasas, inhibiéndolas en una forma no competitiva con respecto al sustrato (93).

En resumen, los agentes aprobados en uno o más países para el tratamiento de las infecciones causadas por herpesvirus son la idoxuridina, trifluorotimidina, vidarabina y aciclovir para el tratamiento tópico de las infecciones herpéticas oculares; vidarabina y aciclovir para el tratamiento sistémico de la encefalitis producida por HSV; aciclovir para el tratamiento tópico o sistémico del herpes genital y para el tratamiento sistémico de las infecciones producidas por HSV o VZV en pacientes inmunosuprimidos; ganciclovir y foscarnet para el tratamiento sistémico de la retinitis causada por HCMV en pacientes con SIDA y el famciclovir empleado por vía oral para el tratamiento de herpes zoster.

## **2. Problemas de la terapia antiviral**

A diferencia de las bacterias, los virus no poseen muchos mecanismos que les permitan desarrollar resistencia a los agentes quimioterápicos. Tienen genomas sencillos y son

metabólicamente "inertes". No se observan en ellos cambios como los registrados en bacterias tales como disminución en la captación de antibióticos, adquisición de plásmidos de resistencia o inducción de enzimas inactivadoras. Sin embargo, los virus tienen dos propiedades que les permiten evadir potenciales inhibidores: 1) una tasa de multiplicación muy elevada en las células infectadas y 2) la capacidad de mutar muy rápidamente.

Comúnmente, la resistencia viral surge como consecuencia de mutaciones, dando lugar a cambios tanto en enzimas como en componentes estructurales del virión. El éxito de este mecanismo puede observarse en la infección de células *in vitro*, donde los virus desarrollan una marcada resistencia contra un agente inhibidor luego de unos pocos pasajes en presencia del mismo (35). Algunos herpesvirus resistentes fueron aislados de pacientes inmunocomprometidos tratados con drogas anticancerígenas o transplantados y tratados con inmunosupresores. Por otra parte, cada vez se conocen más casos de pacientes con SIDA que contraen severas enfermedades debidas a herpesvirus resistentes (31, 44). El fracaso del tratamiento de las lesiones producidas por herpes en pacientes con SIDA se debe frecuentemente a la resistencia del virus a la droga aciclovir. A pesar que el aciclovir resultó ser sumamente efectivo para reducir la severidad de las infecciones por HSV, la aparición de mutantes resistentes a dicha droga durante el tratamiento es una de las razones de la búsqueda continua de nuevos compuestos antivirales.

Una estrategia para evadir la aparición de mutantes resistentes es aplicar terapias combinadas, utilizando alternadamente drogas que ataquen distintos blancos. De este modo se persiguen tres propósitos: 1) incrementar la eficacia respecto de la terapia en la que se utiliza una sola sustancia antiviral, 2) disminuir la toxicidad reduciendo la dosis de cada droga individual y 3) prevenir el desarrollo de resistencia hacia un determinado compuesto. Sin embargo, debe considerarse la posible resistencia cruzada entre distintas drogas antivirales. La resistencia a un compuesto es usualmente acompañada por un descenso en la susceptibilidad a otras drogas de la misma clase, aunque también se encontró resistencia cruzada entre drogas distintas, lo que indicaría una superposición de los sitios de unión al blanco afectado (22). Por tal motivo, se trata de utilizar compuestos que actúen sobre diferentes blancos.

### **3. Polisacáridos como agentes antivirales**

Los polisacáridos constituyen una clase de macromoléculas biológicas de estructura diversa que presentan una amplia variedad de propiedades fisicoquímicas, que son la base de sus innumerables aplicaciones en el campo de la farmacología y la medicina. Estas incluyen actividad anticoagulante, acción antitumoral, actividad inhibitoria de

ADN polimerasas, inducción de interferon, capacidad inmunomoduladora y efectos antivirales (36).

El uso rutinario del método de placas para titular virus animales llevó al descubrimiento de componentes inhibidores presentes en el agar utilizado para cubrir los cultivos celulares, que fueron identificados como polisacáridos sulfatados (127). A pesar de que las propiedades antivirales de los polisacáridos sulfatados se conocen desde hace 30 años (89), los estudios recientes en los cuales se demostró que sustancias polianiónicas inhiben la replicación de HIV, reactualizaron el interés por estos compuestos (61).

Diversos polisacáridos sulfatados como la heparina, el dextran sulfato, el pentosan polisulfato, los carragenanos, los mananos y galactanos sulfatados, el lentinan sulfato, el condroitin sulfato y el glicosaminoglicano sulfatado, presentan actividad antiviral a muy bajas concentraciones y tienen también muy baja citotoxicidad, alcanzando en consecuencia altos índices de selectividad (26). Estas sustancias mostraron ser potentes inhibidores de la replicación *in vitro* de diversos virus pertenecientes a las familias *Retroviridae*: HIV (134), *Herpesviridae*: HSV y HCMV (117), *Rhabdoviridae*: virus de la estomatitis vesicular (VSV) (117), *Orthomyxoviridae*: virus de influenza A (59), *Paramyxoviridae*: RSV (117), *Arenaviridae*: virus Junín y virus Tacaribe (6), *Togaviridae*: virus Sindbis y virus de Semliki forest (79), *Picornaviridae* (78) y *Papovaviridae* (119).

Los virus más susceptibles a la acción de los polisacáridos sulfatados han sido HIV, HSV y HCMV, todos de gran importancia como patógenos humanos. No hay aún suficientes estudios que muestren la real aplicación clínica de los polisacáridos en la terapia sistémica o tópica de infecciones por HSV. Sin embargo, es interesante hacer notar que para este virus se ha encontrado sinergismo entre el aciclovir y el dextran sulfato en estudios tanto *in vivo* como *in vitro* (97), lo que permite postular a los polisacáridos sulfatados como compuestos de factible aplicación en terapias combinadas contra estos agentes.

#### **4. Antivirales de origen natural**

La continua búsqueda de nuevas sustancias antivirales que superen a las pocas ya conocidas ha llevado en los últimos años a una creciente cantidad de investigaciones basadas en el ensayo de productos naturales. Esto abre la posibilidad de utilizar sustancias accesibles y abundantes en la naturaleza, las que una vez purificadas pueden ser también obtenidas por síntesis química o ser mejoradas en su actividad a través de modificaciones en su molécula.

Muchos investigadores se dedicaron al estudio de productos naturales provenientes de plantas superiores, hongos, algas y animales marinos tratando de buscar compuestos que tuvieran la capacidad de inhibir la



replicación viral (109, 116, 129). Los herpesvirus junto con HIV son los agentes patógenos contra los que se ensayan, en el muestreo inicial, la mayoría de los extractos naturales. Así se han logrado aislar compuestos naturales activos contra HSV-1 y HSV-2 de diversa composición química, incluyendo péptidos (7), polifenoles como el tanino o la lignina (38, 39), flavonas (4), biflavonas (52), flavonoides (11, 53), alcaloides (108, 137), diterpenoides (51), triterpenos (3), tricotecenos (94, 95) y otras sustancias aún no determinadas (1, 54, 68) (Cuadro 1).

Una de las principales fuentes para la búsqueda de compuestos con actividad biológica (antiviral, antitumoral o inmunomoduladora) es el mar. Al respecto, en 1974 la Universidad de Illinois en Urbana puso en práctica un programa tendiente al estudio de productos naturales (109), ensayando las propiedades antivirales, antitumorales, antibacterianas e inmunomoduladoras en extractos de más de 3000 muestras de organismos marinos. Se vió que la actividad antiviral se asociaba frecuentemente con extractos obtenidos a partir de poríferos, celenterados y tunicados. Más recientemente, en un programa de muestreo, el National Cancer Institute (Bethesda, Estados Unidos) reportó que esteroides y fucanos sulfatados obtenidos a partir de esponjas y estrellas marinas eran activos inhibidores de la replicación de HIV-1 y HIV-2 (14, 82).

También las algas han sido utilizadas para el aislamiento de sustancias bioactivas. En este caso, los

CUADRO 1

## ALGUNOS PRODUCTOS NATURALES ACTIVOS CONTRA HSV

| Fuente                          | Tipo de compuesto          | Etapa del ciclo viral afectada                           | Ref. |
|---------------------------------|----------------------------|--|------|
| <b>Plantas superiores</b>       |                            |  |      |
| <i>Melia azedarach L.</i>       | Péptido cíclico            | Síntesis de proteínas tardías                            | 7    |
| <i>Pinus parviflora</i>         | Polifenol                  | Adsorción  | 38   |
| <i>Cephalotaxus drupacea</i>    | Biflavona                  | Transcripción y síntesis de proteínas                    | 52   |
| <i>Scoparia dulcis L.</i>       | Flavonoide                 | Transcripción, traducción y síntesis de proteínas        | 53   |
|                                 | Diterpenoide               | Fusión, transporte de nucleocápsides y liberación de ADN | 51   |
| <i>Citrus sinensis</i>          | Alcaloide                  | Síntesis de ADN  | 137  |
| <i>Anagallis arvensis</i>       | Triterpeno                 | Adsorción, penetración maduración                        | 3    |
| <i>Alternanthera brasiliana</i> | No identificado            | Síntesis de ADN  | 68   |
| <i>Populus nigra</i>            | 3-metil-But-2 enil cafeato | Síntesis de ADN  | 5    |
| <b>Hongos</b>                   |                            |  |      |
| <i>Fusarium sp.</i>             | Tricoteceno                | Síntesis proteica  | 94   |
| <i>Alternaria tenuis</i>        | Acido tenuazónico          | No determinada   | 125  |
| <i>Alternaria alternata</i>     | Metabolito no identificado | No determinada   | 29   |
| <i>Trichoderma polysporum</i>   | Péptido                    | Formación de sincicios                                   | 83   |

| Fuente                     | Tipo de compuesto      | Etapa del ciclo viral afectada  | Ref. |
|----------------------------|------------------------|---------------------------------|------|
| <b>Algas</b>               |                        |                                 |      |
| <i>Schizymenia dubyi</i>   | Polisacárido sulfatado | Adsorción                       | 15   |
| <i>Aghardhiella tenera</i> | Galactano sulfatado    | Adsorción                       | 135  |
| <i>Spirulina platensis</i> | No identificado        | Penetración y síntesis proteica | 54   |

compuestos extraídos con mayor frecuencia han sido polisacáridos sulfatados. Estos compuestos son constituyentes de la pared celular y de acuerdo al tipo de alga se han aislado distintas clases de polisacáridos. Así, en las algas rojas los principales polisacáridos solubles presentes en la pared celular son galactanos sulfatados, constituídos por unidades repetitivas de galactosa que pueden diferir en el tipo de unión, el nivel y patrón de sulfatación y las cadenas laterales de otros azúcares. Entre los galactanos sulfatados más ampliamente estudiados se encuentran los carragenanos, que presentan una reconocida actividad inhibitoria contra distintos virus envueltos (45, 46). Un lambda-carragenano constituído por 73 % de galactosa, 20 % de sulfato y 0,65 % de 3,6-anhidrogalactosa aislado del alga roja *Schizymenia pacifica* mostró ser un potente inhibidor de la transcriptasa reversa de HIV (90). También se han aislado galactanos sulfatados a partir de otras dos algas rojas como *Schizymenia dubyi* (15) y *Aghardhiella tenera* (135). En el primer caso, el galactano presentaba la particularidad de tener un alto contenido de ácidos urónicos, mostrando actividad antiviral contra HIV, HSV-1 y 2 y VSV; en tanto que el galactano aislado de *A. tenera* fue efectivo para un amplio espectro de virus tales como HIV-1 y 2, herpes, toga, mixo y rabdovirus.

Las algas pardas también representan una fuente importante de polisacáridos bioactivos, en este caso fundamentalmente fucanos sulfatados, es decir polímeros de fucosa. Se ha descrito el aislamiento de fucanos activos

inhibidores de HIV a partir de *Fucus vesiculosus* (13). Además, se aislaron fucanos a partir de otras dos algas de la familia *Fucaceae*: *Fucus disticus* y *Pelvetia fastigiata* que inhibieron la reacción entre los antígenos de superficie del virus de la hepatitis B y del virus de hepatitis de la marmota y sus anticuerpos específicos (130).

También se aisló un polímero de glucosa denominado paramylon, a partir del alga *Euglena gracilis*, que luego de ser sulfatado resultó inhibidor de la citopatogenicidad y la expresión de antígenos virales en células infectadas con HIV (65).

Por último, hay numerosos extractos crudos, obtenidos a partir de algas, cuya estructura química aún no se conoce que fueron activos contra distintos virus animales. Así, por ejemplo, extractos de distintas algas verde azuladas (*Cyanophyta*) inhibieron la transcriptasa reversa de HIV y del virus de la mieloblastosis aviar (72), en tanto que un extracto del alga *Spirulina platensis* afectó la penetración de HSV-1 en células Vero (54).

En conjunto, todos estos antecedentes remarcan la particular trascendencia que pueden llegar a tener las sustancias naturales en la terapia antiviral. Dentro de este campo, las algas marinas representan una fuente rica en probables agentes antivirales de bajo costo y con escasos efectos adversos para el organismo.

## II. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo de tesis fueron:

1) Analizar la actividad antiviral de diferentes polisacáridos sulfatados extraídos de algas marinas utilizando principalmente virus de la familia *Herpesviridae*.

2) Estudiar el mecanismo de acción antiviral de aquellos compuestos que presentaron mayor actividad y mínima citotoxicidad utilizando como modelo HSV-1.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 1. Obtención y fraccionamiento de los polisacáridos sulfatados

Los polisacáridos sulfatados utilizados en este trabajo fueron extraídos a partir de las algas rojas *Nothogenia fastigiata*, *Pterocladia capillacea* y *Corallina officinalis*. La obtención y el fraccionamiento de cada compuesto se explica a continuación.

##### a. A partir del alga *Nothogenia fastigiata*

El alga roja *Nothogenia fastigiata* crece fija a las rocas del piso mesolitoral de la costa patagónica y de Tierra del Fuego (Argentina). Las muestras fueron colectadas cerca de la Estación Algológica de Puerto Deseado y se secaron al aire libre. Los polisacáridos sulfatados fueron extraídos con agua a ebullición según lo descrito por Matulewicz y Cerezo (80). Los polisacáridos solubles en agua fueron fraccionados con cetrimida de la siguiente manera: A 500 ml de una solución acuosa conteniendo 4,95 g de polisacáridos se agregaron lentamente y con agitación 50 ml de una solución acuosa de cetrimida al 10 % (p/v). Se separó el precipitado por centrifugación y se lo resuspendió en agua. Se agregó NaCl con agitación constante hasta una concentración de 0,5 M. Se continuó la agitación por 16-18 horas. Posteriormente

se centrifugó y el sobrenadante fue extraído con 1-pentanol, dializado, concentrado y liofilizado. Este proceso se repitió incrementando la concentración de NaCl entre 0,5 y 1,0 M cada vez hasta llegar a una concentración máxima de sal de 4,0 M en la cual el precipitado residual fue resuspendido en agua. Dicha suspensión fue dializada y liofilizada. En el cuadro 2 se muestran los rangos de concentración salina utilizados en el fraccionamiento y el análisis de las siete fracciones obtenidas, las cuales fueron denominadas F1 a F7. En la figura 2 se muestra la estructura química de estos compuestos.

Por otra parte, al tratar el compuesto F6 con cloruro de hidrógeno 0,1 M en metanol anhidro se consiguió una desulfatación del mismo de un 87,4 %, expresado como porcentaje de SO<sub>3</sub>Na. Este compuesto desulfatado fue utilizado en los ensayos tendientes a determinar la incidencia de los grupos sulfato en su actividad antiviral.

#### **b. A partir del alga *Pterocladia capillacea***

Plantas tetraspóricas del alga agarofita *Pterocladia capillacea* fueron colectadas en La Paloma (Departamento de Rocha, Uruguay), secadas al aire y clasificadas en el Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (Buenos Aires, Argentina). Para la obtención de los polisacáridos, se lavaron 42 g de algas con agua conteniendo NaClO (0,1% de una solución con un máximo de 6% de cloro activo) y se molieron. Se hizo luego una extracción con 3 litros de agua conteniendo

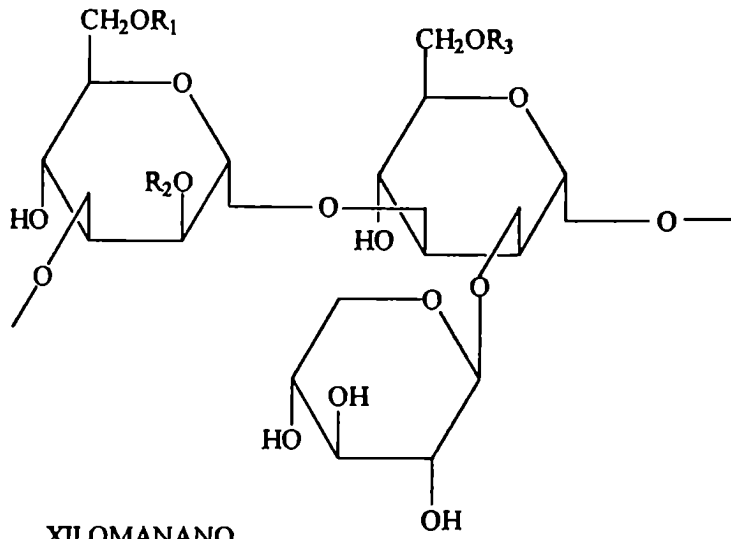


CUADRO 2

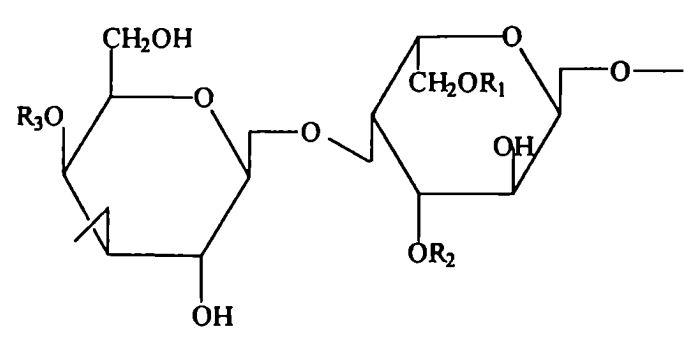
ANALISIS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS A PARTIR  
DEL ALGA *Nothogenia fastigiata*

| Propiedad                         | Fracción |         |         |         |         |         |      |
|-----------------------------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|------|
|                                   | F1       | F2      | F3      | F4      | F5      | F6      | F7   |
| Rango de redisolución (NaCl M)    | 0-0,5    | 0,5-1,0 | 1,0-1,5 | 1,5-2,0 | 2,0-3,0 | 3,0-4,0 | 4,0  |
| Rendimiento (%)                   | 22,9     | 11,8    | 22,9    | 11,6    | 13,9    | 6,6     | 10,3 |
| Sulfato (% SO <sub>3</sub> Na)    | 12,9     | 19,2    | 23,4    | 27,6    | 15,3    | 31,7    | 14,0 |
| Peso molecular                    | ND       | 11.000  | 39.700  | 65.100  | 6.400   | 30.000  | ND   |
| Composición de azúcares (moles %) |          |         |         |         |         |         |      |
| Ramnosa                           | 3,0      | 2,6     | --      | --      | --      | --      | 1,1  |
| Arabinosa                         | 2,6      | 2,5     | 1,7     | 1,9     | tr      | --      | 4,4  |
| Xilosa                            | 18,6     | 23,7    | 23,2    | 10,6    | 2,4     | 2,1     | 10,3 |
| Manosa                            | 12,1     | 57,1    | 68,4    | 77,8    | 94,2    | 97,9    | 17,0 |
| Galactosa                         | 54,4     | 11,9    | 6,7     | 9,8     | 1,6     | tr      | 64,5 |
| Glucosa                           | 9,3      | 2,2     | --      | --      | 1,8     | --      | 2,7  |

ND: no determinado  
tr: trazas



**XILOMANANO**  
 Si  $R_1 = R_2 = H$ ,  $R_3 = H$  o  $SO_3Na$   
 Si  $R_1 = SO_3Na$ ,  $R_2 = H$ ,  $R_3 = H$  o  $SO_3Na$   
 Si  $R_1 = H$ ,  $R_2 = SO_3Na$ ,  $R_3 = H$  o  $SO_3Na$



**XILOGALACTANO**  
 Si  $R_1 = SO_3Na$ ,  $R_2 =$  ramificaciones simples de D xilosa o galactosa  
 Si  $R_1 = H$ ,  $R_2 = H$  o  $SO_3Na$   
 Para  $F_1$   $R_3 = H$  y para  $F_7$   $R_3 = SO_3Na$

Figura 2: Estructura básica de los xilomananos y xilogalactanos obtenidos a partir del alga *Nothogenia fastigiata*.

3 ml de la solución de NaClO, con agitación mecánica por 4 horas a temperatura ambiente. Se separó el residuo por centrifugación y el sobrenadante se dializó, concentró y liofilizó. El residuo fue sometido cuatro veces más al procedimiento descripto. Se juntaron los productos crudos (1,3 g), se disolvieron en 500 ml de agua y se eliminó el material insoluble (0,3 g) por centrifugación. Por último, se concentró y liofilizó el sobrenadante obteniéndose 1,0 g del compuesto al que se denominó S1 (32).

Teniendo en cuenta su composición química, la cual se muestra en el cuadro 3, se puede definir al compuesto S1 como un galactano sulfatado.

#### **c. A partir del alga *Corallina officinalis***

El alga fue recogida en Miramar (Provincia de Buenos Aires, Argentina), molida y tratada con HCl para destruir la cubierta de carbonato de calcio que representa entre el 80 y el 90 % del peso seco del alga. Luego se realizó una precipitación con isopropanol. El producto así obtenido fue cromatografiado utilizando una resina DEAE Sephadex A-50, obteniéndose 11 fracciones al eluir con concentraciones crecientes de NaCl (20). De todas ellas, las denominadas Fr2I y Fr4II fueron utilizadas en este trabajo. El análisis de ambas fracciones y su composición de azúcares se detallan en el cuadro 4.

## CUADRO 3

ANALISIS DEL COMPUESTO S1 OBTENIDO A PARTIR DEL ALGA  
*Pterocladia capillacea*

| Propiedad                         | S1                   |
|-----------------------------------|----------------------|
| Temperatura de extracción         | Temperatura ambiente |
| Rendimiento (%)                   | 2,9                  |
| Sulfato (% SO <sub>3</sub> Na)    | 13,2                 |
| Peso molecular                    | 4.600                |
| Composición de azúcares (moles %) |                      |
| Galactosa                         | 62,2                 |
| 3,6-Anhidro Galactosa             | 14,0                 |
| 2-Metil Galactosa                 | 1,4                  |
| Xilosa                            | 7,8                  |
| Manosa                            | 2,8                  |
| Glucosa                           | 9,0                  |
| Ramnosa                           | 2,8                  |

CUADRO 4

ANALISIS DE LAS FRACCIONES Fr2I y Fr4II  
OBTENIDAS DEL ALGA *Corallina officinalis*

| Propiedad                         | Fracción |        |
|-----------------------------------|----------|--------|
|                                   | Fr2I     | Fr4II  |
| Rendimiento (%)                   | 5,5      | 18,4   |
| Sulfato (% SO <sub>3</sub> Na)    | 6,4      | 12,5   |
| Peso molecular                    | 2.700    | 21.000 |
| Composición de azúcares (moles %) |          |        |
| Xilosa                            | 17       | 27     |
| Galactosa                         | 53       | 67     |
| 2-O-Metil Galactosa               | 27       | 24     |
| 3-O-Metil Galactosa               | 4        | 7      |
| 4-O-Metil Galactosa               | 11       | 2      |
| 6-O-Metil Galactosa               | 5        | tr     |
| Glucosa                           | 6        | <2,5   |

tr= trazas (< 0,7 %)

## 2. Células

Se utilizaron las líneas celulares que se detallan a continuación:

Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), HEp-2 (carcinoma epidermoide humano de laringe), BHK-21 (riñón de hamster) y MRC-5 (células diploides de pulmón humano).

## 3. Medios de cultivo

### a. Medio de crecimiento celular (MC)

Para el cultivo en monocapa de las células Vero, HEp-2 y BHK-21 se utilizó MEM adicionado con 50 µg/ml de gentamicina y suplementado con 5 % de suero bovino inactivado. Para las células MRC-5, se empleó MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino no inactivado y 0,6 g/l de glutamina. Cuando los cultivos fueron incubados en estufa gaseada (4 % de CO<sub>2</sub>) se adicionó HEPES en una concentración final de 20 mM.

### b. Medio de mantenimiento celular (MM)

Para las células Vero, BHK-21 y HEp-2 se utilizó MEM con 1,5 % de suero bovino inactivado; mientras que para las células MRC-5 se empleó MEM suplementado con 3 % de suero fetal bovino.

### **c. Medio de plaqueo (MP)**

Se utilizó MEM 1,5 % pero preparado en doble concentración, el cual se mezcló en partes iguales con metil celulosa o con agar al 1,4 % en agua bidestilada, según el virus utilizado en el experimento.

## **4. Ensayo de citotoxicidad**

Los diferentes cultivos celulares fueron puestos en contacto con distintas concentraciones de los polisacáridos sulfatados en MM e incubados durante 48 horas a 37 °C.

Como controles se emplearon cultivos de cada línea celular incubados en idénticas condiciones pero en ausencia de los compuestos. Terminado el tiempo de incubación, se resuspendieron las células con tripsina y se contaron en cámara de Neubauer las células viables adicionando 10  $\mu$ l de una solución de azul tripán al 0,5 %. Para cada compuesto se calculó la concentración citotóxica 50 % (CC50) es decir la concentración de droga capaz de reducir el número de células viables en un 50 % respecto del control.

## **5. Virus**

Se utilizaron los siguientes virus: virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepas F y KOS y las mutantes deficientes en

timidina quinasa (TK<sup>-</sup>) B2006 y Field, virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2) cepa G, virus de pseudorrabia (PrV) cepa RC 79, citomegalovirus humano (HCMV) cepa Davis, virus respiratorio sincicial (RSV) cepa Long, virus de la estomatitis vesicular (VSV) cepa Indiana, virus Junín cepas IV 4454 y XJCl3, y virus Polio tipo 1 cepa Sabin.

#### **a. Preparación de las suspensiones virales**

Para preparar las suspensiones de virus correspondientes a las distintas cepas de HSV-1, HSV-2 y PrV, se infectaron monocapas de células Vero con una  $m$  que osciló entre 0,01 y 0,05 UFP/célula. El inóculo se dejó adsorber por 1 hora a 37°C. Transcurrido este período, se descartó el virus no adsorbido y se cubrieron las células con MM. Luego de 24 horas p.i. y cuando la monocapa mostraba el 90 % de las células redondeadas debido a la acción citopática del virus, las mismas fueron lisadas sometiéndolas a dos ciclos de congelamiento y descongelamiento. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación durante 15 minutos a 1000 g y se guardó el sobrenadante a - 70 °C hasta el momento de ser usado. Los títulos virales obtenidos en células Vero oscilaron entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFP/ml.

Las suspensiones de VSV, Polio y las dos cepas de virus Junín fueron preparadas también en células Vero con la diferencia que para VSV y Polio se recogió el virus extracelular a las 24 horas p.i. y para el virus Junín a las 72 horas p.i.. Los títulos fueron de  $2 \times 10^7$  UFP/ml para VSV,



$5 \times 10^5$  UFP/ml para Polio y  $1 \times 10^6$  UFP/ml para el virus Junín.

La suspensión de RSV se obtuvo infectando células HEp-2 y cosechando el sobrenadante a las 72 horas p.i.. Su título calculado por el método de punto final fue de  $3 \times 10^6$  DICT50/ml.

Para preparar la suspensión de HCMV se infectaron monocapas de células MRC-5. Al séptimo día se lisaron las células por sonicación y luego de eliminar los restos celulares por centrifugación se tituló el sobrenadante por el método de punto final. El título obtenido fue de  $3 \times 10^3$  DICT50/ml.

#### **b. Marcación de viriones con radioisótopos y purificación**

Se infectaron monocapas de células Vero con HSV-1 cepa F ( $m=0,01$ ). Luego de 1 hora de adsorción a  $37^\circ\text{C}$  se volcó el inóculo y se adicionó MM. Se incubó 3 horas más a  $37^\circ\text{C}$ . Luego se volcó el medio, se lavó 2 veces con PBS y se colocó MM conteniendo 1,5% de suero de ternera dializado y [ $^{35}\text{S}$ ]-L-metionina ( $10 \mu\text{Ci/ml}$ ) (NEN, actividad específica 1250 Ci/mmol). A las 24 horas, cuando la acción citopática sobre las células era notoria (90 % de la monocapa redondeada) se volcó el medio, se lavó con buffer TRIS 0.01M, NaCl 50mM, se resuspendieron las células en 1 ml de ese mismo buffer y se las sometió a un proceso de congelamiento y descongelamiento para liberar el virus producido. Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación durante 15 minutos a 5.000 rpm

y el sobrenadante se sembró sobre un colchón de sacarosa 30 % en buffer TRIS 50 mM, NaCl 0.85 % Se ultracentrifugó 3 horas a 40.000 rpm a 4 °C en un rotor Beckman SW 55 Ti. El sedimento se resuspendió en PBS que contenía 1,5 mg/ml de BSA.

## 6. Ensayos de infectividad

### a. Titulación en cultivo de células por UFP

Las monocapas de células Vero fueron crecidas en microplacas de 24 pocillos con fondo plano (para titular HSV-1, HSV-2, PrV, VSV y Junín) o en botellas de vidrio de 15 ml (para el virus Polio). En todos los casos se infectaron por duplicado las monocapas celulares con diluciones seriadas al décimo de las suspensiones de virus a titular (volumen de inóculo = 0,1 ml cuando la titulación se realizó en microplacas o 0,2 ml cuando se usaron botellas). El inóculo se dejó adsorber 1 hora a 37 °C con agitación periódica. Al cabo de ese tiempo, se descartó el virus no adsorbido y las monocapas se cubrieron con MP conteniendo metilcelulosa (titulación en microplaca) o agar (titulación en botella). Los cultivos se incubaron a 37 °C por 2 días para todos los virus salvo para el virus Junín que requirió un período de incubación de 7 días. Luego de dicho período, se eliminó el MP, se fijaron las células con formol al 10 % durante 30

minutos y se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% en etanol 10 %.

Se realizó el recuento de las placas de lisis y los títulos se calcularon según la siguiente fórmula:

$$\text{Título (UFP/ml)} = \frac{n}{v \times d}$$

donde n: promedio del número de placas contadas

v: volumen del inóculo

d: dilución en la cual se contaron las placas

#### **b. Titulación en cultivo de células por el método de punto final (Acción citopática: ACP)**

Para la titulación de RSV y HCMV se utilizaron células HEp-2 y MRC-5, respectivamente. Las monocapas celulares fueron crecidas en microplacas de 24 pocillos con fondo plano y se infectaron por cuadruplicado con 0,1 ml de diluciones seriadas al décimo de cada suspensión viral. El inóculo se dejó adsorber durante 1 hora a 37 °C descartando luego el virus no adsorbido. Se cubrieron las células con MM y se volvieron a incubar a la misma temperatura. Los cultivos se observaron diariamente a la lupa, efectuándose la lectura definitiva de la ACP a los 5 días p.i. para RSV y a los 15 días p.i. para HCMV. Se consideró como respuesta positiva a aquel pocillo que presentaba un redondeamiento significativo de las células en comparación a los controles sin infectar. La dosis infectiva 50 % para cultivo de tejidos (DICT50) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (107)

## **7. Determinación de la actividad antiviral**

### **a. Reducción en el número de placas**

Se infectaron monocapas de células Vero o MRC-5 crecidas en microplacas de 24 pocillos con 50 UFP/pocillo de los diferentes virus, en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de los compuestos antivirales. Luego de 1 h de adsorción a 37 °C, se retiró el virus no adsorbido, se lavaron las monocapas con PBS y las células se cubrieron con MP. Luego de un tiempo de incubación adecuado para cada virus, se contaron las placas previa tinción con cristal violeta.

### **b. Inhibición del rendimiento viral**

Células de diverso origen fueron infectadas con los distintos virus utilizando multiplicidades de infección que oscilaban según los experimentos entre 0,1 y 0,0001, en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de los compuestos antivirales. Luego de 1 h de adsorción a 37 °C, se retiró el virus no adsorbido, se lavaron las monocapas con PBS, se cubrieron las células con MM y se incubaron a 37 °C por 24 horas (salvo en los casos en que se indica que la incubación se prolongó por 48 horas). Transcurrida la incubación, se rompieron las células sometiéndolas a dos ciclos de congelación y descongelación. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación durante 15 minutos a

1000g y se tituló el virus del sobrenadante mediante el ensayo de UFP en células Vero.

### **c. Inhibición de la acción citopática**

Se infectaron monocapas de células HEp-2 crecidas en microplacas de 24 pocillos por cuadruplicado con 30 DICT50 de RSV en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de los compuestos antivirales. Luego de 1 hora de adsorción a 37 °C, se eliminó el virus no adsorbido y se lavaron las monocapas con PBS. Se continuó la incubación a 37 °C, efectuándose la lectura final de la ACP a los 5 días p.i. Se tomaron como respuestas positivas aquellos pocillos que mostraban una reducción significativa de la citopatogenicidad viral en relación a los controles de virus en donde los compuestos no estuvieron presentes.

En todos los métodos se calculó la concentración inhibitoria 50 % (CI50) como la concentración del compuesto requerida para reducir la citopatogenicidad o el rendimiento del virus en un 50%.

### **8. Efecto virucida de los polisacáridos**

Se incubó durante 1 hora a 37 °C una suspensión de HSV-1 cepa F ( $8,8 \times 10^7$  UFP/ml) en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de los polisacáridos . Luego de

dicha incubación, se diluyó el virus con MM y se lo tituló por UFP en células Vero, asegurándose que en la dilución en que se contaron las placas la concentración de las drogas fuera tal que no ejercieran su acción antiviral. El índice virucida (IV) fue calculado aplicando la fórmula que se muestra a continuación:

$$IV = \frac{\text{Título viral en presencia de droga}}{\text{Título viral sin droga (control)}}$$

## 9. Influencia del tiempo de adición del compuesto antiviral

Se infectaron monocapas de células Vero con HSV-1 cepa F ( $m = 0,1$ ) y se agregó el compuesto F6 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) simultáneamente (tiempo 0) o a distintos tiempos p.i.. Como control se utilizó un cultivo sin droga. En todos los casos se determinó el rendimiento viral a las 24 horas p.i. por un ensayo de UFP.

## 10. Ensayos de adsorción viral

### a. Adición de los compuestos durante o después de la adsorción

Se infectaron células Vero con 50 UFP de HSV-1 cepa F aplicando 4 tratamientos diferentes:

Tratamiento 1: Las células fueron infectadas en presencia de los compuestos (F6= 5  $\mu\text{g/ml}$ , S1= 25  $\mu\text{g/ml}$ ) y luego de 1 hora de adsorción a 4 °C los mismos fueron removidos junto al virus no adsorbido. Las células se lavaron con PBS y se cubrieron con MP conteniendo la misma concentración de F6 y S1 empleada en la adsorción.

Tratamiento 2: Los compuestos estuvieron presentes solamente en la adsorción, ya que luego de lavar las células se agregó MP sin las drogas.

Tratamiento 3: Se infectaron las monocapas celulares en ausencia de los compuestos, los cuales fueron agregados luego de la adsorción junto con el MP.

Tratamiento 4: Se infectaron las células en ausencia de polisacáridos y se incubaron en MP también sin drogas (tratamiento control).

En todos los casos los cultivos fueron incubados por 48 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de placas correspondientes a cada tratamiento.

## **b. Cinética de adsorción viral**

### **1. Determinada por infectividad**

Se incubaron células Vero por 0, 10, 20, 30, 40 y 60 minutos a 4 °C con HSV-1 cepa F ( $m= 1$ ) en ausencia o en presencia de 5  $\mu\text{g/ml}$  de F6 o 25  $\mu\text{g/ml}$  de S1. Luego se lavaron las células con PBS frío y se las lisó sometiéndolas a dos

ciclos de congelación y descongelación. Se determinó la cantidad de virus adsorbido a las células por UFP.

## **2. Determinada por la unión de viriones radioactivos**

Células Vero pretratadas por 1 hora a 37 °C con PBS que contenía 1 % de suero de ternera, 0,1 % de glucosa y 0,5 % de BSA para evitar uniones inespecíficas, fueron infectadas con 50  $\mu$ l de virus marcado con  $^{35}\text{S}$  L-metionina ( $7,3 \times 10^6$  UFP/ml,  $4 \times 10^6$  cpm/ml) en presencia o ausencia de 100  $\mu$ g/ml de F6 o 200  $\mu$ g/ml de S1 e incubadas a 4 °C. A distintos tiempos p.i. se retiró el virus no adsorbido y se lavaron las monocapas 3 veces con PBS frío. Se agregó 0,2 ml de OHNa 0,1 N, SDS 1 % y se lo dejó actuar 15 minutos. Luego se agregaron 3 ml de líquido de centelleo (tritón X-100 237 ml, PPO 4,13 g, dimetil POPOP 75 mg, tolueno 500 ml) y se contó la radioactividad unida a la célula en un contador de centelleo líquido durante 1 minuto.

## **c. Influencia de la concentración de F6 y S1 sobre la adsorción**

### **1. Determinada por infectividad**

Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F ( $m= 1$ ) en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de F6. Luego de 30 minutos de adsorción a 4 °C, las células fueron lavadas con PBS y lisadas por congelamiento y



descongelamiento. La cantidad de virus adsorbido a las células se determinó por UFP.

## 2. Determinada por la unión de viriones radioactivos

Se pretrataron las células Vero por 1 hora a 37 °C con PBS conteniendo 1 % de suero fetal bovino, 0,1 % de glucosa y 0,5 % de BSA. Luego, se incubaron las células por 30 minutos a 4 °C con HSV-1 marcado con  $^{35}\text{S}$  L-metionina ( $7,3 \times 10^6$  UFP/ml,  $4 \times 10^6$  cpm/ml) en presencia de diferentes concentraciones de F6 y S1. Transcurrido el período de incubación, se midió la radioactividad asociada a las células en un contador de centelleo líquido como se describió anteriormente.

## 11. Internalización viral

Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F ( $m=1$ ), permitiendo la adsorción por 30 minutos a 4 °C. Luego se lavaron las monocapas 3 veces con PBS frío y se incubaron a 37 °C en presencia de F6 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) o S1 (25  $\mu\text{g/ml}$ ), o en ausencia de drogas como control. A distintos tiempos post-adsorción se midió el virus internalizado utilizando un ensayo de centros infecciosos. Para ello, se lavaron las monocapas 3 veces con PBS frío y se trataron por 45 minutos a 4 °C con una solución de proteinasa K (250  $\mu\text{g/ml}$ ) en PBS para

eliminar el virus adsorbido pero no internalizado. Para frenar la acción de la proteínasa K se agregó PMSF (fenilmetil-sulfonil-fluoruro) 2 mM en PBS conteniendo 3 % de BSA. Las células fueron centrifugadas por 5 minutos a 800 rpm, se lavaron 2 veces con PBS conteniendo 3 % de BSA y se resuspendieron en MM. Se hicieron diluciones seriadas al décimo de la suspensión celular y se inocularon sobre monocapas de células Vero. Luego de 1 hora a 37 °C se cubrió con MP y se revelaron las placas al cabo de 48 horas de incubación a 37 °C.

## **12. Inhibición de la expresión de proteínas virales**

Se midió el efecto de los compuestos sobre la expresión de proteínas virales en células infectadas con HSV-1 a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

### **a. Preparación de suero inmune anti HSV-1**

El suero inmune anti HSV-1 cepa F se obtuvo inmunizando conejos, los cuales recibieron 5 inyecciones a intervalos de 15 días por vía intramuscular. Por dosis se administró 1 ml de una suspensión de HSV-1 en PBS (título=  $1 \times 10^7$  UFP/ml) adyuvado con igual volumen de adyuvante completo de Freund, en la primera inoculación, e incompleto en las restantes. Una semana después de la última inyección se sangraron los animales por punción cardíaca. Se dejó coagular la sangre 1

hora a 37 °C y posteriormente se separó el suero por centrifugación a 1000 g. El suero así obtenido se guardó fraccionado a - 20 °C hasta su uso.

#### **b. Purificación de IgG de conejo anti HSV-1**

Para la purificación de la IgG de conejo anti HSV-1 se partió de 6 ml de suero inmune el cual fue puesto en contacto con una suspensión de  $1 \times 10^7$  células Vero e incubado por 1 hora a 37 °C. Se centrifugó 15 minutos a 3.000 rpm y se repitió el procedimiento con una nueva suspensión de células. Estas absorciones se hicieron con el objeto de eliminar posibles anticuerpos contra células Vero presentes en el suero. El sobrenadante (5 ml) se precipitó agregándole 3,3 ml de una solución saturada de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  gota a gota en frío y con agitación constante. Se continuó la agitación por 4 horas a 4 °C y luego se centrifugó por 30 minutos a 3.000 rpm a temperatura ambiente. El precipitado fue resuspendido en 2,5 ml de agua destilada, se dializó contra solución fisiológica por 24 horas y por último contra agua destilada. Se centrifugó 20 minutos a 3.000 rpm para eliminar las globulinas insolubles. Posteriormente, se cromatografió utilizando una resina Whatman DE 52, empleando en la elución un buffer fosfato 0,02 M pH 7,3.

#### **c. Reacción de inmunofluorescencia indirecta**

Se infectaron monocapas de células Vero, crecidas sobre cubreobjetos colocados en el fondo de los pocillos de las

microplacas, con la cepa F de HSV-1 ( $m= 0,01$ ). Los compuestos antivirales fueron agregados durante la adsorción o con posterioridad a dicha etapa. Como controles se utilizaron monocapas infectadas en ausencia de compuestos. A las 24 horas p.i. se lavaron las monocapas 3 veces (5 minutos cada lavado) con 1 ml de PBS, con agitación. Para fijar las células se agregó 0,5 ml de metanol y se colocaron a  $- 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Se volvió a lavar con PBS como se describió anteriormente. Se agregó 0,5 ml de una solución 1:150 de IgG de cabra purificada por DEAE y se incubó 15 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se colocó 40  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:200 de IgG de conejo purificada anti HSV-1. Se incubó en cámara húmeda 30 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se lavó 3 veces como en los lavados anteriores. Se colocó sobre las monocapas 40  $\mu\text{l}$  de una dilución 1:50 de IgG de cabra anti IgG de conejo marcada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Chemical Co.). Se incubó 30 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se lavó 2 veces con PBS y 2 veces con agua destilada. Se colocó 0,5 ml de azul de Evans (1:10.000 en agua), dejando el colorante de contraste por 3 minutos para luego montar los preparados sobre glicerina tamponada conteniendo 2,5 % de DABCO.

Se hizo el recuento de células fluorescentes en 20 campos de cada preparado y los resultados se expresaron como porcentaje de células fluorescentes en los cultivos tratados con F6 y S1 respecto del control.

### 13. Inhibición de la formación de rosetas

#### a. Sensibilización de los glóbulos rojos de carnero

Se lavaron con PBS glóbulos rojos de carnero (GRC) conservados en solución de Alsever y se preparó una suspensión al 5 % . A un volumen de dicha suspensión se le agregó un volumen igual de suero anti-GRC de complementado 30 minutos a 56 °C y diluido 1:2.500 (dosis máxima no aglutinante). La mezcla se incubó por 15 minutos a 37 °C. Transcurrida la incubación, se centrifugaron los GRC 2 minutos a 2.000 rpm y se lavaron con solución salina de Veronal (VBS = Solución A: NaCl 21,25 g, barbiturato de sodio 0,9375 g, agua destilada csp 350 ml. Solución B: ácido dietilbarbitúrico 1,4375 g, agua destilada csp 125 ml. Solución C: MgCl<sub>2</sub> 2 M. Solución D: CaCl<sub>2</sub> 0,6 M. Se mezclaron A y B en las cantidades totales y se adicionó 0,625 ml de las soluciones C y D. Se llevó a 500 ml con agua destilada. El pH fue de 7,5. Para su uso se la diluyó 1:5 con agua destilada). Los GRC se resuspendieron en el mismo buffer en el volumen original. Se adicionó un volumen igual de suero de ratón AKR diluido 1:10 como fuente de complemento. Se incubó la mezcla a 37 °C por 45 minutos. Luego se lavaron los GRC 2 veces con VBS y una vez con MM. Se resuspendieron en MM en el volumen original.

**b. Obtención de células Vero infectadas con HSV-1**

Se infectaron monocapas de células Vero con HSV-1 cepa F (m = 1). A las 24 horas p.i. se desprendieron las células por agitación vigorosa, se centrifugaron y se resuspendieron en MM.

**c. Realización de la técnica de rosetas**

Se preincubaron las células infectadas por 30 minutos a 37 °C con distintas concentraciones de los compuestos antivirales. Se agregaron posteriormente los GRC sensibilizados como se describió previamente (1 célula Vero:100 GRC). Se centrifugaron 30 segundos a 2.000 rpm para favorecer el contacto de las células y se incubaron por 1 hora a 37 °C. Se resuspendieron suavemente, se tiñeron con colorante de Giemsa y se efectuó el recuento de células que formaban rosetas. Se consideró como rosetas a aquellas células que tenían unidos más de 5 GRC.

## IV. RESULTADOS

### A. Muestreo de la actividad antiviral y citotóxica de los polisacáridos sulfatados

#### 1. Actividad antiviral contra HSV-1 de las distintas fracciones de polisacáridos

Con el objeto de realizar un muestreo inicial de la actividad antiviral de los distintos polisacáridos sulfatados, se efectuaron ensayos de inhibición del rendimiento de HSV-1 cepa F en células Vero en presencia de distintas concentraciones de cada compuesto. Como se detalla en MATERIALES Y METODOS, se analizaron siete compuestos obtenidos del fraccionamiento del alga *Nothogenia fastigiata*, cinco mananos (F2, F3, F4, F5 y F6) y dos galactanos (F1 y F7); un galactano obtenido del alga *Pterocladia capillacea* (S1) y dos fracciones denominadas Fr2I y Fr4II, también galactanos, derivadas del alga *Corallina officinalis*. En las figuras 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos, habiéndose agrupado los compuestos de acuerdo a su composición o sea en mananos (Figura 3) y galactanos (Figura 4). De las cinco fracciones de mananos analizadas de *Nothogenia fastigiata*, cuatro mostraron la capacidad de inhibir la replicación de HSV-1 en forma dependiente de la

## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE DIFERENTES MANANOS SULFATADOS

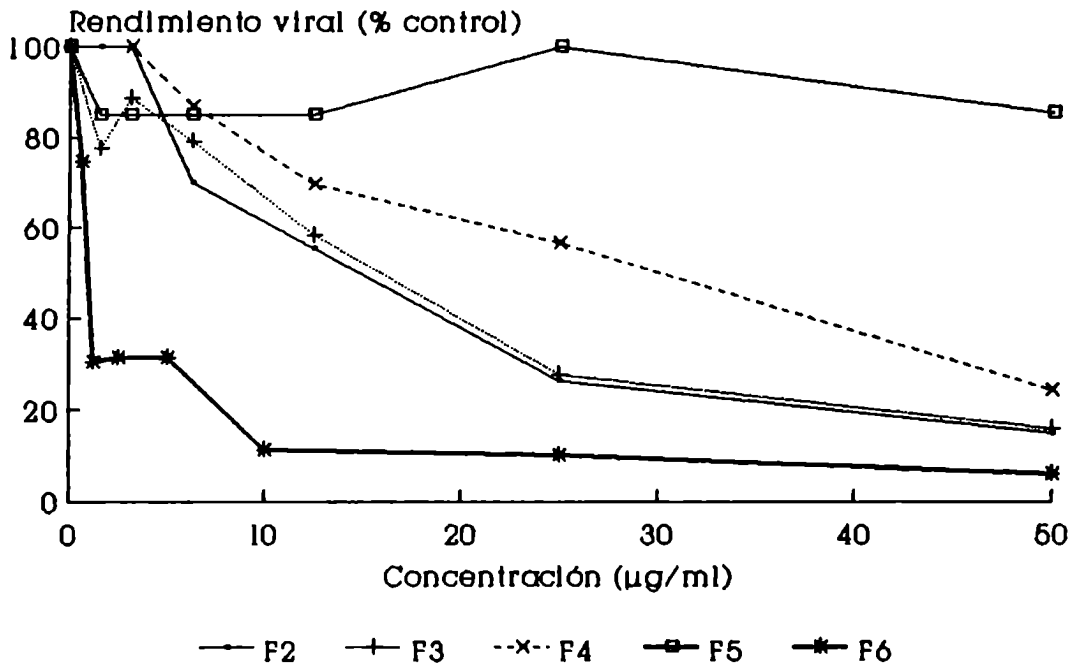


Figura 3: Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F ( $m = 0,01$ ) en presencia de distintas concentraciones de cada manano sulfatado. Luego de 24 horas de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , se cuantificó el virus producido por UFP. Los resultados se expresan como: UFP/ml en células tratadas con polisacáridos / UFP/ml en células no tratadas (control)  $\times 100$ . Los valores representados son el promedio de dos experimentos.



## DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE DIFERENTES GALACTANOS SULFATADOS

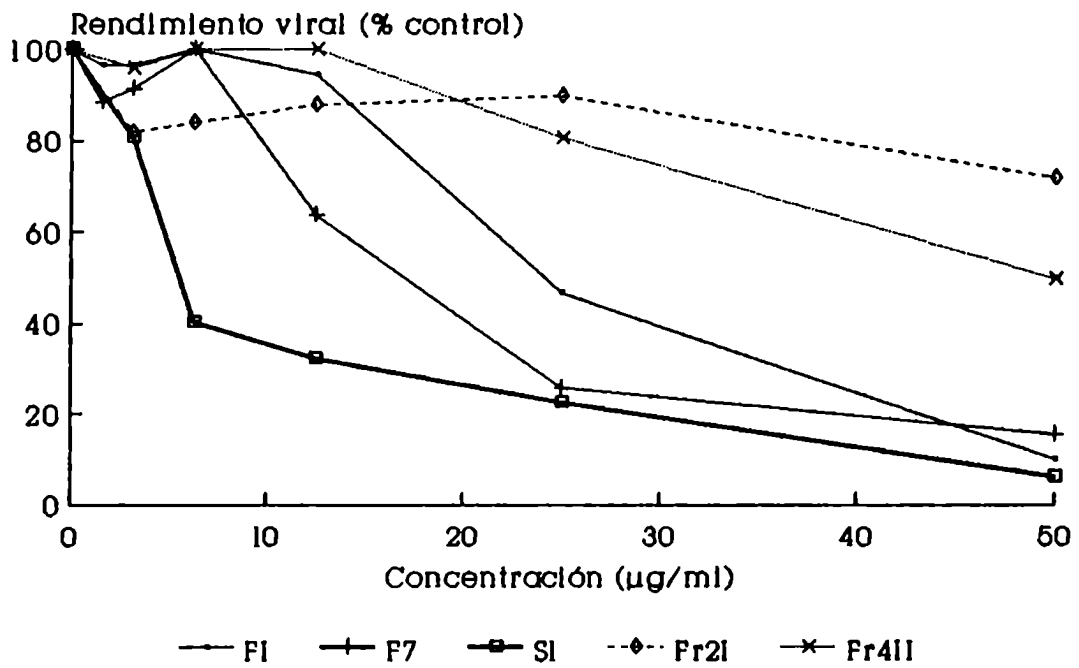


Figura 4: Se realizó un ensayo de inhibición del rendimiento viral en las mismas condiciones descritas en la figura 3.

concentración. Según se observa en la figura 3, el compuesto F6 fue el más activo. Por el contrario, el compuesto F5, que al igual que el anterior presenta un contenido de manosa superior al 90 % en su composición, no fue efectivo para inhibir la replicación de HSV-1 aún en la máxima concentración probada. Los mananos F2, F3 y F4 mostraron una actividad antiviral intermedia.

De los galactanos, el compuesto S1 fue el que mostró mayor actividad antiviral (Figura 4). Los compuestos F1 y F7, obtenidos a partir de *Nothogenia fastigiata*, fueron menos activos, mientras que del alga *Corallina officinalis*, la fracción Fr4II sólo mostró una leve actividad inhibitoria contra HSV-1 cuando se la ensayó en la máxima concentración, en tanto que Fr2I no mostró actividad.

A partir de estos datos, se calculó la CI50 para cada uno de los compuestos (Cuadro 5), siendo F6 y S1 los más activos con una CI50 de 0,92 y 5,11  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Por tal motivo se decidió utilizar estos dos polisacáridos como sistemas modelos de manano y galactano, respectivamente, para caracterizar sus propiedades antivirales.

## 2. Citotoxicidad de los polisacáridos

Ninguno de los compuestos estudiados mostró efectos citotóxicos para las células Vero en las concentraciones empleadas para el ensayo de actividad antiviral ya expuesto

CUADRO 5

DETERMINACION DE LA CI50 DE POLISACARIDOS SULFATADOS

| Alga                          | Compuesto | Tipo de polisacárido | CI50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-------------------------------|-----------|----------------------|---------------------------|
| <i>Nothogenia fastigiata</i>  | F1        | galactano            | 24,30                     |
|                               | F2        | manano               | 14,80                     |
|                               | F3        | manano               | 14,40                     |
|                               | F4        | manano               | 30,00                     |
|                               | F5        | manano               | >50,00                    |
|                               | F6        | manano               | 0,92                      |
|                               | F7        | galactano            | 17,00                     |
| <i>Pterocladia capillacea</i> | S1        | galactano            | 5,11                      |
| <i>Corallina officinalis</i>  | Fr2I      | galactano            | >50,00                    |
|                               | Fr4II     | galactano            | 50,00                     |

La CI50 fue calculada por un ensayo de inhibición del rendimiento viral a partir de los datos presentados en las figuras 3 y 4.

en las figuras 3 y 4. En particular se estudió luego la citotoxicidad de los dos compuestos más activos, utilizando mayores dosis y para distintas líneas celulares. Para ello se incubaron células Vero, BHK-21, MRC-5 y HEp-2 a 37 °C por 48 horas con distintas concentraciones de los compuestos a probar. Las monocapas celulares tratadas con los polisacáridos fueron observadas a las 24 horas con un microscopio invertido, no registrándose cambios morfológicos importantes con respecto al control sin polisacáridos. A las 48 horas de incubación, se vió un redondeamiento de algunas células solamente en aquellos cultivos tratados con las dosis más altas de polisacáridos. Luego del período de incubación, se hizo un recuento de células viables calculándose la CC50 de ambos compuestos para cada línea celular (Cuadro 6). Cabe mencionar que las células MRC-5 y HEp-2, a pesar de ser ambas de origen humano, mostraron diferente susceptibilidad a la presencia de los compuestos. Esta diferencia estaría dada por las características de cada cultivo celular. Como se describió en MATERIALES Y METODOS, las MRC-5 son células normales diploides de pulmón, mientras que las células HEp-2 son una línea poliploide derivada de tejido tumoral de laringe. A diferencia de las células MRC-5, las HEp-2 experimentan un rápido crecimiento en condiciones apropiadas de cultivo, pero sufren una sensible disminución de la viabilidad al alcanzar un crecimiento confluyente. Este rápido envejecimiento del cultivo podría ser una causa determinante para hacerlas más susceptibles a los compuestos.

CUADRO 6

CITOTOXICIDAD DE F6 Y S1 PARA DISTINTAS LINEAS CELULARES

| Línea celular                | CC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |      |
|------------------------------|---------------------------|------|
|                              | F6                        | S1   |
| Vero<br>(riñón de mono)      | 118                       | 494  |
| BHK-21<br>(riñón de hamster) | 130                       | 250  |
| MRC-5<br>(pulmón humano)     | 258                       | >500 |
| HEp-2<br>(carcinoma humano)  | 72                        | 170  |

CC50: Determinada por recuento de células viables luego de ser incubadas 48 horas a 37 °C con distintas concentraciones de cada compuesto.

Tanto F6 como S1 presentaron una CC50 para células Vero muy superior a la CI50 para HSV-1 obtenida utilizando la misma línea celular (Cuadro 5), por lo que resultaron promisorios antivirales por su alto grado de selectividad.

### 3. Espectro de acción de F6 y S1 contra otros virus

A fin de conocer mejor el espectro de acción antiviral de F6 y S1, se analizó el efecto de estos compuestos sobre otros virus humanos pertenecientes a distintas familias (Cuadro 7). Se comprobó que ninguno de los dos compuestos fue efectivo, en las dosis ensayadas, contra virus Junín, virus Polio tipo 1 y RSV. Tampoco mostraron acción inhibitoria contra VSV, patógeno de animales.

Cabe mencionar que el compuesto F6 fue ensayado contra el virus de la inmunodeficiencia humana HIV (en experimentos efectuados en el Rega Institute for Medical Research de Bélgica por el grupo de trabajo dirigido por el Dr. E. De Clercq), mostrando una cierta actividad pero mucho menor que la observada para HSV-1, como se observa en los cuadros 5 y 7.

CUADRO 7

## ESPECTRO DE ACCION DE F6 Y S1 CONTRA DISTINTOS VIRUS

| Virus                                   | Cultivos celulares | CI50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |     |
|---|--------------------|---------------------------|-----|
|   |                    | F6                        | S1  |
| Polio tipo 1<br>(cepa Sabin)            | Vero               | >50                       | >50 |
| Junin<br>(cepa IV 4454)<br>(cepa XJCl3) | Vero               | >50                       | >50 |
|   | Vero               | >50                       | >50 |
| VSV<br>(cepa Indiana)                   | Vero               | >50                       | >50 |
| RSV<br>(cepa Long)                      | HEp-2              | >40                       | >40 |
| HIV-1<br>(cepa HTLV-III <sub>B</sub> )  | MT-4               | 13,70                     | ND  |
| HIV-2<br>(cepa LAV-2 <sub>ROD</sub> )   | MT-4               | 13,40                     | ND  |

La CI50 para virus polio, Junin y VSV fue calculada por el método de reducción del número de placas en células Vero. Para RSV, la CI50 fue determinada por un ensayo de inhibición del efecto citopático en células HEp-2. Para HIV-1 y HIV-2, se determinó la CI50 infectando células MT-4 con 100 DICT<sub>50</sub> en presencia de varias concentraciones de los compuestos. El número de células viables fue registrado a los cinco días por el método de MTT (27).  
ND= No determinada.

#### 4. Actividad antiviral de F6 y S1 contra herpesvirus

De los estudios efectuados con los distintos virus, surge que la actividad antiviral de los compuestos fue máxima para HSV-1. Por lo tanto se decidió ensayar la susceptibilidad de otros miembros de la familia *Herpesviridae* a F6 y S1 (Cuadro 8). Ambos compuestos fueron activos contra distintas cepas de HSV-1, como F y KOS, y contra las mutantes TK<sup>-</sup> B2006 y Field, registrándose pequeñas variaciones en el valor de la CI50. También mostraron actividad antiviral contra HSV-2 y PrV en concentraciones similares a las determinadas para las cepas de HSV-1, siendo la CI50 mayor para HCMV, ya que este último virus mostró una menor susceptibilidad a los compuestos.

La baja citotoxicidad de F6 y S1 para las células Vero y MRC-5 (Cuadro 6) y su buena capacidad inhibitoria contra herpesvirus se reflejó en un alto índice de selectividad de los mismos (Cuadro 8). Al comparar las CI50 de ambos compuestos, se ve que F6 fue más efectivo que S1 para todos los herpesvirus ensayados. Sin embargo, dada la menor citotoxicidad de S1, al comparar los IS para algunos virus se invirtió la potencia de los compuestos (Cuadro 8).

Por otra parte, para evaluar la eficacia de estos compuestos en relación a otros antivirales ya conocidos, se comparó la CI50 de los mismos con la de otro polisacárido sulfatado como es el dextran sulfato, que presenta una reconocida actividad inhibitoria en la replicación de varios



CUADRO 8  
 ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE F6 Y S1 CONTRA DISTINTOS VIRUS  
 DE LA FAMILIA HERPESVIRIDAE

| Virus                                 | CI50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |       | IS (CC50/CI50) |       |
|---------------------------------------|---------------------------|-------|----------------|-------|
|                                       | F6                        | S1    | F6             | S1    |
| HSV-1<br>(cepa F)                     | 0,69                      | 6,12  | 171,0          | 80,7  |
| HSV-1<br>(cepa KOS)                   | 0,81                      | 3,21  | 145,6          | 153,8 |
| TK <sup>-</sup> HSV-1<br>(cepa B2006) | 1,26                      | 3,44  | 93,6           | 143,6 |
| TK <sup>-</sup> HSV-1<br>(cepa Field) | 0,61                      | 4,83  | 193,4          | 102,2 |
| HSV-2<br>(cepa G)                     | 0,67                      | 7,53  | 176,1          | 65,6  |
| PrV<br>(cepa RC 79)                   | 0,66                      | 6,25  | 178,7          | 79,0  |
| HCMV<br>(cepa Davis)                  | 4,28                      | 12,05 | 60,3           | >41,5 |

CI50: Calculada por el método de reducción del número de placas.  
 CC50: Determinada por recuento de células viables luego de ser incubadas 48 horas a 37 °C con distintas concentraciones de cada compuesto. Los valores correspondientes se muestran en el cuadro 6.

IS: Índice de selectividad.

virus humanos (81, 97, 134). La CI50 del dextran sulfato 5000, para el sistema HSV-1 - células Vero determinada mediante un ensayo de reducción en el número de placas, fue de 2,1  $\mu\text{g/ml}$ . Esta concentración resultó ser aproximadamente 3 veces mayor que la correspondiente a F6 y 3 veces menor que la de S1 para el mismo sistema virus-célula (Cuadro 8).

El conjunto de los resultados obtenidos en este muestreo inicial de las propiedades antivirales de distintos polisacáridos extraídos de algas marinas indican la existencia de dos compuestos, F6 y S1, con un elevado índice de selectividad en su efecto inhibitorio sobre distintos herpesvirus.

#### **B. Determinación de la actividad antiviral de F6 y S1 en distintas condiciones experimentales**

Las condiciones de trabajo en el ensayo antiviral son especialmente importantes cuando se desea comparar la actividad inhibitoria de diferentes compuestos a fin de evaluar cuál resulta más eficiente. Es por ello que numerosos parámetros experimentales deben ser fijados cuando se realiza la determinación de la CI50.

De los experimentos llevados a cabo con HSV-1, se vió que la actividad antiviral de F6 y S1 no difería

significativamente cuando los compuestos fueron probados contra distintas cepas de herpesvirus (Cuadro 8).

Además de este factor, se estudió la posible influencia de otros parámetros tales como el tipo de célula, la multiplicidad de infección y la técnica empleada en la determinación de la actividad antiviral.

### **1. Actividad antiviral de F6 y S1 contra HSV-1 en distintas líneas celulares**

Los compuestos F6 y S1 presentaron una clara actividad antiviral contra HSV-1, inhibiendo su multiplicación en células Vero. Para demostrar que este efecto inhibitorio no se limitaba solamente al sistema de células derivadas de riñón de mono, se probó la actividad antiviral sobre otras líneas celulares de distinto origen como son las células HEp-2 derivadas de un carcinoma epitelial humano y las células BHK-21 de riñón de hamster.

En el cuadro 9 se muestran las CI50 de ambos polisacáridos en las distintas líneas celulares infectadas con HSV-1 cepa F. Los resultados obtenidos demostraron que tanto F6 como S1 mantuvieron su actividad inhibitoria independientemente de la línea celular utilizada, siendo otra vez F6 más activo que S1 para inhibir la replicación viral. Las CI50 de ambos compuestos en los distintos tipos de

CUADRO 9

## ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE F6 Y S1 EN DISTINTAS LINEAS CELULARES

| Línea celular | CI50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                 |
|---------------|---------------------------|-----------------|
|               | F6                        | S1              |
| Vero          | 0,92 $\pm$ 0,11           | 5,11 $\pm$ 0,62 |
| HEp-2         | 0,60 $\pm$ 0,01           | 8,92 $\pm$ 0,30 |
| BHK-21        | 0,41 $\pm$ 0,03           | 4,51 $\pm$ 0,53 |

La CI50 se determinó por el método de inhibición del rendimiento viral, infectando monocapas de distintas líneas celulares con la cepa F de HSV-1 con una  $m= 0,01$  en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos. El rendimiento viral a las 24 horas fue determinado por UFP empleando células Vero.

células mostraron pequeñas variaciones en sus valores, pero siempre dentro del mismo orden de magnitud.

## **2. Influencia de la multiplicidad de infección**

Para determinar la influencia de la concentración inicial de virus sobre la CI50, se realizó un ensayo de inhibición del rendimiento viral, inoculando monocapas de células Vero con la cepa F de HSV-1 a distintas multiplicidades de infección, que iban desde 0,0001 a 0,1 UFP/célula, en presencia de distintas concentraciones de F6 y en ausencia del compuesto. En el cuadro 10 se muestran los valores de la CI50 correspondientes a las distintas multiplicidades ensayadas. Se observó un pequeño incremento de la CI50 en función de la multiplicidad de infección. Sin embargo, al aumentar 1000 veces la cantidad de virus inicial, la CI50 sólo se incrementó al doble y por lo tanto se puede concluir que la multiplicidad de infección no influye sustancialmente en la determinación de la CI50 de F6 para HSV-1 en los valores analizados.

## **3. Determinación de la CI50 empleando distintas técnicas**

Con el objeto de analizar la influencia de la técnica empleada para calcular la CI50, se determinó el valor de la

CUADRO 10

INFLUENCIA DE LA MULTIPLICIDAD DE INFECCION DE HSV-1  
SOBRE LA CI50 DE F6

| Multiplicidad de infección | CI50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|----------------------------|---------------------------|
| 0,0001                     | 0,61 $\pm$ 0,03           |
| 0,001                      | 0,81 $\pm$ 0,20           |
| 0,01                       | 0,85 $\pm$ 0,09           |
| 0,1                        | 1,35 $\pm$ 0,19           |

Monocapas de células Vero fueron infectadas con la cepa F de HSV-1 empleando distintas multiplicidades de infección en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de F6. La CI50 se obtuvo por el método de inhibición del rendimiento viral.

misma para dos cepas de HSV-1 (F y KOS), utilizando para cada una en paralelo el método de reducción del número de placas y el de inhibición del rendimiento viral. Además, para este último método, se analizó la posible variación de la CI50 en función del tiempo p.i. en que se midió el rendimiento de virus (24 o 48 horas p.i.). Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 11. La CI50 de F6 calculada por los dos métodos fue prácticamente similar, registrándose un incremento cuando se midió el rendimiento a las 48 horas.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que la actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados contra virus herpes simplex no se ve afectada sustancialmente por variaciones en diversos parámetros tales como el origen de la línea celular, la multiplicidad de infección y el método utilizado para determinar la CI50.

### **C. Mecanismo de acción de F6 y S1**

#### **1. Efecto virucida de los polisacáridos sobre HSV-1**

Con el objeto de determinar el mecanismo de acción de los polisacáridos sulfatados, se trató de establecer en primer lugar si estas drogas actuaban inactivando el virus a través de un efecto virucida o si se comportaban como

CUADRO 11

INFLUENCIA DEL ENSAYO EMPLEADO EN LA DETERMINACION  
DE LA CI50 DE F6 PARA DOS CEPAS DE HSV-1

| Ensayo antiviral                              | CI50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                 |
|---|---------------------------|-----------------|
|   | Cepa F                    | Cepa KOS        |
| Reducción del número de placas                | 0,61 $\pm$ 0,16           | 0,81 $\pm$ 0,05 |
| Inhibición del rendimiento viral (24 hs p.i.) | 0,61 $\pm$ 0,03           | 0,61 $\pm$ 0,06 |
| Inhibición del rendimiento viral (48 hs p.i.) | 1,30 $\pm$ 0,22           | 1,07 $\pm$ 0,24 |

Para ambos métodos se utilizaron monocapas de células Vero infectadas con 50 UFP de la cepa de HSV-1 correspondiente, en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de F6. Para el ensayo de inhibición del rendimiento viral, se determinó el virus producido a las 24 y 48 horas p.i. por UFP.



verdaderos agentes antivirales, inhibiendo alguna etapa del ciclo de replicación viral. Para ello, se realizó un experimento en donde se midió la inactivación del virus por contacto directo con distintas concentraciones de F6 y S1. Como se observa en el cuadro 12, ninguno de los compuestos produjo inactivación directa del virión, no registrándose una reducción significativa en el título del virus incubado con F6 ó S1 con respecto al control sin droga.

Estos resultados demuestran que los polisacáridos no ejercen su acción inhibitoria por un efecto virucida sino que actúan durante el ciclo de replicación viral.

## **2. Influencia del tiempo de adición de F6 sobre la replicación de HSV-1**

Para determinar inicialmente si los polisacáridos ejercían su acción sobre una etapa temprana o tardía del ciclo de multiplicación, el compuesto F6 fue agregado a células Vero infectadas con HSV-1 a distintos tiempos de infección, midiéndose el rendimiento viral por UFP a las 24 horas p.i..

En la figura 5 se ve que la inhibición del rendimiento viral fue máxima al agregar F6 a tiempo 0, o sea junto con el inóculo viral. Cuando se agregó el compuesto luego de la hora de adsorción, la inhibición fue menos pronunciada, no

CUADRO 12

DETERMINACION DEL EFECTO DE F6 Y S1 SOBRE LA  
INACTIVACION DE HSV-1

| Concentración<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Título de HSV-1 (UFP/ml) |                   | I V  |      |
|---------------------------------------|--------------------------|-------------------|------|------|
|                                       | F6                       | S1                | F6   | S1   |
| 0                                     | $8,8 \times 10^7$        | $8,8 \times 10^7$ | 1,00 | 1,00 |
| 0,31                                  | $6,4 \times 10^7$        | N H               | 0,73 | -    |
| 0,62                                  | $1,0 \times 10^8$        | N H               | 1,13 | -    |
| 1,25                                  | $8,8 \times 10^7$        | $9,4 \times 10^7$ | 1,00 | 1,07 |
| 2,50                                  | $1,0 \times 10^8$        | $8,3 \times 10^7$ | 1,13 | 0,94 |
| 5,00                                  | $9,4 \times 10^7$        | $7,0 \times 10^7$ | 1,07 | 0,80 |
| 10,00                                 | N H                      | $7,2 \times 10^7$ | -    | 0,82 |
| 20,00                                 | N H                      | $9,8 \times 10^7$ | -    | 1,11 |

Se incubaron alícuotas de HSV-1 ( $8,8 \times 10^7$  UFP/ml) con distintas concentraciones de F6 y S1 por 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  y luego se tituló el virus remanente por UFP. Los datos son el promedio de dos experimentos.

I V : Índice virucida =  $\frac{\text{Título de HSV-1 en presencia de droga}}{\text{Título de HSV-1 sin droga (control)}}$

N H : No hecho

### INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ADICION DE F6 SOBRE LA REPLICACION DE HSV-1

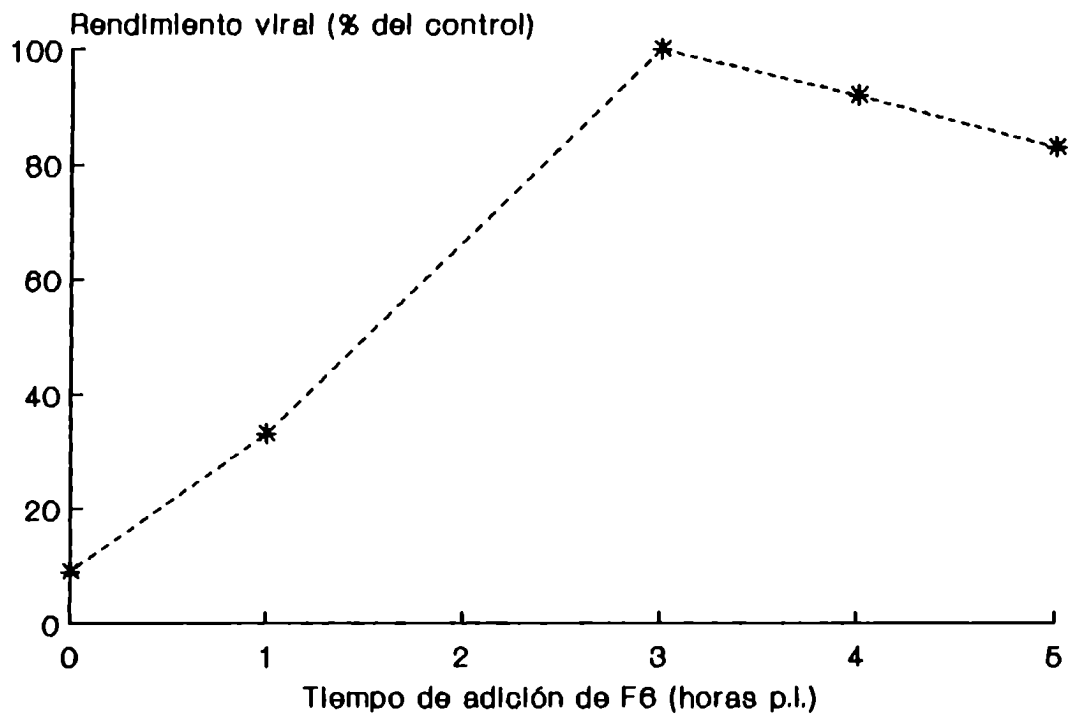


Figura 5: Se infectaron células Vero con HSV-1 ( $m = 0,1$ ) y se agregó F6 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) simultáneamente (tiempo 0) o a los tiempos indicados luego de la infección. En todos los cultivos, se determinó el rendimiento viral a las 24 horas p.i. por un ensayo de placas. Los resultados se expresan como el porcentaje del virus obtenido en los cultivos tratados con F6 respecto del cultivo control sin tratar. Los valores representados son el promedio de dos experimentos.

registrándose efecto inhibitorio si el mismo era agregado después de ese tiempo.

### **3. Acción de F6 y S1 sobre la adsorción viral**

#### **a. Efecto de F6 y S1 agregados durante o después de la adsorción de HSV-1**

Dado que el compuesto F6 ejercía su acción en una etapa muy temprana del ciclo replicativo de HSV-1, se estudió en un principio el efecto tanto de F6 como de S1 sobre la adsorción viral.

La importancia de la presencia de los polisacáridos en dicha etapa se determinó por un ensayo de reducción del número de placas, habiéndose realizado la adsorción en presencia o ausencia de los compuestos y agregando o no los mismos al MP como se explica en MATERIALES Y METODOS. Como se observa en el cuadro 13, la actividad inhibitoria de ambos compuestos fue máxima cuando estuvieron presentes a lo largo de todo el ensayo o cuando se los agregó solamente en la adsorción, mientras que cuando se los adicionó con posterioridad a la misma no tuvieron efecto.

Estos resultados demuestran que la presencia de los compuestos solamente en la adsorción fue suficiente para que los mismos ejercieran su actividad antiviral.

CUADRO 13

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE F6 Y S1 AGREGADOS  
DURANTE O DESPUES DE LA ADSORCION VIRAL

| Compuesto presente   |                         | N° de placas |    | Inhibición (%) |    |
|----------------------|-------------------------|--------------|----|----------------|----|
| durante la adsorción | después de la adsorción | F6           | S1 | F6             | S1 |
| SI                   | SI                      | 8            | 9  | 85             | 82 |
| SI                   | NO                      | 6            | 5  | 90             | 90 |
| NO                   | SI                      | 54           | 51 | 4              | 0  |
| NO                   | NO                      | 56           | 50 | 0              | 0  |

Se infectaron cultivos de células Vero con 50 UFP de HSV-1 cepa F, en medio de cultivo con o sin polisacáridos (F6= 5 µg/ml, S1= 25 µg/ml). Luego de 1 hora de adsorción a 4 °C, se removi6 el virus no adsorbido y el compuesto. Las células fueron cubiertas con MP conteniendo o nó el mismo compuesto en la concentración utilizada anteriormente. Al cabo de 48 horas de incubación a 37 °C se determinó el número de placas en cada cultivo. Los resultados presentados son el promedio de dos experimentos.

**b. Efecto de F6 y S1 sobre la adsorción de HSV-1 medida por infectividad.**

Para estudiar con mayor detalle el efecto de los polisacáridos sobre la adsorción, se analizó en primer lugar la cinética de adsorción de HSV-1 en presencia o ausencia de los compuestos. Desde el comienzo, se observó una disminución de la cantidad de virus adsorbido a las células en aquellos cultivos infectados en presencia de F6 y S1 (Figura 6). Este efecto se hizo más notorio con el transcurrir del tiempo, ya que en aquellos cultivos sin tratar la cantidad de virus adsorbido aumentó, mientras que en los cultivos tratados con los polisacáridos la misma se mantuvo constante.

Por otra parte, la acción inhibitoria sobre la adsorción viral resultó ser dependiente de la concentración, lo que confirma un efecto específico del polisacárido sobre esa etapa del ciclo de multiplicación viral (Figura 7). A partir de los resultados presentados en dicha figura, se calculó la CI50 de F6 sobre el proceso de adsorción que resultó ser de 0,45  $\mu\text{g/ml}$ , valor similar al que se obtuvo cuando se la calculó para todo el ciclo de multiplicación de HSV-1 por reducción en el número de placas o por inhibición del rendimiento viral (0,61  $\mu\text{g/ml}$ ).

### EFFECTO DE F6 Y S1 SOBRE LA CINETICA DE ADSORCION DE HSV-1 A CELULAS VERO

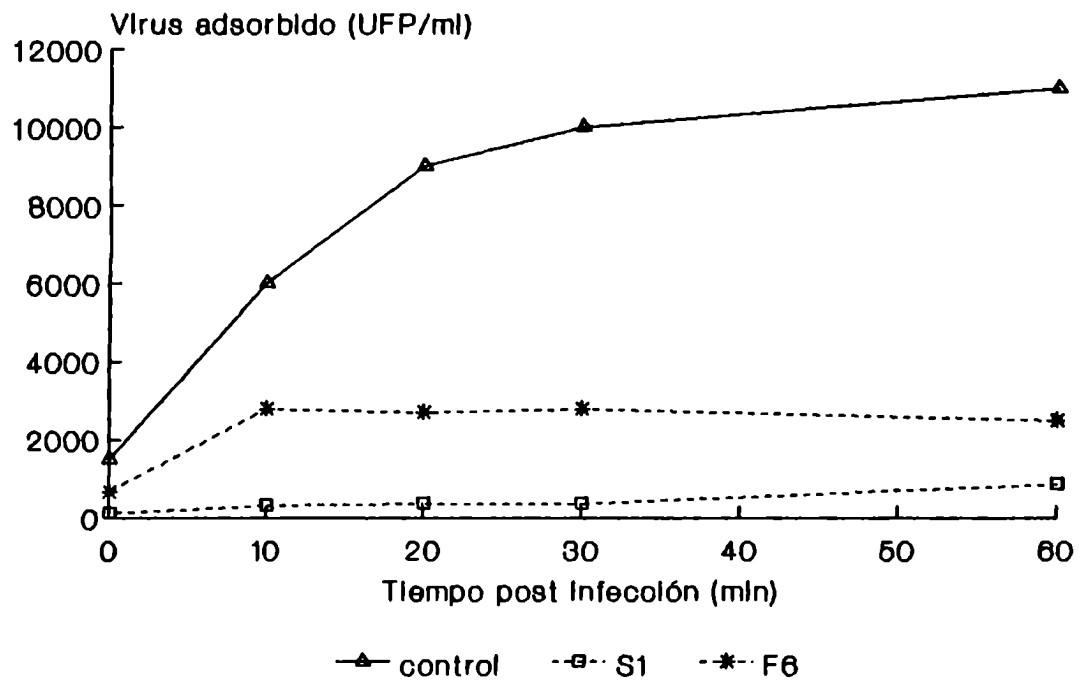


Figura 6: Se incubaron células Vero por 0, 10, 20, 30, 40 y 60 minutos a 4 °C con HSV-1 cepa F (m= 1) en ausencia o en presencia de F6 (5 µg/ml) y S1 (25 µg/ml). Luego, las células fueron lavadas con PBS frío y lisadas, determinándose la cantidad de virus adsorbido a las células por formación de placas. Los valores representados son el promedio de dos experimentos.

### EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE F6 SOBRE LA ADSORCION DE HSV-1

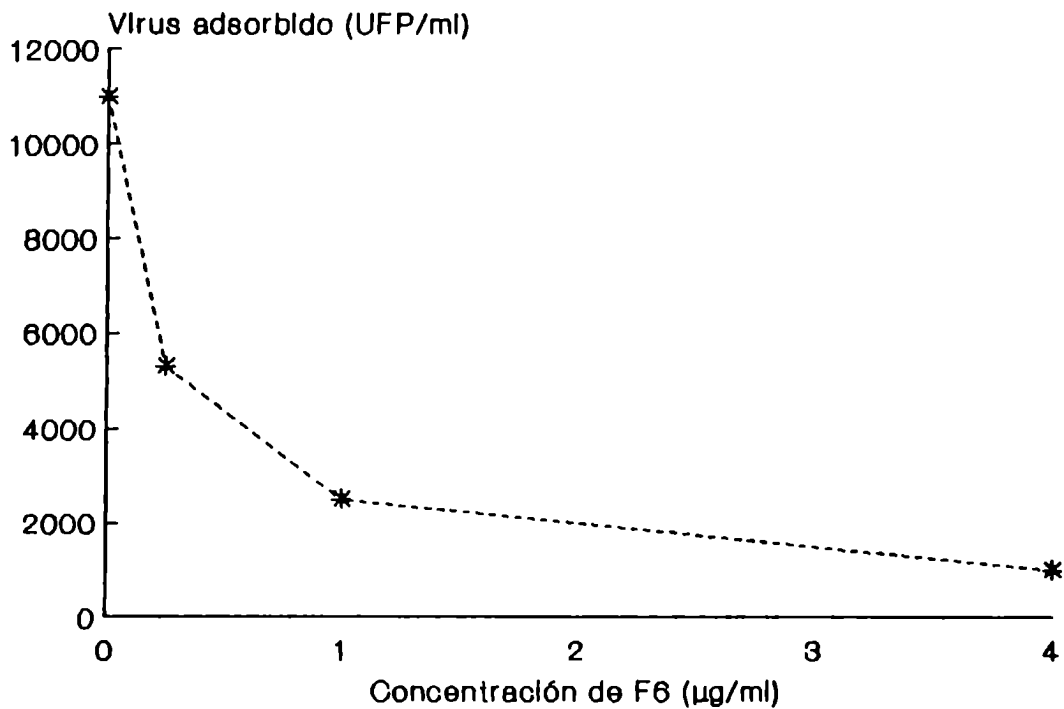


Figura 7: Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F (m- 1) en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de F6. Luego de 30 minutos de adsorción a 4°C, las células fueron lavadas con PBS, lisadas y se determinó la cantidad de virus adsorbido. Los valores representados son el promedio de dos experimentos.



**c. Acción inhibitoria de F6 y S1 sobre la unión a células Vero de HSV-1 marcado radioactivamente.**

Para corroborar el efecto sobre la adsorción, se efectuaron experimentos en los cuales se midió la unión a las células de virus marcado con [<sup>35</sup>S]-L-metionina en presencia o ausencia de los compuestos.

En primer lugar, se estudió la influencia de la concentración de droga sobre el efecto inhibitorio de ambos polisacáridos en la unión de viriones radioactivos a las células. En la figura 8 se observa un incremento del efecto inhibitorio sobre la unión de virus a la célula conforme aumenta la concentración de los compuestos. No obstante esto, la CI50 de ambos polisacáridos por este método resultó ser mayor que la obtenida empleando técnicas en donde se midió infectividad (CI50= 55,06 y 90,83 µg/ml para F6 y S1, respectivamente), lo que puede atribuirse a una menor especificidad de la técnica con la que se registró la unión de virus marcado a las células respecto de la medición de partículas infectivas.

En segundo lugar, se estudió el efecto de los compuestos sobre la cinética de unión de las partículas radioactivas (Figura 9). Igual a lo registrado al medir la adsorción por infectividad, se observó con el transcurso del tiempo de incubación un incremento del efecto inhibitorio de F6 y S1 sobre la unión de partículas radioactivas a las células.

### EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE F6 Y S1 EN LA UNION DE HSV-1 A CELULAS VERO

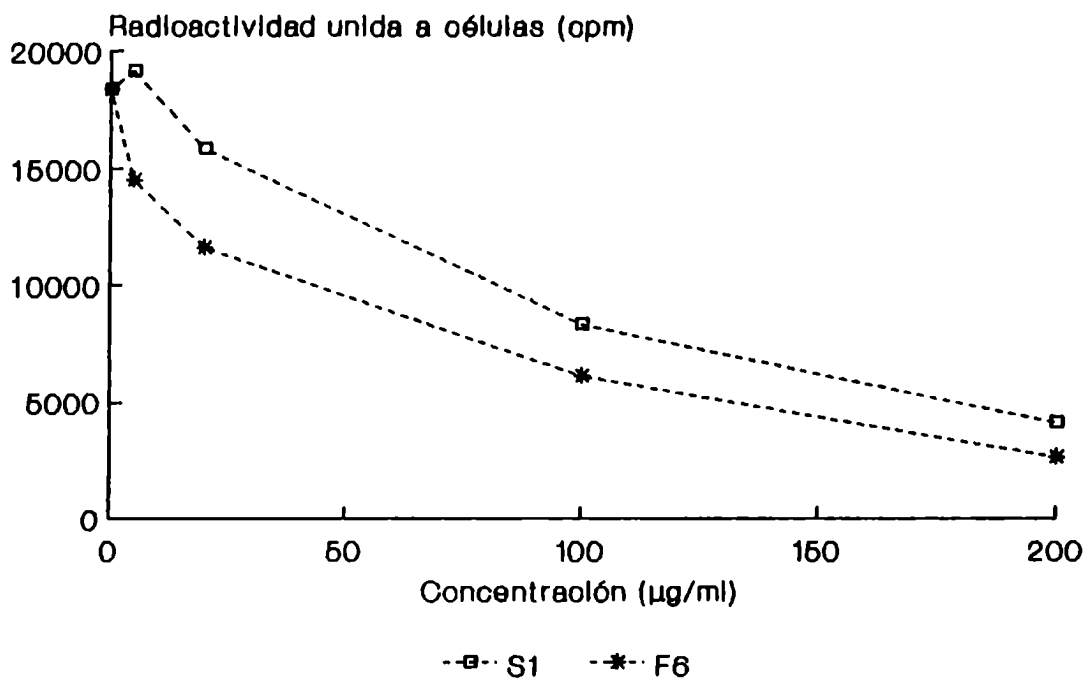


Figura 8: Se incubaron células Vero por 30 minutos a 4 °C con HSV-1 marcado con [35] S-metionina en presencia de diferentes concentraciones de F6 y S1. Transcurrido el período de incubación, se midió la radioactividad asociada a las células. Los valores representados son el promedio de dos experimentos.

### EFFECTO DE F6 Y S1 SOBRE LA CINETICA DE UNION DE HSV-1 MARCADO RADIOACTIVAMENTE

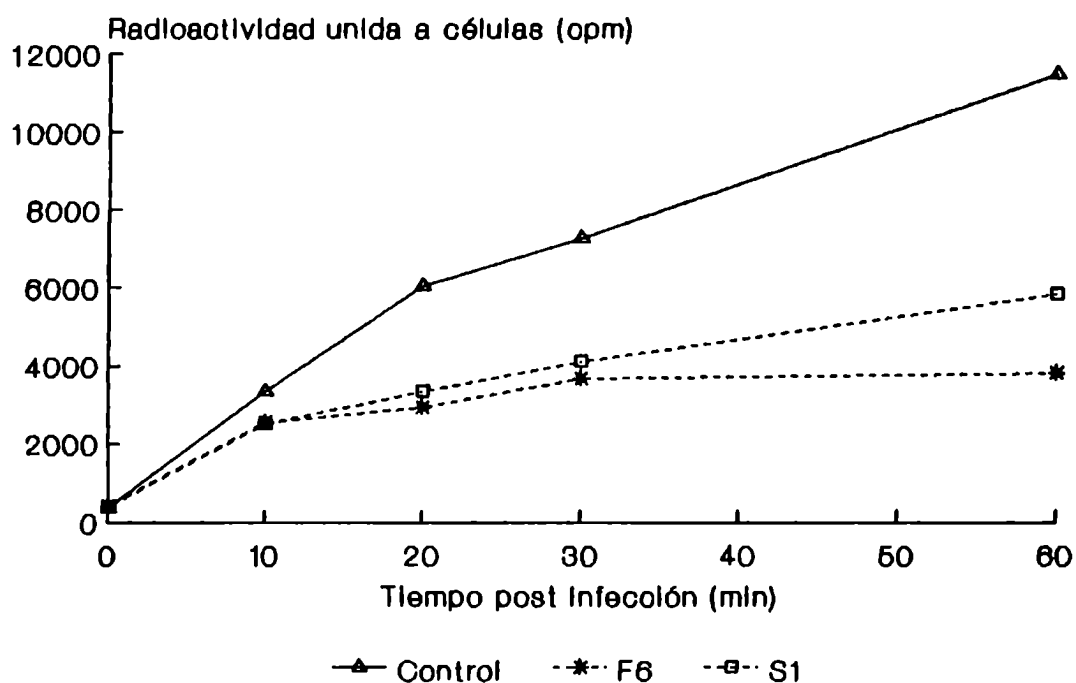


Figura 9: Células Vero fueron infectadas con HSV-1 marcado con  $[^{35}\text{S}]$ -metionina en presencia de F6 (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y S1 (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y luego de distintos tiempos de incubación a  $4^{\circ}\text{C}$  se determinó la radioactividad asociada a cada cultivo. Los valores representados son el promedio de dos experimentos.

Tomando en cuenta todos los experimentos en los que se midió la adsorción por infectividad o por unión de partículas radioactivas, se puede concluir que tanto F6 como S1 interfieren en forma específica en dicha etapa del ciclo de replicación de HSV-1.

#### **4. Efecto de F6 y S1 en la internalización viral**

Otra etapa temprana del ciclo de replicación viral que transcurre inmediatamente después de la adsorción es la internalización del virus a las células. Para determinar si F6 y S1 además de interferir con la adsorción viral también lo hacían con este proceso, se examinó el efecto de dichos compuestos sobre la internalización de HSV-1. Los resultados de la figura 10 muestran que en las células tratadas con los polisacáridos después de la adsorción, la cantidad de virus internalizado fue similar a la correspondiente a las células sin tratar, indicando que tanto F6 como S1 inhiben la adsorción de HSV-1 a las células Vero sin afectar su internalización.

#### **5. Efecto de F6 y S1 sobre la expresión de proteínas virales**

Para confirmar que F6 y S1 impiden la adsorción de HSV-1 a la célula, bloqueando cualquier etapa posterior en el ciclo

### EFFECTO DE F6 Y S1 SOBRE LA INTERNALIZACION DE HSV-1

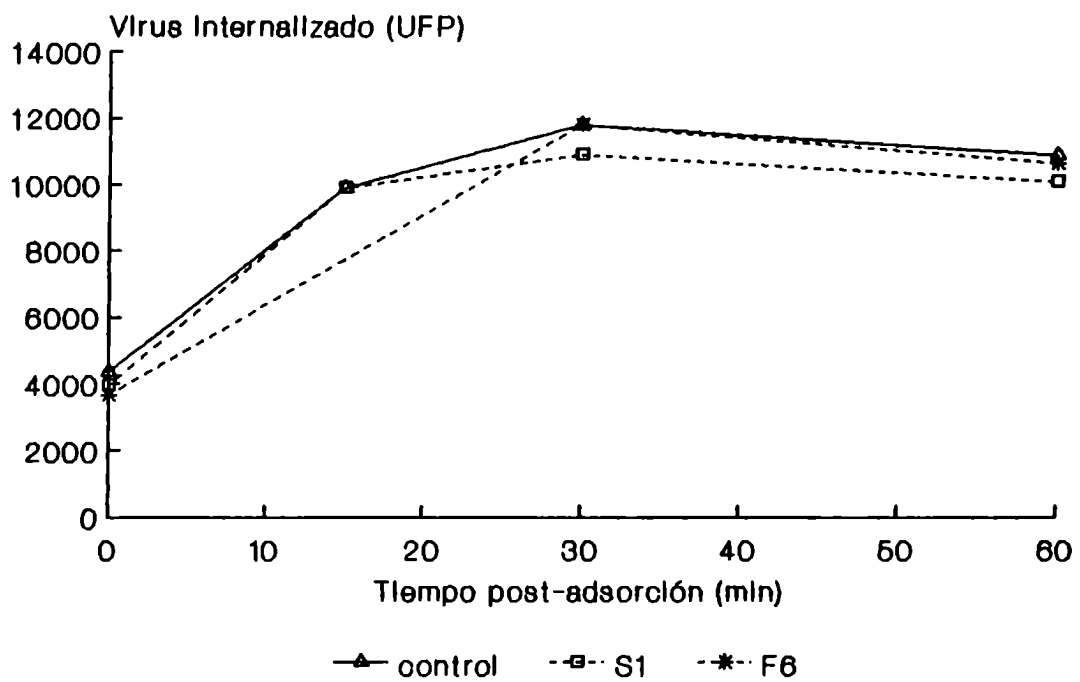


Figura 10: Se infectaron células Vero con HSV-1 ( $m = 1$ ). Luego de 30 minutos de adsorción a 4 °C, las células se incubaron a 37 °C en ausencia y en presencia de 5 y 25  $\mu\text{g/ml}$  de F6 y S1, respectivamente. A distintos tiempos post adsorción se midió el virus internalizado. Los valores representados son el promedio de dos experimentos.

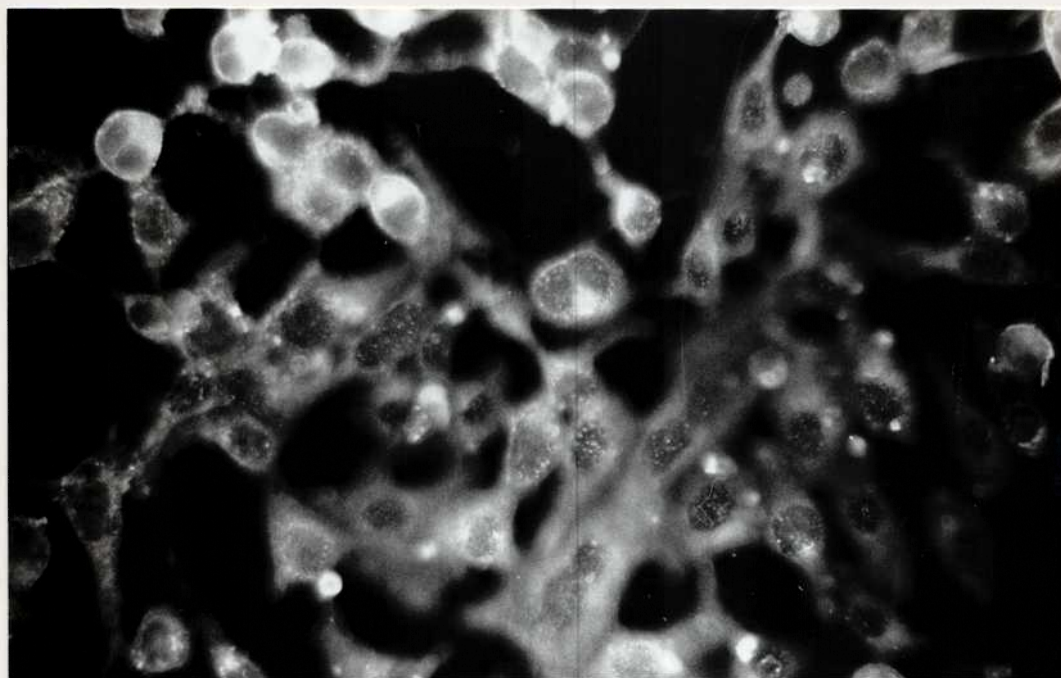
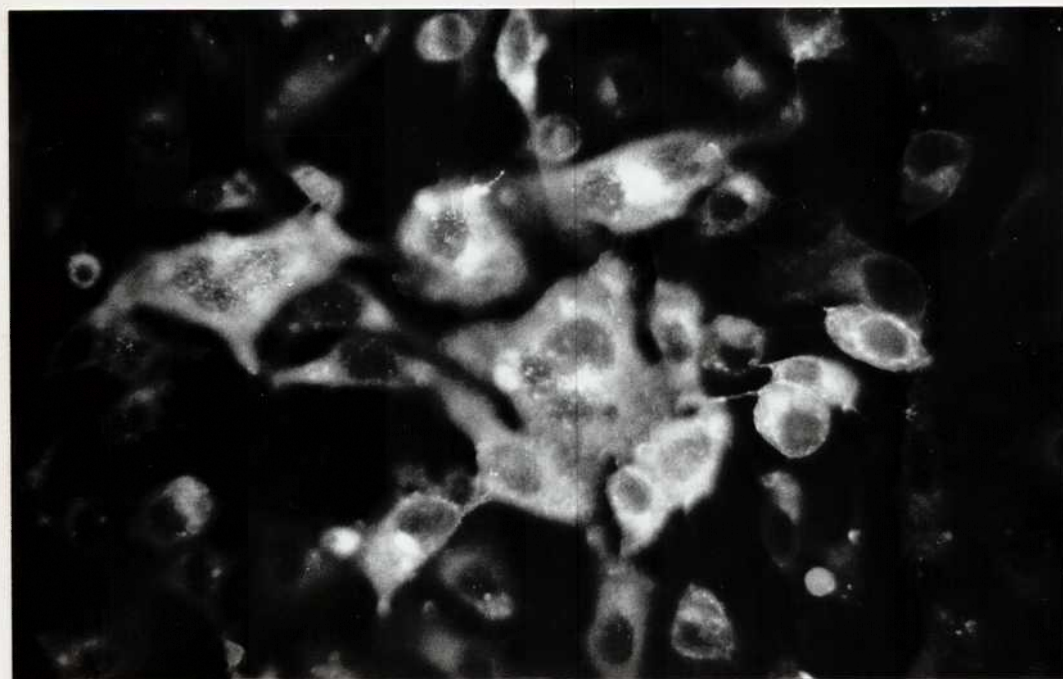
de multiplicación, se analizó la expresión de proteínas virales en células infectadas en presencia de los compuestos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

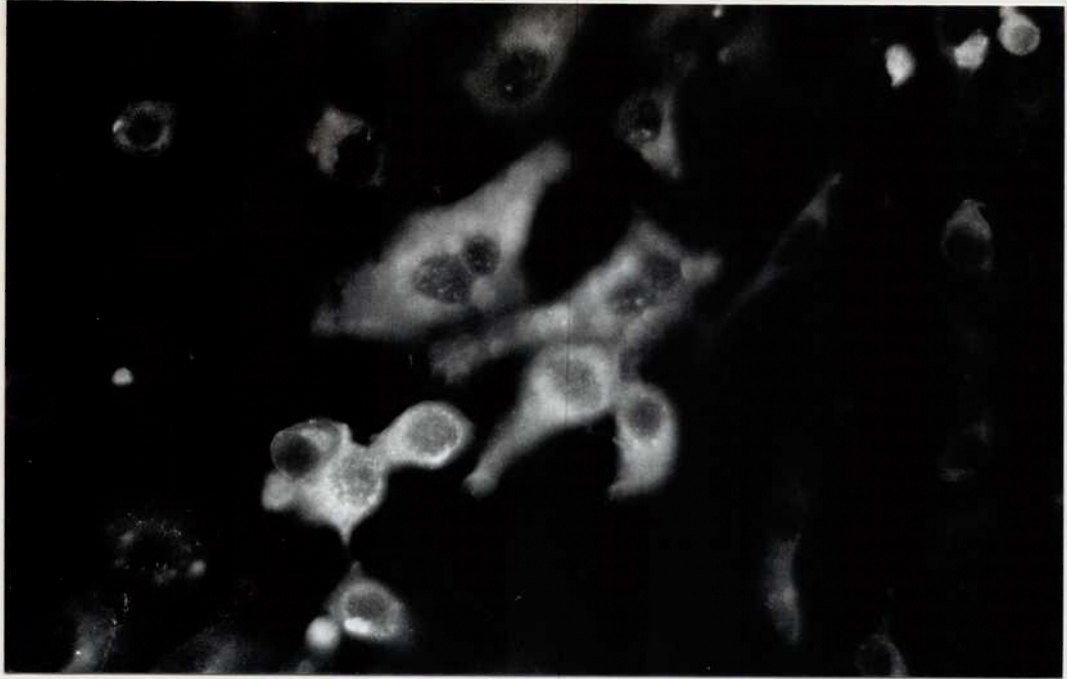
Cuando se infectaron cultivos con HSV-1 en ausencia de los compuestos, casi todas las células mostraron una intensa fluorescencia citoplasmática (Figura 11-a). En presencia de 1  $\mu\text{g/ml}$  de F6 se observa un número menor de células fluorescentes, agrupadas en pequeños focos, que presentaron una intensidad de fluorescencia menor que la observada en los cultivos sin droga (Figura 11-b). Este efecto inhibitorio se hizo más pronunciado al aumentar la concentración de la droga a 5  $\mu\text{g/ml}$ , donde el número de células fluorescentes fue muy bajo (Figura 11-c). La especificidad de la técnica utilizada se evidenció en el control de células sin infectar, en el cual no se observó fluorescencia (Figura 11-d).

Un efecto similar se obtuvo cuando se empleó el compuesto S1. En la figura 12-a se muestran con mayor aumento células infectadas en ausencia de la droga, observándose un foco intensamente fluorescente. Sin embargo, en presencia de 40  $\mu\text{g/ml}$  de S1 sólo se aprecian pequeños puntos fluorescentes en el citoplasma de algunas células (Figura 12-b), lo que indica que la expresión de las proteínas virales está altamente inhibida.

La cuantificación del efecto inhibitorio sobre la expresión de las proteínas virales se llevó a cabo efectuando el recuento de células fluorescentes presentes en 20 campos de cada preparado y expresando los resultados como porcentaje

INHIBICION DE LA EXPRESION DE  
PROTEINAS VIRALES POR F6

**a****b**



c



d

Figura 11: Se infectaron células Vero con HSV-1 ( $m = 0,01$ ) en ausencia (a) o en presencia de  $1 \mu\text{g/ml}$  (b) ó  $5 \mu\text{g/ml}$  (c) de F6. A las 24 horas p.i. se realizó una tinción por Inmunofluorescencia Indirecta utilizando IgG de conejo anti HSV-1 y como segundo anticuerpo IgG de cabra anti IgG de conejo marcada con fluoresceína. Como control negativo se utilizaron células sin infectar (d). Magnificación 400x.



INHIBICION DE LA EXPRESION DE  
PROTEINAS VIRALES POR S1

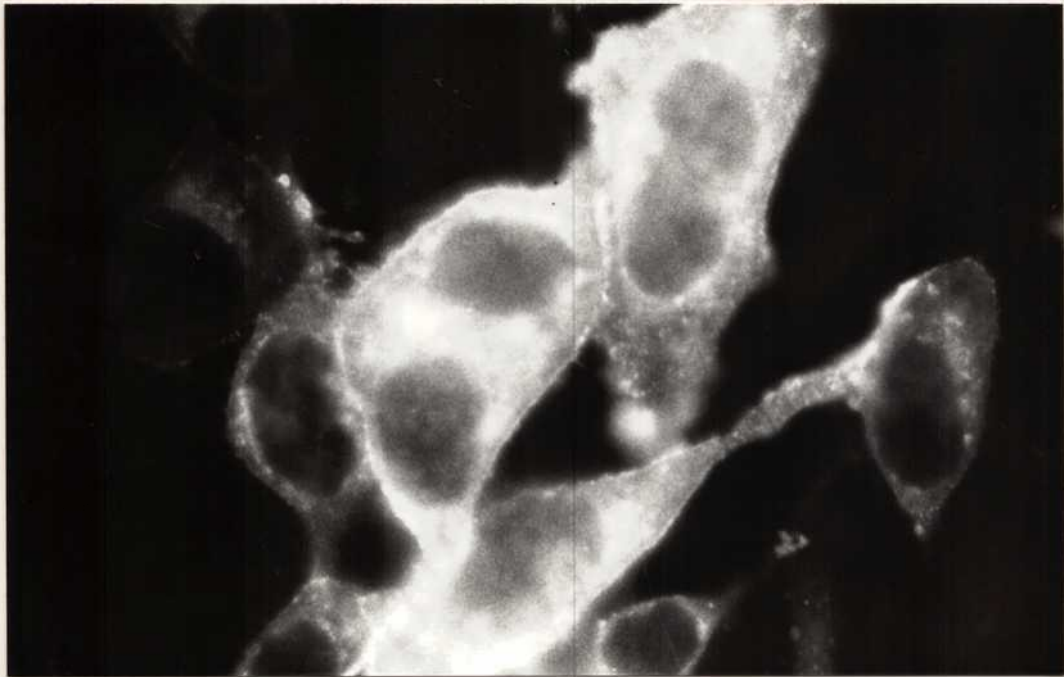
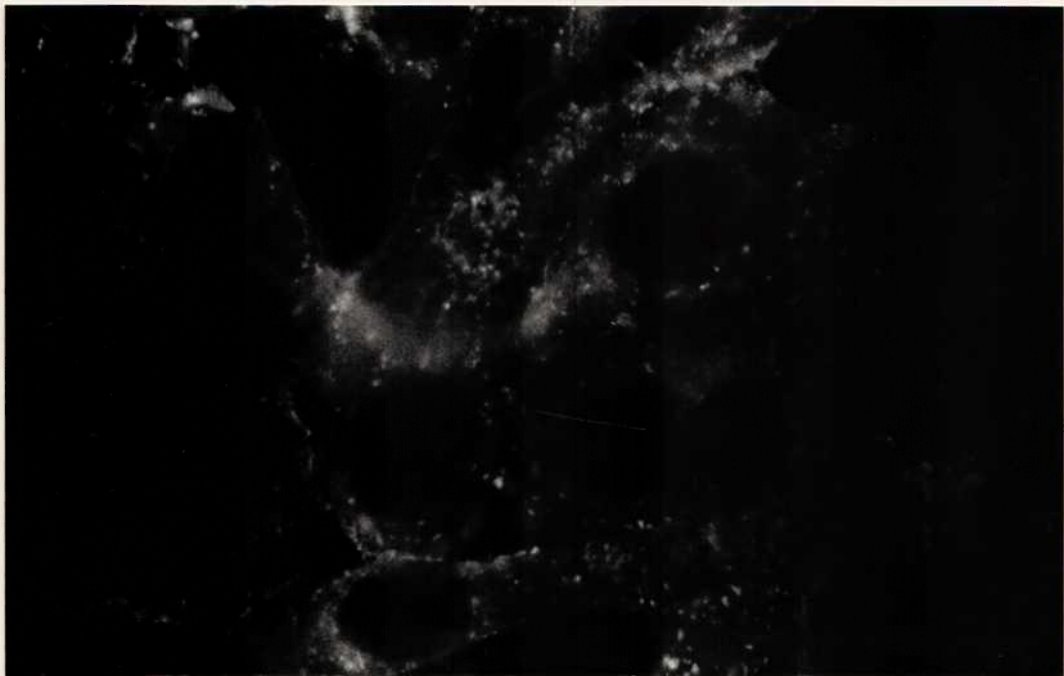
**a****b**

Figura 12: Se infectaron células Vero con HSV-1 ( $m = 0,01$ ) en ausencia (a) ó en presencia de  $40 \mu\text{g/ml}$  de S1 (b). A las 24 horas p.i. se realizó la tinción por Inmunofluorescencia en la forma descrita en la figura 11. Magnificación 1000x.

de células fluorescentes respecto del control. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 13 y 14, confirmándose que la inhibición resulta ser dependiente de la concentración. En efecto, la cantidad de células fluorescentes fue disminuyendo a medida que aumentaba la concentración de los compuestos. La CI50 calculada por este método fue de 0,97 y 9,57  $\mu\text{g/ml}$  para F6 y S1, respectivamente, valores que se asemejan a los obtenidos por infectividad (0,92 y 5,11 para F6 y S1, respectivamente).

También se observó que para una efectiva inhibición de la expresión de las proteínas virales, los compuestos debían estar presentes durante la adsorción, ya que cuando se los adicionaba con posterioridad a la misma no eran efectivos (Cuadro 14). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por infectividad (Cuadro 13).

En conclusión, todos los experimentos realizados para analizar el mecanismo de acción de F6 y S1 indican que estos compuestos afectan específicamente la adsorción de HSV-1 a la célula, bloqueando de ahí en más todo el proceso de replicación viral.

### INHIBICION DE LA EXPRESION DE PROTEINAS VIRALES POR F6

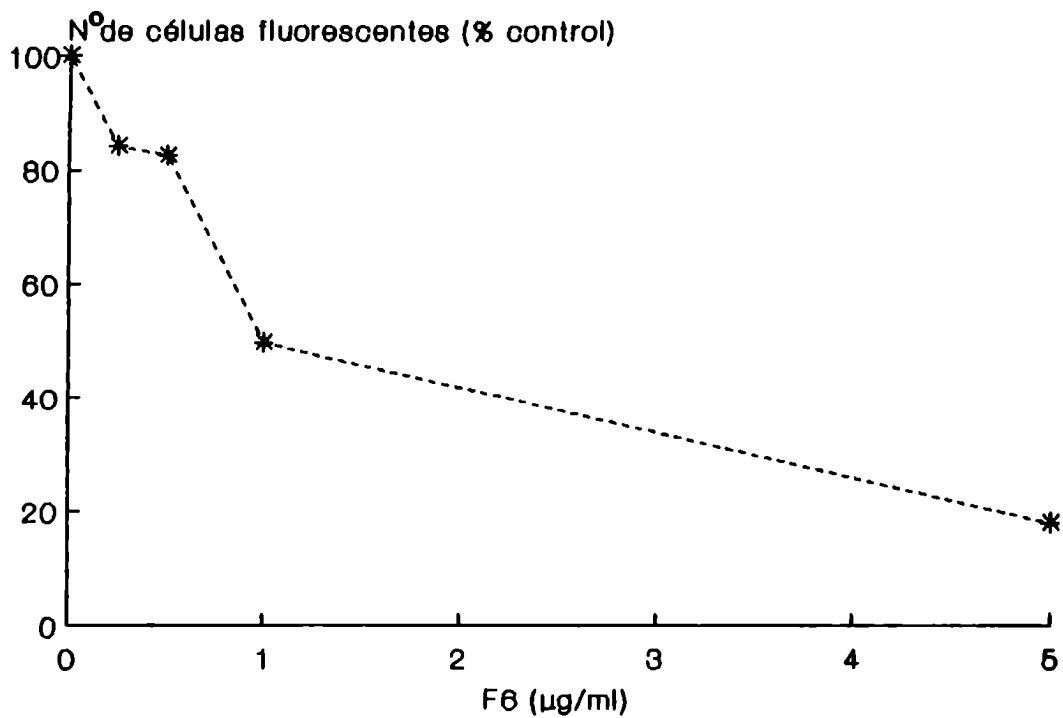


Figura 13: Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F ( $m= 0,01$ ) en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de F6. A las 24 horas p.i. se realizó la tinción por inmunofluorescencia indirecta. Se hizo el recuento de células fluorescentes en 20 campos, expresándose los resultados como el porcentaje de células fluorescentes en cultivos tratados con F6 respecto de cultivos controles sin tratar. Los valores representados son el promedio de dos experimentos.

## INHIBICION DE LA EXPRESION DE PROTEINAS VIRALES POR S1

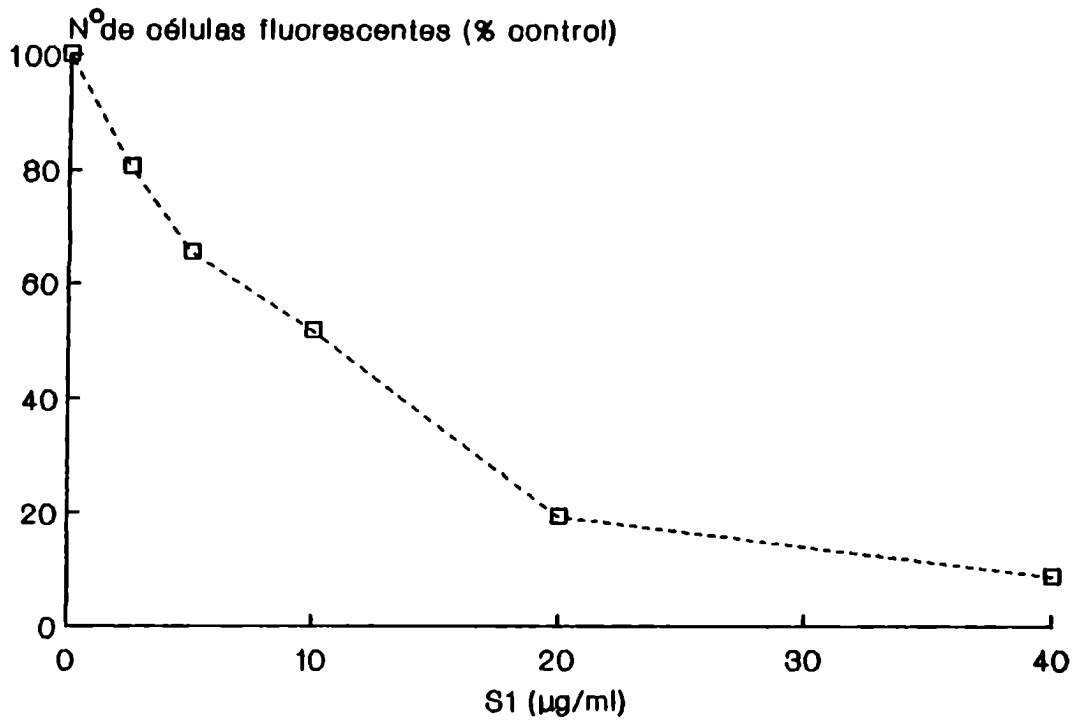


Figura 14: Se hizo el recuento de células fluorescentes en cultivos infectados con HSV-1 en presencia de S1 en las mismas condiciones descritas en la figura 13.

CUADRO 14

INHIBICION DE LA EXPRESION DE LAS PROTEINAS VIRALES POR ADICION  
DE F6 Y S1 DURANTE O DESPUES DE LA ADSORCION

| Compuesto presente   |                         | Células fluorescentes (%) |       |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|-------|
| Durante la adsorción | Después de la adsorción | F6                        | S1    |
| SI                   | SI                      | 26,0                      | 23,0  |
| SI                   | NO                      | 27,4                      | 25,3  |
| NO                   | SI                      | 100,0                     | 100,0 |
| NO                   | NO                      | 100,0                     | 100,0 |

Se infectaron monocapas de células Vero con la cepa F de HSV-1 (m = 0,01). Los compuestos antivirales fueron agregados durante la adsorción o con posterioridad a dicha etapa. Como controles se utilizaron monocapas infectadas en ausencia de compuestos. Los valores presentados son el promedio de dos experimentos.

## 6. Importancia de los grupos sulfato presentes en el compuesto F6 en relación a su actividad contra HSV-1.

Los polisacáridos sulfatados son moléculas cargadas negativamente que ejercerían su efecto antiviral al interactuar con las cargas positivas presentes en el virión. Esto produciría una alteración electrostática durante la interacción del virus con los receptores de las células susceptibles, impidiendo de esta manera la adsorción. Dado que los grupos sulfato presentes en la molécula de F6 son en gran medida responsables de su carga negativa, se estudió el efecto de la desulfatación sobre su actividad antiviral.

En la figura 15 se muestra la actividad inhibitoria del compuesto F6 y la correspondiente al mismo compuesto luego de haber sido desulfatado (F6D), perdiendo en este proceso aproximadamente un 88 % de sus grupos sulfato. Los resultados obtenidos demuestran que el compuesto F6D no fue efectivo para inhibir el rendimiento de HSV-1 en células Vero aún en concentraciones de 25  $\mu\text{g/ml}$ , lo que corrobora la importancia de los grupos sulfato para ejercer la actividad antiviral.

### INFLUENCIA DE LA DESULFATACION DE F6 SOBRE LA REPLICACION DE HSV-1

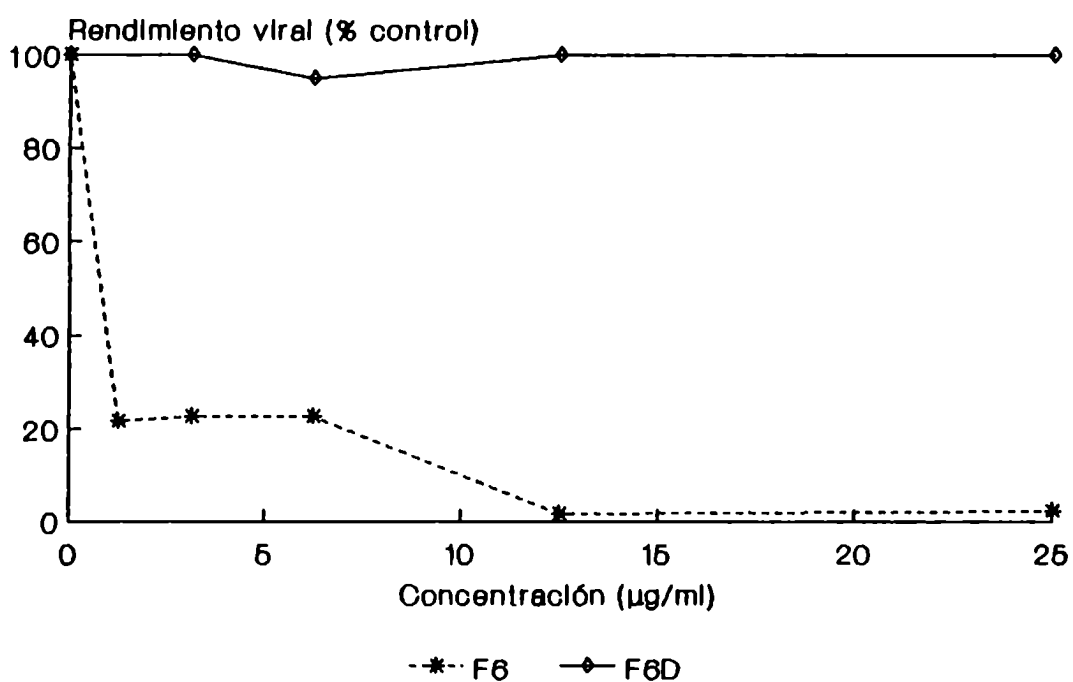


Figura 15: Se infectaron monocapas de células Vero con HSV-1 cepa F ( $m=0,01$ ) en presencia de distintas concentraciones de F6 y F6D. Luego de 24 horas de incubación a 37 °C, se cuantificó el virus producido por UFP. Los resultados se expresan como: UFP/ml en células tratadas con los compuestos / UFP/ml en células no tratadas (control) X 100. Los valores representados son el promedio de dos experimentos.

7. Inhibición por F6 y S1 de la interacción entre la glicoproteína C de HSV-1 (gC) y el fragmento C3b del complemento.

Aunque el proceso de adsorción de HSV-1 a la célula huésped no está aún totalmente dilucidado, se ha llegado a establecer que la interacción inicial sería a través de la unión de la glicoproteína viral C (gC) a proteoglicanos heparan sulfato de la membrana celular (77, 126). A fin de confirmar que tanto F6 como S1 inhiben mecanismos mediados por gC, se analizó el efecto de ambos compuestos sobre otra actividad biológica mediada por dicha glicoproteína como es la de actuar como receptor para el componente C3b del complemento (37). Para ello se desarrolló la técnica de formación de rosetas entre células Vero infectadas con HSV-1 que expresan en sus membranas la glicoproteína viral y eritrocitos sensibilizados con anticuerpos anti eritrocitos y recubiertos con C3b, como se explica en MATERIALES Y METODOS.

En la figura 16-a se muestra la morfología que presentaban las rosetas formadas por células infectadas en ausencia de los compuestos. Por lo general, dichas células tenían unidos a su superficie más de 15 eritrocitos. La figura 16-b ilustra cómo la presencia de F6 impide la unión de eritrocitos a las células infectadas. Tampoco se observaron rosetas en los controles en los que se utilizaron células no infectadas incubadas con eritrocitos acoplados con anticuerpos y C3b y en los que se incubaron células



### INHIBICION DE LA FORMACION DE ROSETAS POR F6

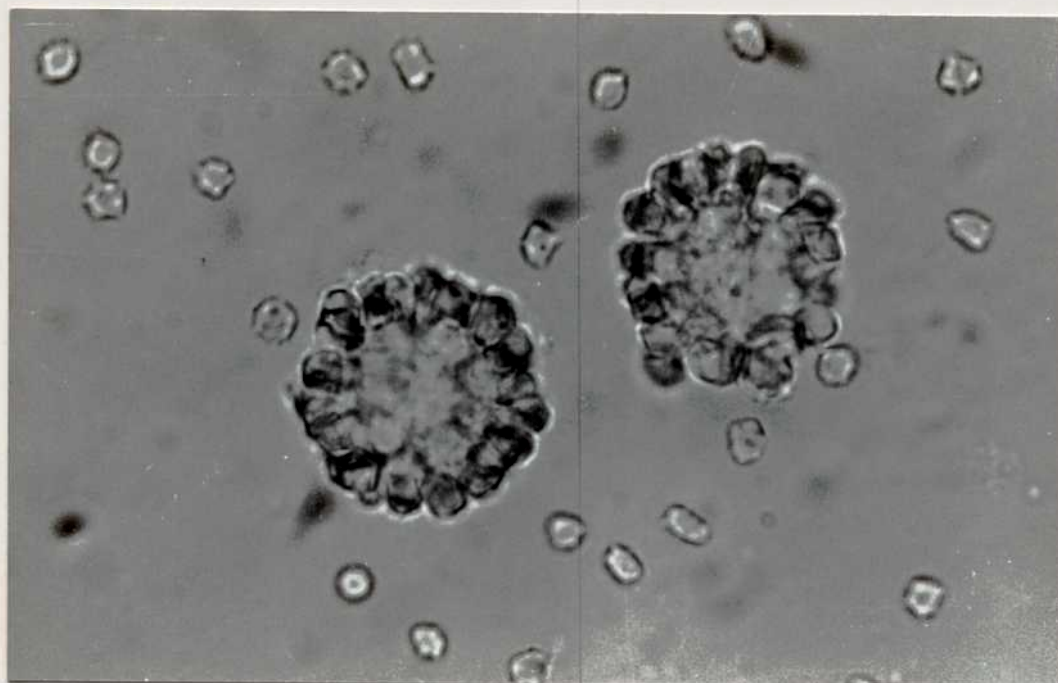
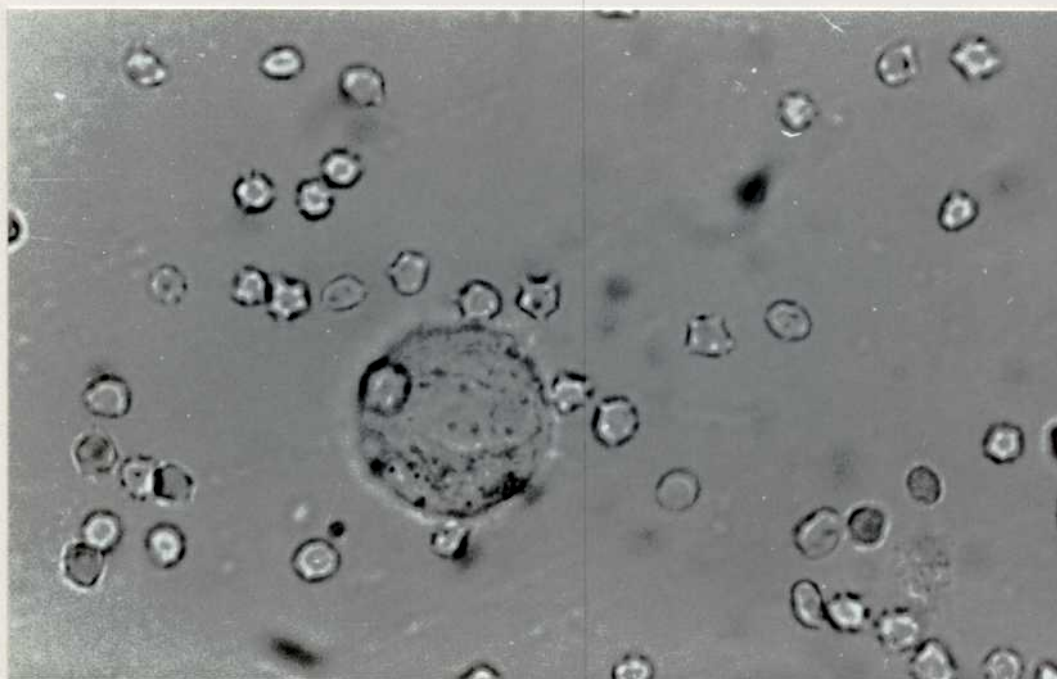
**a****b**

Figura 16: Se infectaron células Vero con HSV-1 ( $m=1$ ) y a las 24 horas p.i. se incubaron con eritrocitos sensibilizados con anticuerpos anti eritrocitos y recubiertos con C3b, en ausencia (a) o en presencia de  $5 \mu\text{g/ml}$  de F6 (b). Magnificación 1000x.

infectadas con eritrocitos sensibilizados solamente con anticuerpos.

En las figuras 17 y 18 se muestra la cuantificación de la acción inhibitoria de F6 y S1 sobre la formación de rosetas en función de la concentración de los compuestos. Aquí se observa un efecto dependiente de la dosis, siendo las CI50 determinadas por esta metodología de 0,90 y 57,7  $\mu\text{g/ml}$  para F6 y S1, respectivamente.

Estos resultados demuestran que tanto F6 como S1, además de inhibir la adsorción de HSV-1 a las células, actúan interfiriendo otra propiedad biológica de este virus que también es mediada por gC.

### INHIBICION DE LA FORMACION DE ROSETAS POR F6

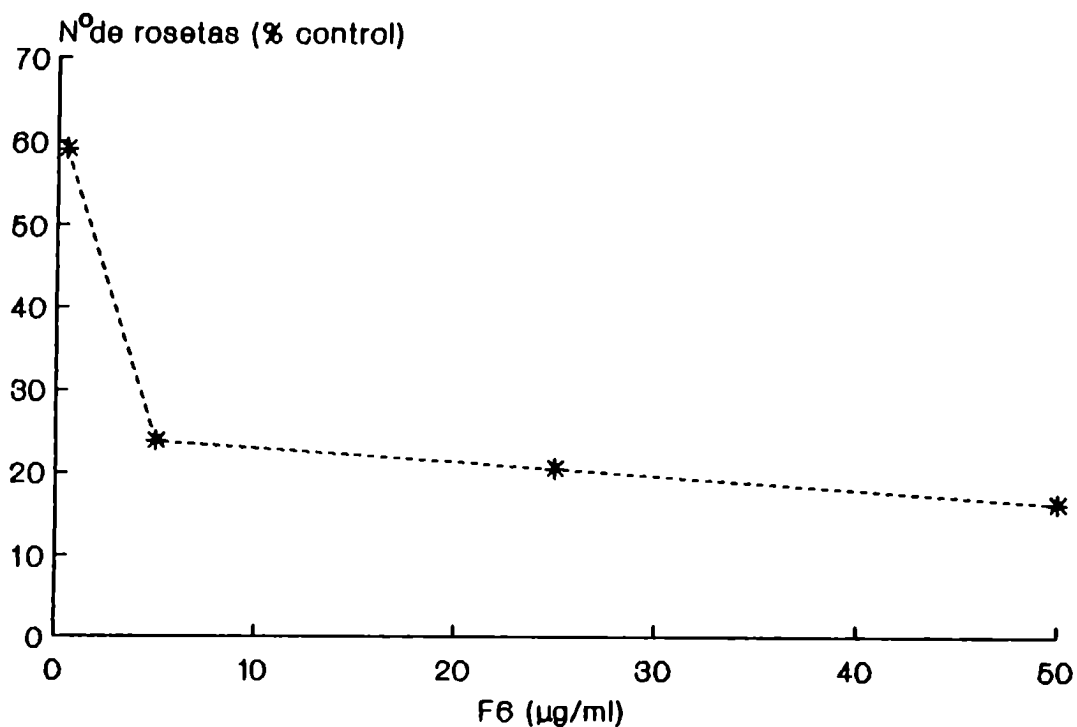


Figura 17: Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F (m=1). Luego de 24 horas p.i., las células fueron pre-incubadas 30 minutos a 37 °C con diferentes concentraciones de F6. Posteriormente, se mezclaron con eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos anti eritrocitos y complemento. Luego de 1 hora de incubación a 37 °C, las células fueron resuspendidas suavemente y se contaron como rosetas aquellas células que tenían unidos a su superficie más de 5 glóbulos rojos. Se hizo el recuento de rosetas en cada preparado sobre un total de 300 células y se expresaron los resultados como el porcentaje de células que formaban rosetas en presencia de cada concentración de droga respecto del control. Los valores representados son el promedio de dos experimentos.

## INHIBICION DE LA FORMACION DE ROSETAS POR S1

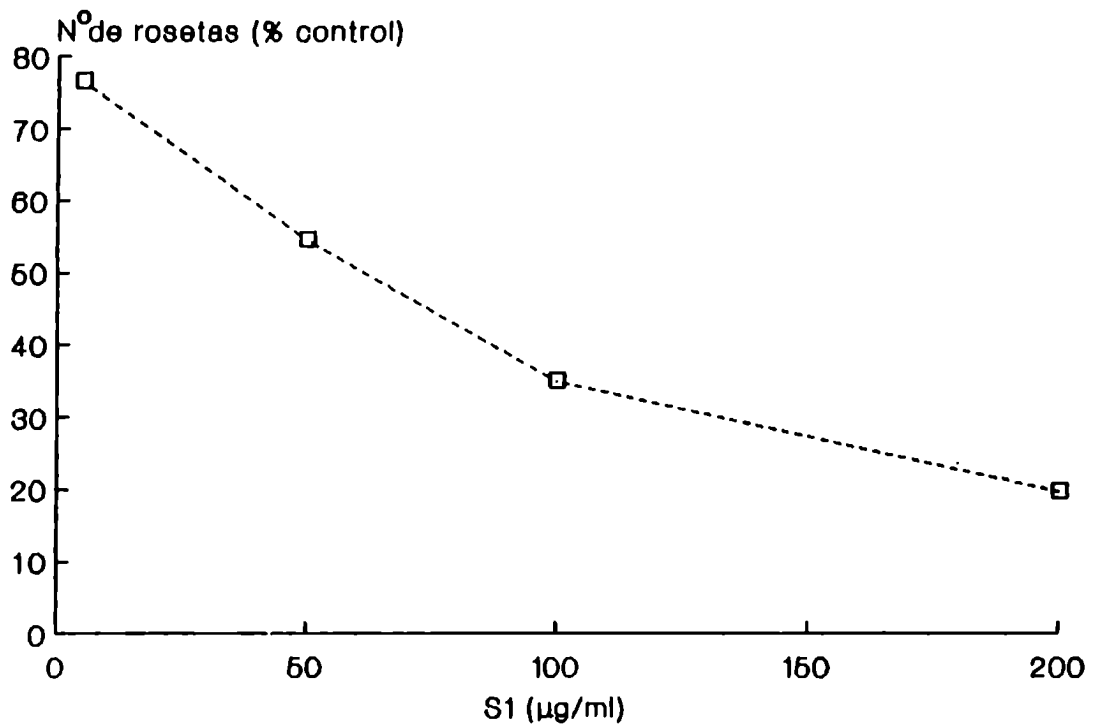


Figura 18: Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F (m-1) Luego de 24 horas p.i., las células fueron preincubadas 30 minutos a 37 °C con diferentes concentraciones de S1. El ensayo de formación de rosetas se realizó tal como se describe en la figura 17.

## V. DISCUSION

En el presente trabajo de tesis se estudió la actividad antiviral de dos polisacáridos sulfatados denominados F6 y S1 obtenidos a partir de las algas rojas *Nothogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea*, respectivamente. Ambos compuestos inhibieron eficientemente la replicación *in vitro* de distintos virus de la familia *Herpesviridae* (HSV-1, HSV-2, HCMV, PrV), no siendo efectivos hasta la mayor dosis probada (50  $\mu\text{g/ml}$ ) para los virus polio, Junín, VSV y RSV. El compuesto F6 también fue efectivo para inhibir la replicación *in vitro* de HIV-1 y HIV-2.

Ninguno de los compuestos estudiados fue citotóxico en las dosis en que se los utilizó para determinar su actividad antiviral. Por el contrario, la CC50 de los compuestos más activos fue muy superior a la CI50 para herpesvirus en distintas líneas celulares. Tanto F6 como S1 presentaron un alto índice de selectividad para distintas cepas de HSV-1 en células Vero, con valores entre 93,6 y 193,4 para F6 y 80,7 y 153,8 para S1. Para el dextrán sulfato, sustancia que se tomó como referencia, se obtuvo un índice de selectividad de 100 en el sistema HSV-1 - células Vero. En ese mismo sistema, que por otra parte fue el sistema modelo usado en la mayoría de los experimentos, el índice de selectividad para F6 y S1 fue de 171,0 y 80,7, respectivamente. En consecuencia, estos compuestos pueden ser considerados inhibidores selectivos de

la replicación de HSV-1 *in vitro*, es decir afectan el virus sin dañar a la célula.

El análisis estructural de F6 reveló que está formado por un  $\alpha$ -D-(1-3)-manano con las unidades monosulfatadas en C-2 y C-6 y con ramificaciones simples de D-xilosa enlazadas  $\beta$ -(1-2) a la cadena central. La dispersión en la composición del manano puede obtenerse por variación en el contenido y la posición de los grupos sulfato y en el contenido de las ramificaciones simples de D-xilosa (80). El galactano S1 presentaría una estructura básica alternante de  $\beta$ -D-galactosa enlazada por la posición 3 y 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactosa o  $\alpha$ -L-galactosa 3-sulfato enlazada por la posición 4. Habría además una pequeña porción de ramificaciones simples de xilosa unidas a la cadena central (32).

La actividad antiviral de este tipo de compuestos parece depender del esqueleto polimérico de la molécula, de su peso molecular, de la cantidad de grupos sulfato que presentan y de su densidad de carga, mientras que la composición de azúcares parece no ser relevante (92, 100). En base a estas consideraciones, podemos explicar por qué dos compuestos muy parecidos en su composición química obtenidos del fraccionamiento de *Nothogenia fastigiata* (F5 y F6), difirieron notoriamente en su actividad antiviral. Como ya se puntualizó, F6 fue el compuesto que mostró mayor poder inhibitorio, mientras que F5 resultó inactivo. Al analizar su composición química se vió que ambos eran xilomananos, con similares proporciones de xilosa y manosa, pero diferían

ampliamente en su peso molecular y en la concentración de sulfatos (cuadro 2). Efectivamente, mientras F6 tiene un peso molecular de 30.000 y una concentración de sulfatos de 31,7 % expresado como  $\text{SO}_3\text{Na}$ , F5 presenta un peso molecular de 6.400 y la mitad de la concentración de sulfatos. En trabajos anteriores se describió que la actividad contra distintos virus de polisacáridos sulfatados como dextran sulfato, heparina, y pentosan polisulfato aumentaba al aumentar el peso molecular de dichos compuestos (59, 134), lo que estaría de acuerdo con lo observado para F5 y F6. Paradójicamente, este concepto hizo que, por mucho tiempo, el efecto antiviral de los polisacáridos no fuera tenido en cuenta para tratamientos clínicos, ya que se pensaba que los compuestos de alto peso molecular no podían atravesar las diferentes barreras del cuerpo o por lo menos la membrana celular. No obstante, a pesar de que es poco probable que los polisacáridos de alto peso molecular puedan penetrar la piel como para ser usados en forma tópica contra ciertas infecciones cutáneas ocasionadas por HSV-1, es posible que pequeños oligosacáridos pasen esas barreras más fácilmente. De hecho, se han encontrado oligosacáridos en la sangre de ratas alimentadas por vía oral con heparina, sugiriendo que estos compuestos son mucho más difusibles en el cuerpo de lo que originariamente se pensó (47, 71).

Por otra parte, la diferente concentración de grupos sulfato confiere a los compuestos una carga negativa distinta, de la cual depende su capacidad de interferir en la

unión virus-célula, como se discutirá más adelante. En el presente trabajo se puso de manifiesto la importancia de los grupos sulfato cuando al desulfatar el compuesto F6 en un 88%, el mismo perdió la capacidad de inhibir la replicación de HSV-1 *in vitro* (Figura 15). Para los carragenanos, otro tipo de polisacárido sulfatado, se demostró también que la actividad antiviral se relacionaba con los grupos sulfato que contenían. Los carragenanos iota y lambda que tienen 2 o 3 grupos sulfato por unidad de disacárido, fueron más eficientes para inhibir la expresión de los antígenos del virus de la hepatitis A que los kapa, que sólo presentan un grupo sulfato en su molécula (45). Por otra parte, los polisacáridos neutros como el dextrano pueden convertirse en compuestos antivirales cuando se introducen en su molécula grupos sulfato (65). Esto abre la posibilidad de utilizar oligosacáridos baratos que abundan en la naturaleza y convertirlos, a través de una simple reacción química, en compuestos antivirales. No se sabe aún si la presencia de otros grupos en la molécula, además del mencionado, también le confieren actividad antiviral (46).

A lo largo de este trabajo, la eficacia de F6 y S1 como potentes agentes antiherpéticos se puso de manifiesto en muy distintas condiciones experimentales. Así por ejemplo, cabe destacar que el valor de la CI50 de F6 no varió en forma sustancial con la multiplicidad de infección, propiedad sumamente importante, ya que la gran actividad inhibitoria que presenta aún en infecciones con altas dosis de virus



representa una ventaja para este compuesto respecto de otros antivirales que sólo son efectivos al ensayarlos con muy bajas dosis infectivas. Sería de esperar que un compuesto que presente una gran capacidad inhibitoria siga siendo efectivo en la mayoría sino para todas las multiplicidades de infección posibles. Sin embargo, los resultados descriptos en la bibliografía para distintos compuestos son contradictorios. En un estudio donde se empleó un enzimoimmunoensayo para evaluar la sensibilidad a distintos compuestos antivirales de cepas de HSV-1, se demostró que las CI50 correspondientes al aciclovir y al arabinósido de adenina dependían de la multiplicidad de infección, en tanto que para el ácido fosfonofórmico se registraba una menor dependencia (49). Contrariamente, en otro trabajo reciente en donde se utilizó un ensayo de inhibición del efecto citopático del virus, se concluyó que la CI50 para el aciclovir era independiente de la concentración de virus utilizada en la prueba (67). Todos estos datos junto con los resultados expuestos en este trabajo, parecen indicar que la mayor o la menor dependencia de la multiplicidad de infección radicaría en el tipo de compuesto antiviral o en el ensayo utilizado para determinar su CI50.

Otro parámetro a tener en cuenta en la determinación de la actividad antiviral es la técnica en sí misma. Actualmente, una variedad de técnicas son utilizadas para la evaluación de compuestos con actividad antiviral contra herpesvirus. Algunos de los procedimientos más frecuentemente

usados incluyen ensayos colorimétricos (70, 84), hibridización de ácidos nucleicos (43), ELISA (105), reducción en el número de placas (133) e inhibición del rendimiento viral (23).

En algunos casos, como por ejemplo para el virus de Epstein-Barr (EBV), herpesvirus humano tipo 6 (HHV-6) o herpesvirus humano tipo 7 (HHV-7), no existen cultivos celulares totalmente permisivos y por lo tanto es posible estimar la sensibilidad del virus a las distintas drogas sólo a través de una medición indirecta, empleando un test de ELISA para cuantificar el antígeno viral o utilizando un método de hibridización de ADN para determinar el efecto de un compuesto sobre el contenido de ADN en una célula infectada. Sin embargo, en el caso de la mayoría de los herpesvirus, es por lo general más sencillo y significativo determinar la actividad de un compuesto directamente en un ensayo de reducción del número de placas o de inhibición del rendimiento viral. Esta opinión fue avalada por la Food and Drug Administration con motivo del XVIII International Herpesvirus Workshop llevado a cabo entre el 25 y el 30 de julio de 1993 en Pittsburgh, Estados Unidos, en donde se aceptó que la mejor forma de determinar la potencia de una sustancia antiviral es a través de ensayos que miden en forma directa la producción viral (74).

En este trabajo, al utilizar los métodos de reducción del número de placas y de inhibición del rendimiento viral en paralelo, no se obtuvieron diferencias significativas en el

valor de la CI50 de F6 para dos cepas de HSV-1. Una sensibilidad similar para ambos métodos fue también reportada por Okazaki y col. (94) al estudiar la actividad antiviral de micotoxinas de *Fusarium* y otros compuestos relacionados contra HSV-2. Por el contrario, los resultados de los ensayos de inhibición del rendimiento viral cambiaron el sentido de la potencia relativa del aciclovir y del compuesto BRL 39123 contra HSV-1 y HSV-2 comparados con los datos obtenidos a través del método de reducción del número de placas (16).

El ensayo de inhibición del rendimiento viral es una medida más rigurosa que el ensayo de reducción de placas, ya que la capacidad de la droga de interferir con la replicación viral durante un período prolongado de infección, que comprende varios ciclos de multiplicación viral, se correlacionaría mejor con la probable eficacia de la droga en un tratamiento *in vivo* (102). No obstante esto, no es una técnica utilizada de rutina por ser laboriosa de llevar a cabo y demandar más tiempo que el ensayo de reducción de placas.

Cabe acotar que a lo largo de esta investigación, además de estas dos metodologías clásicas para medir la actividad antiviral de una droga, se determinó la CI50 usando otras técnicas empleadas para estudiar el mecanismo de acción. En el cuadro 15 se resumen todos los valores obtenidos por las distintas metodologías para la CI50 de F6. Es notorio que los valores de la CI50 cubren el rango 0,45 - 0,97  $\mu\text{g/ml}$  para todas ellas, a excepción de la medición de la unión de

CUADRO 15

VALORES DE LA CI50 DE F6 OBTENIDOS POR DISTINTAS METODOLOGIAS

| Metodología  | CI50<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|--|------------------------------|
| Reducción del número de placas                           | 0,61                         |
| Inhibición del rendimiento viral                         | 0,61                         |
| Inhibición de la adsorción viral                         | 0,45                         |
| Inhibición de la unión de viriones radioactivos          | 55,06                        |
| Inhibición de la expresión de proteínas virales          | 0,97                         |
| Inhibición de la formación de rosetas<br>mediadas por gC | 0,90                         |

Valores obtenidos para el sistema células Vero - HSV-1 cepa F

viriones radioactivos que presenta una CI50 notablemente superior (55,06  $\mu\text{g/ml}$ ). Esto puede deberse a la menor especificidad de este método respecto de los demás, ya que puede ocurrir una unión inespecífica de proteínas contaminantes marcadas que no han sido totalmente eliminadas de la suspensión de virus purificado. Una situación similar de valores de CI50 muy superiores obtenidos por unión de virus radioactivo respecto de los registrados por reducción en el número de placas, ha sido reportada para otras sustancias polianiónicas inhibidoras de HSV (2). Es promisorio que en todas las otras determinaciones de la CI50 en las que se miden distintas propiedades biológicas se haya puesto de manifiesto la gran potencia inhibidora de F6, lo que una vez más resalta las buenas posibilidades de este compuesto para ser usado como agente antiviral.

Al estudiar el mecanismo de acción de F6 y S1, se estableció que la etapa afectada era la adsorción del virus a la célula. Esta conclusión pudo obtenerse a partir del conjunto de las siguientes evidencias: 1) La presencia de F6 y S1 sólo durante el período de adsorción fue suficiente para inhibir tanto la formación de placas de HSV-1 como la expresión de proteínas virales detectadas por inmunofluorescencia. 2) Por el contrario, el agregado de las drogas luego de la adsorción no produjo inhibición en la formación de placas, ni afectó la internalización viral ni la expresión de proteínas virales, demostrando que estas etapas posteriores del ciclo replicativo no son afectadas por las

mismas. 3) F6 y S1 mostraron un efecto inhibitorio dependiente de la dosis sobre la cinética de adsorción de HSV-1 a células Vero, determinado por infectividad y corroborado por experimentos en los que se midió la unión de viriones radioactivos a las células.

Estos resultados están de acuerdo con los de trabajos anteriores en donde se indicó que otros polisacáridos sulfatados interferían en la adsorción del virus a la célula. Se vió que el dextran sulfato inhibía la unión a la superficie celular del virus de influenza A, HSV y HIV (8, 88, 127). Lo mismo ocurría con la heparina sobre HSV (128) y HIV (8). Sin embargo, Gonzales y col. (46) demostraron que un iota-carragenano inhibía un paso en la replicación de HSV-1 posterior a la internalización viral pero anterior a la síntesis tardía de proteínas virales.

Para poder explicar de qué manera estos compuestos podrían actuar en la adsorción, debemos recordar que la unión de viriones a receptores específicos sobre la membrana celular representa el primer paso de la infección viral. Distintas fuerzas, como interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, uniones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno, juegan un rol importante en la unión del virus a la superficie celular (76). Sin embargo, dicha unión es principalmente una interacción electrostática que puede ser fuertemente influenciada por la distribución de cargas tanto en el ligando como en el receptor. Es así como distintos

polielectrolitos pueden inhibir o aumentar la unión del virus a las células susceptibles (75).

Se ha reportado que los virus envueltos podrían interactuar más eficientemente con la superficie celular cargada negativamente dado que la parte externa de las glicoproteínas virales contiene regiones con alta densidad de cargas positivas (92). Por lo tanto, se puede asumir que los compuestos aniónicos como la heparina y otros polímeros sulfatados como los estudiados en el presente trabajo, son capaces de interactuar con dominios cargados positivamente de las glicoproteínas virales que están involucrados en la unión del virus a los constituyentes de la membrana celular cargados negativamente, como los proteoglicanos heparan sulfato.

La unión de los polímeros sulfatados a las glicoproteínas de la envoltura del virus no solamente anula las cargas positivas sino que además, como lo sugirió Callahan (18), añadiría un potencial negativo adicional, previniendo de esta forma la interacción del virus con la membrana celular.

De la misma manera, el amplio espectro de actividad antiviral que exhiben las sustancias policatiónicas (polilisina, protamina, polibrene) contra los virus envueltos (59, 69, 79), puede ser explicado por su interacción con constituyentes de la membrana celular cargados negativamente, lo que impediría la interacción de los dominios con carga

positiva de las glicoproteínas virales con la membrana celular.

Además del mecanismo de acción más aceptado por el cual las sustancias polielectrolíticas interactuarían con el virus o con las células y consecuentemente alterarían el entorno electrostático entre los viriones y las células susceptibles (24, 78), se han postulado dos mecanismos alternativos. Uno de ellos sugiere que sustancias polianiónicas se podrían unir a viriones ocupando sitios necesarios para la unión del virus a los receptores celulares de superficie (131). El otro postula que distintos polímeros sulfatados presentarían la habilidad de disociar los complejos formados entre el virus infectivo y el receptor viral poco después de la infección (9).

Tanto F6 como S1 no mostraron efecto virucida, es decir no inactivaron el virus por contacto directo. De la misma manera, el dextran sulfato y la heparina no fueron capaces de neutralizar el virus HIV directamente, como se estableció por experimentos en los cuales el virus fue incubado con los compuestos antes de infectar las células (8). Aunque no se incluyeron en la sección RESULTADOS por tratarse de ensayos preliminares, se vió que el tratamiento de monocapas de células Vero con los compuestos F6 y S1 antes de la infección con HSV-1 no producía tampoco ningún efecto sobre la multiplicación viral, sugiriendo que la interferencia se producía estando los compuestos presentes en el mismo instante en que el virus interaccionaba con el receptor. La



ausencia de efecto inhibitorio también fue observada al pretratar células Vero con distintas sustancias polianiónicas antes de la infección con virus Sindbis (79) y al incubar células MT-4 con heparina o dextran sulfato 24 horas previas a la infección con HIV (8). Por el contrario, las sustancias policatiónicas como polilisina, protamina y polibrene tenían un efecto inhibitorio cuando se adicionaban a las células antes de la exposición al virus Sindbis, indicando que el efecto era ejercido sobre la célula huésped (79).

La envoltura de HSV contiene por lo menos 11 glicoproteínas diferentes (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL y gM) (10, 121), muchas de las cuales se proyectan en forma de espículas (122). Es por esto que parece posible que la unión del virus a una célula y los pasos subsiguientes que llevan a la fusión virus-célula, puedan requerir interacciones secuenciales o simultáneas de múltiples proteínas virales con varios sitios o receptores diferentes presentes en la superficie celular.

Los estudios realizados por distintos investigadores han establecido que la unión de herpesvirus a una variedad de tipos celulares puede estar mediada por la interacción de la glicoproteína viral de la envoltura gC con proteoglicanos heparan sulfato de la membrana celular (19, 56, 118, 126, 136). Las evidencias de esto se pueden resumir de la siguiente manera: 1) Estos virus casi no se unen a células deficientes en heparan sulfato, más allá de que esta deficiencia se deba a un tratamiento enzimático previo (con

heparinasa o heparitinasa) o a una mutación genética (48). 2) La heparina, que es estructuralmente muy similar al heparan sulfato, inhibe la unión del virus a las células (77, 118). 3) Los viriones se unen a columnas de afinidad acopladas con heparina (85). 4) La delección del gen que codifica para gC en HSV-1, PrV y BHV-1 da como resultado viriones mutantes que presentan una marcada disminución en su capacidad para unirse a las células (138). 5) Los anticuerpos neutralizantes específicos dirigidos contra gC de HSV-1, PrV o BHV-1, pueden bloquear la unión del virus a la célula (40), mientras que la mayoría de los anticuerpos neutralizantes específicos para otras glicoproteínas actúan bloqueando la penetración viral.

Por todo lo mencionado, y dado que F6 y S1 actúan durante la etapa de adsorción, es muy probable que su mecanismo de acción represente una interferencia en la interacción gC-heparan sulfato. Por lo tanto, la efectividad de estos polisacáridos frente a distintas cepas de HSV-1, incluyendo mutantes TK<sup>-</sup> resistentes a aciclovir, y en distintos tipos celulares podría deberse a que los compuestos actuarían interfiriendo la unión entre una secuencia de gC conservada en las diferentes cepas ensayadas y un receptor celular común presente en cantidades equivalentes en todos los tipos celulares. Por el contrario, se ha descrito una gran variación en la eficacia de otros tipos de compuestos antiherpéticos, como los análogos de nucleósidos, cuando se cambió la línea celular en los ensayos para determinar la actividad antiviral (17, 74). Esta diferencia en los

resultados obtenidos podría depender de las características y del modo de acción del compuesto antiviral.

Dado que se ha descrito que también existe un modo de unión para HSV independiente de gC, mediado por otros receptores y ligandos (57, 73), no podría afirmarse que estos polisacáridos actúen interfiriendo solamente la unión gC - heparan sulfato. Para confirmar que F6 y S1 actúan efectivamente a nivel de gC, se trató de bloquear otra actividad biológica mediada, en este caso, solamente por esta glicoproteína, como es la de unir el componente C3b del complemento (37, 60). El hecho de que gC funcione como un receptor para C3b, sugiere que esta glicoproteína actuaría confiriendo protección tanto al virión como a la célula infectada contra el daño mediado por complemento en ausencia de anticuerpo (58). Empleando la técnica de formación de rosetas entre células Vero infectadas con HSV-1 y eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos y acoplados con el componente C3b del complemento, se vió que la presencia de F6 y S1 inhibía la interacción de gC con C3b, lo que confirmaría que ambos compuestos actuarían sobre gC.

En conclusión, esta investigación representa un aporte en el campo del empleo de productos naturales como agentes antivirales, presentando y caracterizando las propiedades antiherpéticas de compuestos aislados a partir de algas de las costas argentinas y uruguayas. La búsqueda de compuestos con actividad biológica a partir de diferentes organismos de origen marino está en amplia expansión. Lamentablemente, sólo

en muy pocos casos los compuestos naturales con actividad antiviral fueron probados *in vivo*, un requisito obvio para introducir una droga antiviral en el tratamiento clínico. Todavía se está muy lejos de comercializar cualquier producto de origen marino como agente antiviral. Al respecto, polisacáridos sulfatados como los presentados en este estudio son compuestos muy promisorios por su baja toxicidad y la posibilidad de usarlos en terapias combinadas junto con aciclovir u otros compuestos activos en una etapa del ciclo replicativo de los herpesvirus diferente de la adsorción.

El paso siguiente sería el ensayo *in vivo* en un modelo animal para HSV a fin de poder evaluar sus posibilidades para ser empleados como terapia alternativa en las infecciones herpéticas en individuos inmunocomprometidos, en los que se seleccionan frecuentemente variantes virales resistentes a otras drogas.

## VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo se pueden resumir de la siguiente manera:

1) Los polisacáridos sulfatados F6 y S1 extraídos de las algas rojas *Nothogenia fastigiata* y *Pterocladia capillacea*, respectivamente, son compuestos con actividad antiviral selectiva contra varios herpesvirus.

2) Los valores de la CC50 para cultivos celulares de distinto origen, fueron muy superiores a los de la CI50 para todos los virus ensayados.

3) La actividad antiherpética no fue afectada sustancialmente por variaciones en la multiplicidad de infección, la cepa de virus, la línea celular y el ensayo empleado en la determinación de la CI50.

4) La presencia de grupos sulfato en la molécula de estos compuestos fue indispensable para producir un efecto inhibidor de la replicación viral.

5) Los compuestos no inactivaron el virus a través de un efecto virucida sino que se comportaron como verdaderos agentes antivirales, inhibiendo una etapa del ciclo de multiplicación viral.

6) F6 y S1 inhibieron la replicación de herpesvirus cuando estuvieron presentes sólo durante la adsorción, pero no fueron efectivos si se los adicionaba con posterioridad a dicha etapa.

7) El mecanismo de acción de F6 y S1 se basa en la inhibición de la unión inicial del virus a las células susceptibles, lo cual fue demostrado en ensayos de infectividad y corroborado por experimentos de unión de viriones radioactivos a las células.

8) Ninguno de los dos compuestos inhibió la internalización de HSV-1 a las células Vero ni la expresión de proteínas virales al ser agregados luego de la adsorción.

9) Ambos compuestos fueron efectivos en bloquear la unión de gC al componente C3b del complemento, confirmando que tanto F6 como S1 interactúan con esa glicoproteína viral.



## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Accorinti, J., Rodriguez, M. C., Wachsman, M. B., Coto, C. E. Antiviral extracellular extract from *Coelastrum proboscideum* var. *dilatatum* (Chlorophyta: Chlorococcal) axenic cultures. *Fitoterapia* 54: 71-74, 1983.
2. Ahmed, S. P., Cardin, A. D., Bridges, C. G., Jackson, R. L., Mullins, M. J., Tyms, A. S. Potent inhibition of herpes simplex virus by MDL 101028, a novel biphenyl disulfonic acid urea co-polymer. *Antiviral Chem. Chemother.* 6: 34-42, 1995.
3. Amoros, M., Fauconnier, B., Girre, R. L. *In vitro* antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, *Primulaceae*, against herpes simplex virus and poliovirus. *Antiviral Res.* 8: 13-25, 1987.
4. Amoros, M., Simoes, C. M. O., Girre, L. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.* 55: 1732-1740, 1992.
5. Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis

- and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J. Nat. Prod.* 57: 644-647, 1994.
6. Andrei, G., De Clercq, E. Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* 14: 287-300, 1990.
  7. Andrei, G., Couto, A. S., Lederkremer, R. M. de, Coto, C. E. Purification and partial characterization of an antiviral active peptide from *Melia azedarach* L. *Antiviral Chem. Chemother.* 5: 105-110, 1994.
  8. Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Arnout, J., Desmyter, J., De Clercq, E. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash)* 85: 6132-6136, 1988.
  9. Baba, M., Schols, D., De Clercq, E., Pauwels, R., Nagy, M., Gyorgyi-Edelenyi, J., Low, M., Gorog, S. Novel sulfated polymers as highly potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) replication and giant cell formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 134-138, 1990.
  10. Baines, J. D., Roizman, B. The U<sub>L</sub> 10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral glycoprotein gM



which is present in the virion and plasma membrane of infected cells. *J. Virol.* 67: 1441-1452, 1993.

11. Barnard, D. L., Smee, D. F., Huffman, J. H., Meyerson, L. R., Sidwell, R. W. Antiherpesvirus activity and mode of action of SP-303, a novel plant flavonoid. *Chemotherapy* 39: 203-211, 1993.
12. Beauchamp, K. M., Orr, G. F., de Miranda, P., Burnette, T., Krenitsky, T. A. Amino acid ester prodrugs of acyclovir. *Antiviral Chem. Chemother.* 3: 157-164, 1992.
13. Beress, A., Wassermann, O., Bruhn, T., Beress, L. A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (Polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*. *J. Nat. Prod.* 56: 478-488, 1993.
14. Beutler, J. A., Mc Kee, T. C., Fuller, R. W., Tischler, M., Cardellina, J. H., Snader, K. M., Mc Cloud, T. G., Boyd, M. R. Frequent occurrence of HIV-inhibitory sulphated polysaccharides in marine invertebrates. *Antiviral Chem. Chemother.* 4: 167-172, 1993.
15. Bourgougnon, N., Lahaye, M., Chermann, J. C., Kornprobst, J. M. Composition and antiviral activities of a sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta,

- Gigartinales). Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 3: 1141-1146, 1993.
16. Boyd, M. R., Bacon, T. H., Sutton, D., Cole, M. Antiherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine (BRL 39123) in cell culture. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1238-1242, 1987.
  17. Boyd, M. R. Update on famciclovir. En: Antiviral Chemotherapy: New directions for clinical applications and research. Editado por J. Mills y L. Corey, 3<sup>ra</sup> edición, pag. 83-95, New Jersey, Appleton and Lange, 1993.
  18. Callahan, L., Phelan, M., Mallison, M., Norcross, M. Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp 120-CD4 interactions. J. Virol. 65: 1543-1550, 1991.
  19. Campadelli-Fiume, G., Stirpe, D., Boscaro, A., Avitabile, E., Tomasi, L., Barker, D., Roizman, B. Glycoprotein C-dependent attachment of herpes simplex virus to susceptible cells leading to productive infection. Virology 178: 213-219, 1990.

20. Cases, M. R., Stortz, C. A., Cerezo, A. S. Methylated, sulphated xylogalactans from the red seaweed *Corallina officinalis*. *Phytochemistry* 31: 3897-3900, 1992.
21. Chatis, P. A., Miller, C. H., Schragar, L. E., Crumpacker, C. S. Successful treatment with foscarnet of an acyclovir-resistant mucocutaneous infection with herpes simplex virus in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 320: 297-300, 1989.
22. Coen, D. M. General aspects of virus drug resistance with special reference to herpes simplex virus. *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 1-10, 1986.
23. Collins, P., Bauer, D. J. Relative potencies of anti-herpes compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 284: 49-59, 1977.
24. Conti, C., Mastromarino, P., Riccioli, A., Orsi, N. Electrostatic interactions in the early events of VSV infection. *Res. Virol.* 142: 17-24, 1991.
25. De Clercq, E., Descamps, j., Verhelst, G., Walker, R. t., Jones, A. S., Torrence, P. F., Shugar, D. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains

- of herpes simplex virus. *J. Infect. Dis.* 141: 563-574, 1980.
26. De Clercq, E. Selective virus inhibitors. *Microbiologica* 13: 165-168, 1990.
27. Denizot, F., Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Methods* 89: 271-277, 1986.
28. Derse, D., Cheng, Y. C., Furman, P. A., St. Clair, M. H., Elion, G. B. Inhibition of purified human and herpes simplex virus-induced DNA polymerases by 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 256: 11447-11451, 1981.
29. Descalzo, A. M. Propiedades de hongos del género *Alternaria* aislados a partir de hojas de *Melia azedarach* L. Tesis doctoral, FCEyN, UBA, 1991.
30. Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., Miranda P. de, Beauchamp, L., Schaeffer, H. J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5716-5720, 1977.
31. Erlich, K. S., Mills, J., Chatis, P., Mertz, G. J., Busch, D. F., Follansbee, S. E., Grant, R. M.,

- Crumpacker, C. S. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 320: 293-296, 1989.
32. Errea, M. I., Matulewicz, M. C. Cold water-soluble polysaccharides from tetrasporic *Pterocladia capillacea*. *Phytochemistry* 37: 1075-1078, 1994.
33. Fanning, M. M., Read, S. E., Benson, M., Vas, S., Rachlis, A., Kozousek, V., Mortimer, C., Harvey, P., Schwartz, C., Chew, E., Brunton, J., Matlow, A., Salit, I., Vellend, H., Walmsley, S. Foscarnet therapy of cytomegalovirus retinitis in AIDS. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 3: 472-479, 1990.
34. Field, A. K., Biron, K. K. The end of innocence. Revisited: Resistance of herpesviruses to antiviral drugs. *Clinical Microbiology Reviews*, 7: 1-13, 1994.
35. Field, H. J. Persistent herpes simplex virus infection and mechanisms of virus drug resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 671-680, 1989.
36. Franz, G. Polysaccharides in Pharmacy: Current applications and future concepts. *Planta Medica* 55: 493-497, 1989.

37. Friedman, H. M., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Seidel, C. A., Cines, D. B. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* 309: 633-635, 1984.
38. Fukuchi, K., Sakagami, H., Ikeda, M., Kawazoe, Y., Oh-Hara, T., Konno, K., Ichikawa, S., Hata, N., Kondo, H., Nonoyama, M. Inhibition of herpes simplex virus infection by pine cone antitumor substances. *Anticancer Res.* 9: 313-318, 1989.
39. Fukuchi, K., Sakagami, H., Okuda, T., Hatano, T., Tanuma, S., Kitajima, K., Inoue, Y., Inoue, S., Ichikawa, S., Nonoyama, M., Konno, K. Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Res.* 11: 285-298, 1989.
40. Fuller, A. O., Spear, P. G. Specificities of monoclonal and polyclonal antibodies that inhibit adsorption of herpes simplex virus to cells and lack of inhibition by potent neutralizing antibodies. *J. Virol.* 55: 475-482, 1985.
41. Furman, P. A., Mc Guirt, P. V., Keller, P. M., Fyfe, J. A., Elion, G. B. Inhibition by acyclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed

- with herpesvirus genetic information. *Virology* 102: 420-430, 1980.
42. Furman, P. A., St. Clair, M. H., Spector, T. Acyclovir triphosphate is a suicide inactivator of the herpes simplex virus DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 259: 9575-9579, 1984.
43. Gadler, H., Larsson, A., Solver, E. Nucleic acid hybridization, a method to determine effects of antiviral compounds on herpes simplex virus type 1 DNA synthesis. *Antiviral Res.* 4: 63-70, 1984.
44. Gately, A., Gander, R. M., Johnson, P. C., Kit, S., Otsuka, H., Kohl, S. Herpes simplex virus type 2 meningoencephalitis resistant to acyclovir in a patient with AIDS. *J. Infect. Dis.* 161: 711-715, 1990.
45. Girond, S., Crance, J. M., Cuyck-Gandre, H. V., Renaudet, J., Deloince, R. Antiviral activity of carrageenan on hepatitis A virus replication in cell culture. *Res. Virol.* 142: 261-270, 1991.
46. Gonzalez, M. E., Alarcón, B., Carrasco, L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 31: 1388-1393, 1987.

47. Gonzales, M. E., Carrasco, L. Animal viruses promote the entry of polysaccharides with antiviral activity into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146: 1303-1310, 1987.
48. Gruenheid, S., Gatzke, L., Meadows, H., Tufaro, F. Herpes simplex virus infection and propagation in mouse L mutant lacking heparan sulfate proteoglycans. *J. Virol.* 67: 93-100, 1993.
49. Harmenberg, J., Wahren, B., Sundqvist, V. A., Leven, B. Multiplicity dependence and sensitivity of herpes simplex virus isolates to antiviral compounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 15: 567-573, 1985.
50. Harnden, M. R., Jarvest, R. J., Boyd, M. R., Sutton, D., Vere Hodge, R. A. Prodrugs of the selective antiherpesvirus agent 9-(4-hydroxyethoxy-3-hydroxymethylbut-1-yl) guanine (BRL 39123). *J. Med. Chem.* 32: 1738-1743, 1989.
51. Hayashi, K., Niwayama, S., Hayashi, T., Nago, r., Ochiai, H., Morita, N. *In vitro* and *in vivo* antiviral activity of scopadulcic acid B from *Scoparia dulcis*, *Scrophulariaceae*, against herpes simplex virus type 1. *Antiviral Res.* 9: 345-354, 1988.



52. Hayashi, K., Hayashi, T., Morita, N. Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginkgetin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1890-1893, 1992.
53. Hayashi, K., Hayashi, T., Arisawa, M., Morita, N. Antiviral agents of plant origin. Antiherpetic activity of acacetin. *Antiviral Chem. Chemother.* 4: 49-53, 1993.
54. Hayashi, K., Hayashi, T., Morita, N. An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of herpes simplex virus type 1 penetration into HeLa cells. *Phytotherapy Res.* 7: 76-80, 1993.
55. Helgstrand, E. B., Eriksson, B., Johansson, N. G., Lannerö, B., Larsson, A., Misiorny, A., Noren, J. O., Sjöberg, B., Stenberg, K., Stening, G., Stridh, S., Öberg, B., Alenius, S., Philipson, L. Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science* 201: 819-821, 1979.
56. Herold, B. C., WuDunn, D., Soltys, N., Spear, P. G. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J. Virol.* 65: 1090-1098, 1991.
57. Herold, B. C., Visalli, R. J., Susmarski, N., Brandt, C. R., Spear, P. G. Glycoprotein C-independent binding of

- herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* 75: 1211-1222, 1994.
58. Hidaka, Y., Sakai, Y., Toh, Y., Mori, R. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 is essential for the virus to evade antibody-independent complement-mediated virus inactivation and lysis of virus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 72: 915-921, 1991.
59. Hosoya, M., Balzarini, J., Shigeta, S., De Clercq, E. Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2515-2520, 1991.
60. Huemer, H. P., Larcher, C., Dierich, M. P., Falke, D. Factors influencing the interaction of herpes simplex virus glycoprotein C with the third component of complement. *Arch. Virol.* 127: 291-303, 1992.
61. Ito, M., Baba, M., Sato, A., Pauwels, R., De Clercq, E., Shigeta, S. Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro*. *Antiviral Res.* 7: 361-367, 1987.

62. Johnson, D. C., Spear, P. G. Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *J. Virol.* 43: 1102-1112, 1982.
63. Kari, B., Gehrz, R. A human cytomegalovirus glycoprotein designated gC-II is a major heparin-binding component of the viral envelope. *J. Virol.* 66: 1761-1764, 1992.
64. Keller, P. M., Fyfe, J. A., Beauchamp, L., Lubbers, C. M., Furman, P. A., Schaeffer, H. J., Elion, G. B. Enzymatic phosphorylation of acyclic nucleoside analogs and correlations with antiherpetic activities. *Biochem. Pharmacol.* 30: 3071-3077, 1981.
65. Koizumi, N., Sakagami, H., Utsumi, A., Fujinaga, S., Takeda, M., Asano, K., Sugawara, I., Ichikawa, S., Kondo, H., Mori, S., Miyatake, K., Nakano, Y., Nakashima, H., Murakami, T., Miyano, N., Yamamoto, N. Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of a sulfated paramylon. *Antiviral Res.* 21: 1-14, 1993.
66. Kristensson, K., Lycke, E., Roytta, M., Svennerholm, B., Vahlne, A. Neuritic transport of herpes simplex virus in rat sensory neurons *in vitro*. Effects of substances interacting with microtubular function and axonal flow [Nocodazole, taxol and erythro-9-3(2-

- hydroxynonyl)adenine]. J. Gen. Virol. 67: 2023-2028, 1986.
67. Kruppenbacher, J. P., Klass, R., Eggers, H. J. A rapid and reliable assay for testing acyclovir sensitivity of clinical herpes simplex virus isolates independent of virus dose and reading time. Antiviral Res. 23: 11-22, 1994.
68. Lagrota, M. H. C., Wigg, M. D., Santos, M. M. G., Miranda, M. M. F. S., Camara, F. P., Couceiro, J. N. S. S., Costa, S. S. Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) against the herpes simplex virus. Phytotherapy Res. 8: 358-361, 1994.
69. Langeland, N., Holmsen, H., Lillehavg, j. R., Haarr, L. Evidence that neomycin inhibits binding of herpes simplex virus type 1 to the cellular receptor. J. Virol. 61: 3388-3393, 1987.
70. Langlois, M., Allard, J. P., Nugier, F., Aymard. M. A rapid and automated colorimetric assay for evaluating the sensitivity of herpes simplex strains to antiviral drugs. J. Biol. Stand. 14: 201-211, 1986.

71. Larsen, A. K., Lund, D. P., Langer, R., Folkman, J. Oral heparin results in the appearance of heparin fragments in the plasma of rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2964-2968, 1986.
72. Lau, A. F., Siedlecki, J., Anleitner, J., Patterson, G. M. L., Caplan, F. R., Moore, R. E. Inhibition of reverse transcriptase activity by extracts of cultured blue-green algae (Cyanophyta). Planta Med. 59: 148-151, 1993.
73. Lee, W. C., Fuller, A. O. Herpes simplex virus type 1 and pseudorabies virus bind to a common saturable receptor on Vero cells that is not heparan sulfate. J. Virol. 67: 5088-5097, 1993.
74. Littler, E. Safety and efficacy issues of herpesvirus drugs. Antiviral Chem. Chemother. 5: 11-16, 1994.
75. Lonberg-Holm, K., Philipson, L. Attachment of virions to host cells. En: Early interaction between animal viruses and cells, editado por J. L. Melnick. Monographs in Virology, vol 9, pag. 24-49, Karger, Basel, 1974.
76. Lonberg-Holm, K. Attachment of animal virus to cells, an introduction. En: Receptors and recognition, editado por K. Lonberg-Holm y L. Philipson, vol. 8, pag. 1-20, Virus receptors, parte 2, Chapman y Hall, London, 1980.

77. Lycke, E., Johansson, M., Svennerholm, B., Lindahl, U. Binding of herpes simplex virus to cellular heparan sulphate , an initial step in the adsorption process. *J. Gen. Virol.* 72: 1131-1137, 1991.
78. Mastromarino, P., Seganti, L., Petruzziello, R., Gabrieli, R., Divizia, M., Pana, A., Orsi, N. Influence of polyions on the early steps of enterovirus infection. *J. Chemother.* 3: 203-208, 1991.
79. Mastromarino, P., Conti, C., Petruzziello, R., Lapadula, R., Orsi, N. Effect of polyions on the early events of Sindbis virus infection of Vero cells. *Microbiologica*, 15: 23-28, 1992.
80. Matulewicz, M. C., Cerezo, A. S. Water-soluble sulfated polysaccharides from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*. Analysis of the system and the structures of the  $\alpha$ -D-(1-3)- linked mannans. *Carbohydrate Pol.* 7: 121-132, 1987.
81. Mbemba, E., Chams, V., Gluckman, J. C., Klatzmann, D., Gattegno, L. Molecular interaction between HIV-1 major envelope glycoprotein and dextran sulfate. *Biochimica et Biophysica Acta* 1138: 62-67, 1992.

82. McKee, T. C., Cardellina, J. H., Riccio, R., D'Auria, M. V., Iorizzi, M., Minale, L., Moran, R. A., Gulakowski, R. J., Mc Mahon, J. B., Buckheit, R. W., Snader, K. M., Boyd, M. R. HIV-inhibitory natural products. 11. Comparative studies of sulfated sterols from marine invertebrates. *J. Med. Chem.* 37: 793-797, 1994.
83. McKenzie, R., Eband, R., Johnson, D. Cyclosporine A inhibits herpes simplex virus-induced cell fusion but not virus penetration into cells. *Virology* 159: 1-4, 1987.
84. McLaren, C., Ellis, M. N., Hunter, G. A. A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex virus to antiviral agents. *Antiviral Res.* 3: 223-234, 1983.
85. Mettenleiter, T. C., Zsak, L., Zuckermann, F., Sugg, N., Kern, H., Ben-Porat, T. Interaction of glycoprotein gIII with a cellular heparin-like substance mediates adsorption of pseudorabies virus. *J. Virol.* 64: 278-286, 1990.
86. Meyers, J. D. Prevention and treatment of cytomegalovirus infection. *Annu. Rev. Med.* 42: 179-187, 1991.

87. Miller, W. H., Miller, R. L. Phosphorilation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. *J. Biol. Chem.* 255: 7204-7207, 1990.
88. Mitsuya, H., Looney, D. J., Kuno, S., Ueno, R., Wong-Staal, F., Broder, S. Dextran sulfate supression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4<sup>+</sup> cells. *Science* 240: 646-649, 1988.
89. Nahmias, A. J., Kibrick, S. Inhibitory effect of heparin on herpes simplex virus. *J. Bacteriol.* 87: 1061-1066, 1964.
90. Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M., Yamamoto, N. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor sulfated polysaccharide extracted from sea algae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1524-1528, 1987.
91. Nauwynck, H. J., Pensaert, M. B. Abortion induced by cell-associated pseudorabies virus in vaccinated sows. *Am. J. Vet. Res.* 53: 489-493, 1992.
92. Neyts, J., Snoeck, R., Schols, D., Balzarini, J., Esko, J. D., Schepdael, A. V., De Clercq, E. Sulfated polymers



- inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate. *Virology* 189: 48-58, 1992.
93. Oberg, B. O. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol. Ther.* 40: 213-285, 1989.
94. Okazaki, K., Kimura, S., Yoshizawa, T. Antiviral activity of T-2 toxin and related compounds against herpes simplex virus type 2 *in vitro*. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.* 28: 11-15, 1988.
95. Okazaki, K., Yoshizawa, T., Kimura, S. Antiviral activity of macrocyclic trichothecene mycotoxins and related compounds baccharinoids B-4 and B-5 against herpes simplex virus type 2. *Agric. Biol. Chem.* 53: 1441-1443, 1989.
96. Okazaki, K., Matsuzaki, T., Sugahara, Y., Okada, J., Hasobe, M., Iwamura, Y., Ohnishi, M., Kanno, T., Shimizu, M., Honda, E., Kono, Y. BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparinlike moiety on the cell surface. *Virology* 181: 666-670, 1991.
97. Pancheva, S. N. Antiherpes effect of dextran sulphate combined with acyclovir *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Chem. Chemother.* 4: 189-191, 1993.

98. Pau, A. K., Pitrak, D. L. Management of cytomegalovirus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Pharmacol.* 9: 613-631, 1990.
99. Pelling, J. C., Drach, J. C., Shipman, C. Internucleotide incorporation of arabinosyladenine into herpes simplex virus and mammalian cell DNA. *Virology* 109: 323-334, 1981.
100. Pietropaolo, V., Seganti, L., Marchetti, M., Sinibaldi, L., Orsi, N., Nicoletti, R. Effect of natural and semisynthetic polymers on rabies virus infection in CER cells. *Res. Virol.* 144: 151-158, 1993.
101. Plunkett, W., Cohen, S. S. Metabolism of 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyladenine by mouse fibroblasts. *Cancer Res.* 35: 415-422, 1975.
102. Prichard, M. N., Turk, S. R., Coleman, L. A., Engelhardt, S. L., Shipman, C., Drach, J. C. A microtiter virus yield reduction assay for the evaluation of antiviral compounds against human cytomegalovirus and herpes simplex virus. *J. Virol. Methods* 28: 101-106, 1990.

103. Prusoff, W. H. Synthesis and biological activities of iododeoxy uridine, an analog of thimidine. *Biochem. Biophys. Acta* 32: 295-296, 1959.
104. Prusoff, W. H. A review of some aspects of 5-iododeoxyuridine and azauridine. *Cancer Res.* 23: 1246-1259, 1963.
105. Rabalais, G. P., Levin, M. J., Berkowitz, F. E. Rapid herpes simplex virus susceptibility testing using an enzyme-linked immunosorbent assay performed *in situ* on fixed virus-infected monolayers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 946-948, 1987.
106. Reardon, J. E., Spector, T. Herpes simplex virus type I DNA polymerase: mechanism of inhibition by acyclovir triphosphate. *J. Biol. Chem.* 264: 7406-7411, 1989.
107. Reed, L. J., Muench, H. A. A simple method of estimating 50 % end point. *Am. J. Hyg.* 27: 493-497, 1938.
108. Renard Nozaki, J., Kim, T., Imakura, Y., Kihara, M., Kobayashi, S. Effect of alkaloids isolated from *Amaryllidaceae* on herpes simplex virus. *Res. Virol.* 140: 115-128, 1989.

109. Rinehart, K. L., Shield, L. S., Cohen-Parsons, M. Antiviral substances. En: Marine Biotechnology. Vol 1: Pharmaceutical and bioactive natural products, editado por D. H. Attaway y O. R. Zaborsky, pag. 309-342, Plenum Press, New York, 1993.
110. Roizman, B., Aurelian, L., Roane, P. R. The multiplication of herpes simplex virus. I. The programming of viral DNA duplication in HEp-2 cells. Virology 21: 482-498, 1963.
111. Roizman, B. Family *Herpesviridae*. En Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, editado por R. I. B. Francki, C. M. Fauquet, D. L. Knudson, F. Brown, pag. 103-110, Springer-Verlag Wien, New York, 1991.
112. Roizman, B. The family *Herpesviridae*. A brief introduction. En The human herpesviruses, editado por B. Roizman, R. J. Whitley y C. Lopez, cap. 1, pag. 1-9, Raven Press Ltd., New York, 1993.
113. Safrin, S., Assaykeen, T., Follansbee, S., Mills, j. Foscarnet therapy for acyclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex virus infection in 26 AIDS patients: preliminary data. J. Infect. Dis. 161: 1078-1084, 1990.

114. Schabel, F. M. The antiviral activity of 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyladenine (ARA-A). *Chemotherapy* 13: 321-338, 1968.
115. Schaeffer, H. J., Beauchamp, L., Miranda, P. de, Elion, G. B., Bauer, D. J., Collins, P. 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature (London)* 272: 583-585, 1978.
116. Scheuer, P. J. Marine natural products and biomedicine. *Med. Res. Rev.* 9: 535-545, 1989.
117. Schols, D., De Clercq, E., Balzarini, J., Baba, M., Witvrouw, M., Hosoya, M., Andrei, G., Snoeck, R., Neyts, J., Pauwels, R., Nagy, M., Gyorgyi-Edelenyi, J., Machovich, R., Horvath, I., Lou, M., Gorog, S. Sulfated polymers are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, respiratory syncytial virus, and toga, arena and retroviruses. *Antiviral Chem. Chemother.* 1: 233-240, 1990.
118. Shieh, M. T., WuDunn, D., Montgomery, R. I., Esko, J., Spear, P. G. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J. Cell. Biol.* 116: 1273-1281, 1992.

119. Sinibaldi, L., Pietropaolo, V., Goldoni, P., Di Taranto, C., Orsi, N. Effect of biological and synthetic polymers on BK virus infectivity and hemagglutination. *J. Chemother.* 4: 16-22, 1992.
120. Smee, D. F., Martin, J. C., Verheyden, J. P. H., Matthews, T. R. Anti-herpesvirus activity of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 676-682, 1983.
121. Spear, P. G. Glycoproteins specified by herpes simplex viruses. En: *The herpesviruses*, editado por B. Roizman, pag. 315-356, New York and London Plenum Press, 1985.
122. Stannard, L. M., Fuller, A. O., Spear, P. G. Herpes simplex virus glycoproteins associated with different morphological entities projecting from the virion envelope. *J. Gen. Virol.* 68: 715-725, 1987.
123. St. Clair, M. H., Furman, P. A., Lubbers, C. M., Elion, G. B. Inhibition of cellular alpha and virally induced deoxyribonucleic acid polymerase by the triphosphate of acyclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18: 741-745, 1980.
124. Stuart-Harris, C. Antiviral chemotherapy, an introduction and apology for the slow progress. En:

- Problems of antiviral chemotherapy, editado por C. H. Stuart-Harris y J. Oxford, pag 1-12, Academic Press Ltd., London, 1983.
125. Suzuki, S., Sano, F., Yuki, H. Studies on antiviral agents. IV. Biological activity of tenuazonic acid derivatives. Chem. Pharm. Bull. 15: 1120-1125, 1967.
126. Svennerholm, B., Jeansson, S., Vahlne, A., Lycke, E. Involvement of glycoprotein C (gC) in adsorption of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) to the cell. Arch. Virol. 120: 273-279, 1991.
127. Takemoto, K. K. Plaque mutants of animal viruses. Prog. Med. Virol. 8: 314-348, 1966.
128. Vaheri, A., Cantell, K. The effect of heparin on herpes simplex virus. Virology 21: 661-662, 1963.
129. Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J., Van Hoof, L. Plant products as potential antiviral agents. Bull. Inst. Pasteur 84: 101-147, 1986.
130. Venkateswaran, P. S., Millman, I., Blumberg, B. S. Interaction of fucoidan from *Pelvetia fastigiata* with surface antigens of hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses. Planta Medica 55: 265-270, 1989.

131. Weiler, B. E. , Schroder, H. C., Stefanovich, V., Stewart, D., Forrest, J. M. S., Allen, L. B., Bowden, B. J., Kreuter, M. H., Voth, R., Muller, W. E. G. Sulphoevernan, a polyanionic polysaccharide, and the narcissus lectin potently inhibit human immunodeficiency virus infection by binding to viral envelope protein. *J. Gen. Virol.* 71: 1957-1963, 1990.
132. Weller, T. J. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations. *N. Engl. J. Med.* 285: 203-214, 1971.
133. Wentworth, B. B. , French, L. Plaque assay of cytomegalovirus strains of human origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 135: 253-258, 1970.
134. Witvrouw, M., Desmyter, j., De Clercq, E. Antiviral portrait series: 4. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses. *Antiviral Chem. Chemother.* 5: 345-359, 1994.
135. Witvrouw, M., Este, j. A., Mateu, M. Q., Reymen, D., Andrei, G., Snoeck, R., Ikeda, S., Pauwels, R., Bianchini, N. V., Desmyter, J., De Clercq, E. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human



- immunodeficiency virus and other enveloped viruses. Antiviral Chem. Chemother. 5: 297-303, 1994.
136. Wudunn, D., Spear, P. G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. J. Virol. 63: 52-58, 1989.
137. Yamamoto, N., Furukawa, H., Ito, Y., Yoshida, S., Maeno, K., Nishiyama, Y. Anti-herpesvirus activity of citrussinine-I, a new acridone alkaloid, and related compounds. Antiviral Res. 12: 21-36, 1989.
138. Zuckermann, F., Zsak, L., Reilly, L., Sugg, N., Ben-Porat, T. Early interactions of pseudorabies virus with host cells: functions of glycoprotein gIII. J. Virol. 63: 3323-3329, 1989.