

## Tesis de Posgrado

# Modo de acción antiherpética de distintas clases de carragenanos aislados del alga roja *Gigartina skottsbergii*

Carlucci, María Josefina

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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:**

Carlucci, María Josefina. (2001). Modo de acción antiherpética de distintas clases de carragenanos aislados del alga roja *Gigartina skottsbergii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3352\\_Carlucci.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3352_Carlucci.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Carlucci, María Josefina. "Modo de acción antiherpética de distintas clases de carragenanos aislados del alga roja *Gigartina skottsbergii*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3352\\_Carlucci.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3352_Carlucci.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**MODO DE ACCIÓN ANTIHERPÉTICA DE  
DISTINTAS CLASES DE CARRAGENANOS  
AISLADOS DEL ALGA ROJA *Gigartina skottsbergii***

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires

Autora: Bioqca. María Josefina Carlucci

Directora: Dra. Elsa Beatriz Damonte

Laboratorio de Virología  
Departamento de Química Biológica  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
2001

Nº 3352

mis padres y herma  
r su buen humor, su  
v su confianza

*“En pos de su nivel se lanza el río  
por el gran desnivel de los breñales;  
el aire es vendaval, y hay vendavales  
por la ley del no fin, del no vacío;  
la más hermosa espiga del estío  
ni sueña con el pan en los trigales;  
el más dulce panal de los panales  
no declaró jamás: yo no soy mío;*

*Y el sol, el padre sol, es raudo foco  
que fomenta la vida en la Natura,  
por calentar los polos no se apura,  
ni se desvía un ápice tampoco:*

*Todo lo alcanzarás, solemne loco...  
¡siempre que lo permita tu estatura!”*

*"Textura alada" . Fotógrafa: "Veta"  
"Vera Violeta" . Autor: "Almafuerte"*

Gracias a todos aquellos que hicieron del camino una vocación, del fracaso un desafío, del desánimo una victoria, del trabajo una aventura. Gracias porque sin el apoyo constante y su solidaridad incondicional, la meta estaría hoy muy lejos de mis posibilidades.

Cuando veas el fruto piensa quién sembró el árbol, a ella por su generosidad y confianza por aceptarme en su mundo siendo aún una desconocida, por demostrarme que la ciencia no conoce fronteras y que tiene lugar para soñadores e idealistas. Gracias Celia por tu profunda sinceridad y franca humanidad.

Elsa, no hay palabras para expresar mi gratitud, todo lo conseguido es deuda. Estoy eternamente agradecida por tu actitud, nobleza, amistad y tu constante motivación que hicieron de estos años un alegre búsqueda. Por darme libertad, respetar mis tiempo y por ser guía en esta tarea de mostrarme el "norte" científico.

Al Dr. Cerezo y colaboradores, sin su valiosa contribución esto no sería posible.

A Susana, por su silenciosa presencia.

A Patri, por su sonrisa aún en situaciones críticas.

A Vivi, que con su espíritu pacifista apaciguaba mi espera.

Felix, pausa obligada para abstenerse de lo cotidiano, abastecerse de energía y retomar las sendas con renovados ánimos.

Nati, Erina, Paula, aire fresco en momentos difíciles.

Andrea, compañera, complice y amiga de viaje, sin su presencia ¿Quién podría interpretar mejor la tarea de un becario?

Nelly, mujer admirable, luchadora incansable, timón en mis días de deriva y tierra firme en los ratos de naufragio...

A Cybele, hermana, confidente, copiloto de aventuras..Qué triste hubiese sido sin tu inocencia aplicada...admirable entereza para soportar mis reiteradas molestias.

A Laura, porque con su espíritu incomparable y su coraje inquebrantable, fortalecía diariamente mi continuidad.

A Poli, por encontrales nuevas interpretaciones al mundo experimental.

A Sandra, por su palabra, sonrisa y mirada oportuna que aligeraba mi carga.

Luis, guía, amigo, delirante encantador; gracias por las fantásticas horas compartidas, por tus consejos, orientaciones y tu generosa entrega.

A Isabel, que con su cortés predisposición y sus gestos afectuosos disipaban tensiones y en ciertos momentos concentraciones.

A Mónica, por sus códigos de "excel 5.0" que interpretaba mis estados.

Charly, todo lo dicho es poco, un gran consejero, fiel amigo, hombre que con su humildad, amor y simpatía dedicó su tiempo para adiestrarme en el inicio del camino, compensar mis falencias, liberar mis dudas y afianzar mi destino.

A mis amigos por su paciencia, por acompañarme en esta travesía, por comprender mis ausencias...por tantos momentos felices.

A todos MUCHAS GRACIAS.

**Los resultados de esta Tesis han sido publicados en forma parcial en las siguientes revistas científicas:**

- Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. M. J. Carlucci, C. A. Pujol, M. Ciancia, M. D. Nosedá, M. C. Matulewicz, E. B. Damonte, A. S. Cerezo. *International Journal of Biological Macromolecules* 20 (1997) 97-105.
- Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. M. J. Carlucci, M. Ciancia, M. C. Matulewicz, A. S. Cerezo, E. B. Damonte. *Antiv. Research.* 43 (1999) 93-102.
- Inhibitory Action of Natural Carrageenans on Herpes simplex Virus Infection of Mouse Astrocytes. M. J. Carlucci, L. A. Scolaro, E. B. Damonte. *Chemotherapy.* 45 (1999) 429-436 .

<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCION</b>	
Concepto de un antiviral ideal	10
Progreso limitado en la quimioterapia antiviral	10
Los Herpesvirus	11
Estructura viral	11
Ciclo de replicación viral	13
Reseña histórica y situación actual de la terapia antiherpética	15
Antivirales naturales	17
Polisacáridos sulfatados como antivirales	18
<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Extracción y fraccionamiento de los carragenanos	22
2. Células	23
3. Virus	23
a) Cepas	23
b) Preparación de las suspensiones virales	24
c) Marcación de viriones con radioisótopos y su purificación	24
4. Ensayos de la citotoxicidad	25
a) Efecto sobre células confluentes	25
b) Efecto sobre la proliferación celular	26
5. Determinación de actividad antiviral	26
a) Reducción en el número de placas	26
b) Inhibición del rendimiento viral	26
c) Inhibición del efecto citopático	27
6. Determinación de la actividad virucida	27

7. Acción de los compuestos por pretratamiento celular	27
8. Influencia del tiempo de adición de los compuestos sobre la actividad antiviral	28
9. Acción de los compuestos sobre la adsorción	28
a) Adición de los compuestos durante o después de la adsorción en un ensayo de plaqueo directo	28
b) Efecto de los compuestos en la cinética de adsorción viral	28
10. Efecto de los polisacáridos sobre la internalización viral	29
11. Acción de los carragenanos sobre la síntesis de proteínas virales	30
12. Medida de la expresión de GFAP, de tubulina y de proteínas virales en astrocitos	30
13. Ensayo de la actividad anticoagulante	31
14. Selección de variantes de HSV-1 en presencia de carragenano	31
15. Tinción de Giemsa para observación del efecto citopático	32
16. Virulencia para ratón adulto y lactante	32
17. Modelo de infección vaginal	33

## **RESULTADOS**

<b>I. Evaluación de las actividades biológicas de los carragenanos y sus derivados</b>	<b>34</b>
I.1. Características estructurales	34
I.2. Actividad antiviral y citotoxicidad	36
I.3. Actividad anticoagulante	38
<b>II. Caracterización de la actividad antiviral y citotóxica de los carragenanos 1T<sub>1</sub>, 1C<sub>3</sub> y 1C<sub>1</sub> frente a diferentes parámetros experimentales</b>	<b>40</b>
II.1. Efecto sobre células confluentes	40
II.2. Efecto sobre células en proliferación	42
II.3. Espectro de actividad antiviral contra herpesvirus	45
II.4. Actividad contra HSV en distintos tipos celulares	46
II.5. Influencia de la multiplicidad de infección sobre la actividad antiviral	51
II.6. Evaluación de la CI <sub>50</sub> por distintas técnicas	52

<b>III. Mecanismo de acción antiviral de los carragenanos</b>	<b>53</b>
III.1. Influencia del tiempo de adición de los carragenanos sobre su actividad antiviral	53
III.2. Efecto de los carragenanos sobre la adsorción viral	55
III.3. Efecto de los carragenanos sobre la internalización viral	56
III.4. Efecto de los carragenanos sobre la síntesis de proteínas virales	57
III.5. Efecto de los carragenanos por pretratamiento de las células y los viriones	59
<b>IV. Selección y caracterización de variantes de HSV-1 aisladas en presencia de 1C<sub>3</sub></b>	<b>61</b>
IV.1. Selección y clonado de variantes de HSV-1 por pasajes seriados	61
IV.2. Susceptibilidad a polisacáridos de las variantes de HSV-1	66
IV.3. Caracterización de los sincicios producidos por las variantes de HSV-1	68
IV.4. Susceptibilidad de las variantes de HSV-1 a melitina y ciclosporina A	71
IV.5. Virulencia para ratón de las variantes sinciciales	72
IV.6. Ciclo de crecimiento	73
<b>V. Evaluación de la actividad antiviral in vivo</b>	<b>75</b>
V.1. Modelo de infección vaginal con HSV-2	75
V.2. Efecto protector de 1C <sub>3</sub> y 1T <sub>1</sub>	77
<b>DISCUSION</b>	<b>81</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>89</b>

ACP: acción citopatogénica  
ACV: aciclovir  
ATCC: American Type Culture Collection  
BSA: seroalbúmina bovina  
C: cistocárpica  
CC: control celular  
CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica 50%  
CI<sub>50</sub>: concentración inhibitoria 50%  
CMV: citomegalovirus  
cpm: cuenta por minuto  
CV: control viral  
DE: desvío estándar  
DL<sub>50</sub>: dosis letal 50%  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
DO: densidad óptica  
DS: dextrán sulfato  
FDA: Food and Drug Administration  
GFAP: proteína gliofibrilar ácida  
h: hora  
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana  
HSV: virus herpes simplex  
Ig: inmunoglobulina  
IS: índice de selectividad  
IV: índice de virulencia  
kD: kiloDalton  
m: multiplicidad de infección  
MEM: medio mínimo esencial Eagle  
min: minutos  
MM: medio de mantenimiento  
mRNA: RNA mensajero  
MTT: (3-4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio  
nm: nanometro

**p.i:** postinfección  
**PBS:** solución salina de fosfatos  
**PCA:** ácido perclórico  
**PM:** peso molecular  
**PMSF:** fenil-metil-sulfonil-fluoruro  
**RNA:** ácido ribonucleico  
**RR:** resistencia relativa  
**RSV:** virus sincicial respiratorio  
**SDS:** dodecil sulfato de sodio  
**T:** tetraspóricas  
**TK<sup>-</sup>:** deficiente en timidina quinasa  
**TK:** timidina quinasa  
**TT:** tiempo de trombina  
**UFP:** unidades formadoras de placas  
**VSV:** virus estomatitis vesicular  
**VZV:** virus varicella-zoster

La evaluación de la actividad antiviral *in vitro* contra los virus herpes simplex (HSV) tipos 1 y 2 de las diferentes clases de carragenanos obtenidos del alga roja patagónica *Gigartina skottsbergii* y sus derivados cíclicos mostró la presencia de varios compuestos con actividad antiherpética. Los estudios de modo de acción y propiedades antivirales se realizaron con tres carragenanos con la mayor potencia antiviral, pertenecientes a cada uno de los distintos tipos estructurales: 1T<sub>1</sub>, λ-carragenano, 1C<sub>1</sub>, carragenano κ/ι, y 1C<sub>3</sub>, carragenano μ/ν.

Los tres compuestos mostraron un amplio espectro de actividad antiherpética contra cepas de referencia de HSV-1 y HSV-2, mutantes TK<sup>-</sup> resistentes a aciclovir y aislamientos clínicos, con un índice de selectividad superior a 1000. La acción antiherpética de estos polisacáridos fue independiente de la célula huésped, la cepa de virus, la multiplicidad de infección y el ensayo de actividad antiviral empleado. Asimismo, en las concentraciones inhibitorias antivirales, los carragenanos carecieron de actividad anticoagulante.

Los estudios del mecanismo de acción de 1T<sub>1</sub>, 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> sobre la infección de células Vero con HSV-1 se llevaron a cabo analizando su efecto en las distintas etapas del ciclo de multiplicación viral. Su principal blanco de acción fue la adsorción del virus a la célula, interfiriendo con la unión del virión a los receptores primarios, que son los residuos heparan sulfato de proteoglicanos presentes en la superficie celular. No fueron activos en etapas posteriores del ciclo viral, y uno de los carragenanos, 1T<sub>1</sub>, mostró además propiedades virucidas produciendo inactivación del virión.

Para evaluar la capacidad de inducir resistencia antiviral y también caracterizar mejor el blanco de ataque de los compuestos, se realizaron pasajes seriados de HSV-1 en células Vero en presencia de concentraciones crecientes de 1C<sub>3</sub> y 1T<sub>1</sub>. Con 1T<sub>1</sub>, no se indujo resistencia, en tanto que las variantes virales seleccionadas con 1C<sub>3</sub> mostraron un muy bajo nivel de resistencia, con valores de CI<sub>50</sub> 5-10 veces mayores que la cepa parental, y adquirieron la capacidad de formar sincicios en células Vero. El fenotipo sincicial fue independiente de la adquisición de resistencia parcial y se debería a una alteración en la glicoproteína gB.

Los tres carragenanos fueron también efectivos en inhibir la infección de HSV-1 y HSV-2 en astrocitos murinos, importante característica dado el carácter neurotrópico de estos virus. También mostraron efectos moduladores sobre la expresión de la proteína gliofibrilar ácida de los astrocitos.

Se han realizado estudios in vivo con 1C<sub>3</sub> y 1T<sub>1</sub> utilizando el modelo de infección vaginal de ratones BALB/c con HSV-2, encontrándose protección superior al 90% en los animales que recibieron por lo menos dos dosis por vía vaginal del carragenano 1T<sub>1</sub>.

El conjunto de estos resultados indican la trascendencia de los carragenanos naturales estudiados como potenciales agentes antivirales, con promisorias posibilidades de aplicación terapéutica en forma tópica.

Palabras claves: virus herpes simplex; carragenanos; actividad antiviral; actividad virucida; productos naturales.

The evaluation of the antiviral activity in vitro against herpes simplex virus (HSV) types 1 and 2 of different classes of carrageenans obtained from the red patagonian seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclic derivatives, showed the presence of many compounds with antiherpetic activity. The studies about the mode of action and the antiviral properties were carried out with the three more active carrageenans, belonging to each one of the different structural types: 1T<sub>1</sub>, λ-carrageenan, 1C<sub>1</sub>, κ/ι carrageenan, and 1C<sub>3</sub>, μ/ν carrageenan.

The three compounds showed a broad spectrum of antiherpetic activity against the reference strains of HSV-1 and HSV-2, as well as acyclovir resistant TK<sup>-</sup> mutants and clinical isolates, with a selectivity index greater than 1000. The antiherpetic activity of these polysaccharides was independent of the host cell, the virus strain, the multiplicity of infection and the antiviral assay. Furthermore, the carrageenans were devoid of anticoagulant activity at the antiviral effective concentrations.

The studies of mode of action of 1T<sub>1</sub>, 1C<sub>1</sub> and 1C<sub>3</sub> on HSV-1 infected Vero cells were carried out analyzing their effect on the different stages of the virus replication cycle. Virus adsorption to the host cell was the main target of carrageenans, which interfered with virus binding to proteoglycan heparan sulphate residues present at the cell surface. No effect on later stages of the viral cycle were detected, but the λ-carrageenan 1T<sub>1</sub> exerted virucidal action leading to virion inactivation.

To evaluate the carrageenan ability to induce antiviral resistance and characterize the target of the compounds, serial passages of HSV-1 on Vero cells in the presence of increasing concentrations of 1C<sub>3</sub> and 1T<sub>1</sub> were done. 1T<sub>1</sub> did not induce viral resistance, whereas 1C<sub>3</sub> selected viral variants with IC<sub>50</sub> values 5-10 fold higher than parental strain.

The HSV-1 variants arising in the presence of 1C<sub>3</sub> acquired the ability to develop syncytia in Vero cells. An alteration on glycoprotein gB could be responsible of the syncytial phenotype, which was not related to drug-resistance.

The three carrageenans were also effective inhibitors of HSV-1 and HSV-2 infection of murine astrocytes, a relevant finding given the neurotropic properties of these viruses. They also showed modulatory effects on the expression of the gliofibrillar acid protein of astrocytes.

The carrageenans 1C<sub>3</sub> and 1T<sub>1</sub> were evaluated for antiviral activity in vivo in a murine model of vaginal infection with HSV-2. More than 90% of the BALB/c mice receiving at least two doses of 1T<sub>1</sub> were protected.

These results indicate the relevance of natural carrageenans isolated from *Gigartina skottbergii* as potential antiviral agents, with promising perspectives of topical application.

Key words: herpes simplex virus; carrageenans; antiviral activity; virucidal activity; natural products.

**RODUCCIO**

## **Concepto de un antiviral ideal**

Un perfecto antiviral sería un compuesto que rápidamente cure una enfermedad viral sin producir efectos colaterales, pero hasta el momento esto es utópico, ya que la mayoría de los agentes terapéuticos los producen, y además en muchas infecciones virales no se logra alcanzar la eliminación total del virus, sino una disminución de la carga viral con la consecuente mejoría del individuo infectado. Los efectos colaterales deben tenerse en cuenta dentro del contexto de la enfermedad que se está tratando. Es aceptable tenerlos si la enfermedad amenaza la vida o si el tratamiento provoca beneficios al paciente durante un episodio agudo de la enfermedad suprimiendo la recurrencia, pero es inaceptable tenerlos si la enfermedad es leve o autolimitante ( Darby, 1995).

Las características a tener en cuenta para la elección de un compuesto para uso terapéutico deberían ser: alta estabilidad, fácil fabricación, bajo costo, alta pureza, propiedades físicas, químicas y mecánicas para las funciones propuestas, no producir mutagénesis, teratogénesis, alteraciones electrolíticas, reacciones tóxicas ó alérgicas (Franz, 1989).

## **Progreso limitado en la quimioterapia antiviral**

El avance en la quimioterapia de enfermedades virales en las últimas décadas ha ocurrido de manera lenta en relación con el progreso experimentado para el tratamiento de infecciones bacterianas. Sólo un número limitado de agentes antivirales ha sido aprobado para el uso clínico. Algunas de las causas asociadas con este escaso desarrollo serían:

1. Los virus son parásitos obligados intracelulares que usan algunos mecanismos de la célula huésped infectada. Históricamente ha sido difícil la obtención de una sustancia con una buena actividad antiviral que no afecte también el normal metabolismo de la célula huésped por sus efectos tóxicos.
2. El diagnóstico temprano de las infecciones virales es crucial para una terapia antiviral efectiva. Hasta que aparecen los síntomas, varios ciclos de multiplicación viral ya han ocurrido y la replicación ha disminuído. Los diagnósticos clínicos para muchas infecciones virales son imprecisos debido a la carencia de especificidad de muchos síndromes virales. Como consecuencia, la terapia antiviral efectiva depende de los medios de diagnóstico rápidos, sensibles, específicos y prácticos.

3. La mayoría de las infecciones de origen viral son relativamente benignas y autolimitantes por lo tanto el índice de selectividad (es decir la relación de citotoxicidad a capacidad antiviral de un compuesto) debe ser extremadamente elevado para que un compuesto sea aceptado en la terapia.
4. En todo este contexto, la quimioterapia antiviral representa una investigación de alto riesgo para la industria farmacéutica, por lo que su desarrollo está prácticamente restringido a aquellos agentes infecciosos que representan una prioridad clínica. Estas pueden definirse como infecciones no controlables por medio de vacunas, que afectan a un elevado número de personas, que pueden ser diagnosticadas rápidamente, son relativamente severas y requieren un largo período de tratamiento. Dentro de estas características se incluyen como principales problemas sanitarios las infecciones por el virus de inmunodeficiencia humana, las infecciones herpéticas y las hepatitis de tipo B y C.

## **Los Herpesvirus**

### **Estructura viral**

La familia *Herpesviridae* comprende tres grandes grupos ó subfamilias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* (Murphy, 1996), con ocho miembros que son patógenos para el hombre: los virus herpes simplex (HSV) tipos 1 y 2, el virus varicella-zoster (VZV), el citomegalovirus humano (CMV), el virus de Epstein-Barr, y los herpesvirus humanos 6, 7 y 8. La principal propiedad de todos ellos es su capacidad de persistir en el huésped, estableciendo latencia, lo que hace que el gran problema sea la reactivación o recurrencia.

Los virus de la familia *Herpesviridae* están constituidos por cuatro componentes estructurales concéntricos: uno interior o *core*, una *cápside* icosaédrica que lo rodea, un *tegumento* amorfo y finalmente una *envoltura* ( Figura 1 ).

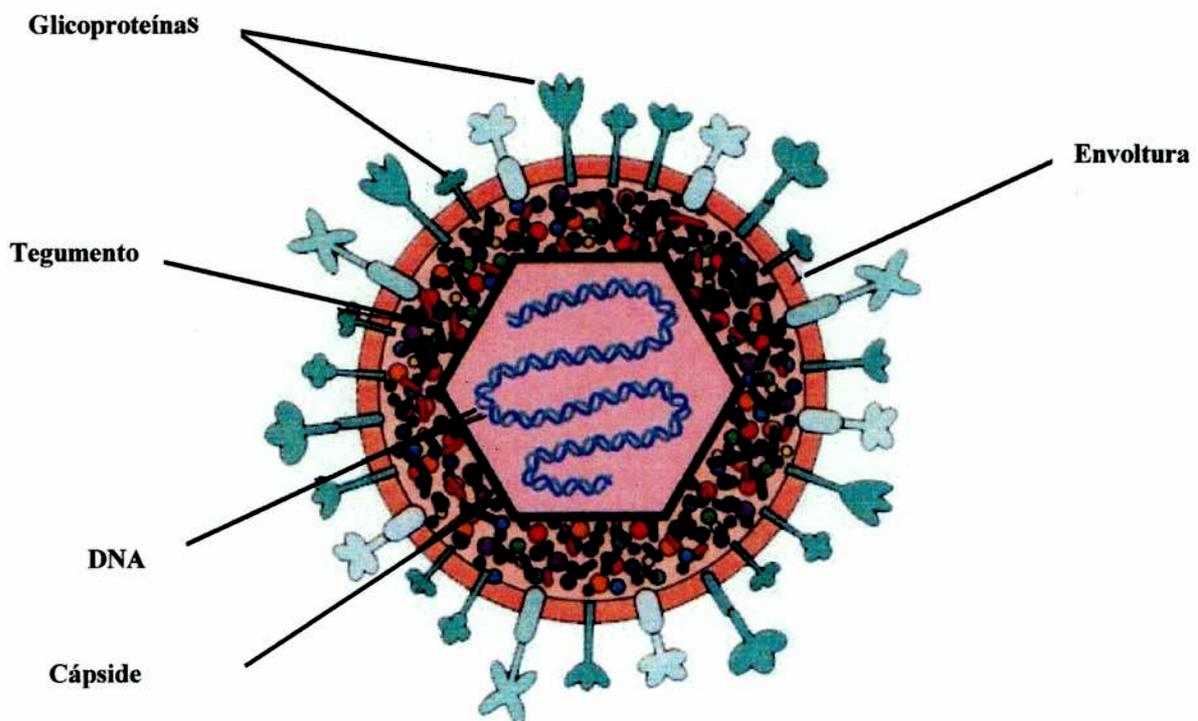
El genoma está en el centro del *core* y tiene el aspecto de un ovillo de lana, con un DNA doble cadena lineal de 125-229 Kpb con secuencias repetidas características del género, asociado a proteínas centrales fibrilares.

La cápside es un icosaedro de 100 nm de diámetro, compuesta por 162 capsómeros constituidos por subunidades proteicas huecas, 150 hexámeros en las caras y aristas y 12 pentámeros en los vértices.

Rodeando la cápside se localiza una capa de material globuloso conocida como tegumento, formado por lipoproteínas, glicoproteínas, proteínas fosforiladas y proteínas con actividades enzimáticas como ATPasas y proteinquinasas.

La cubierta más externa es una envoltura de 120-200 nm de diámetro, constituida por una doble capa lipídica en la que se insertan diferentes y numerosas glicoproteínas, algunas formando peplómeros, cuya función sería controlar el tropismo celular y las interacciones célula-célula infectada, y participar de la respuesta inmune específica.

El virión consta de más de 30 proteínas de las cuales un número pequeño está asociado con el DNA en el *core*, 6 están presentes en la cápside, 10-20 en el tegumento y 10 en la envoltura.



**Figura 1: Partícula viral extracelular madura**

### Ciclo de replicación viral

El virión de HSV se une por medio de la envoltura viral a través de la glicoproteína C (gC) al receptor heparan sulfato que forma parte de los proteoglicanos de la superficie celular (Herold y col , 1994; Aguilar y col,1999). La penetración o entrada al citoplasma requiere de las glicoproteínas virales gB, gD, gH y gL para que ocurra la fusión de la envoltura con la membrana plasmática, independiente del pH. Las proteínas del tegumento son liberadas en la célula y una de ellas produce la detención de la síntesis de proteínas celulares, y la nucleocápside es transportada a través del citoesqueleto hacia los poros de la membrana nuclear, el DNA viral entra al núcleo y se circulariza ( Figura 2 ).

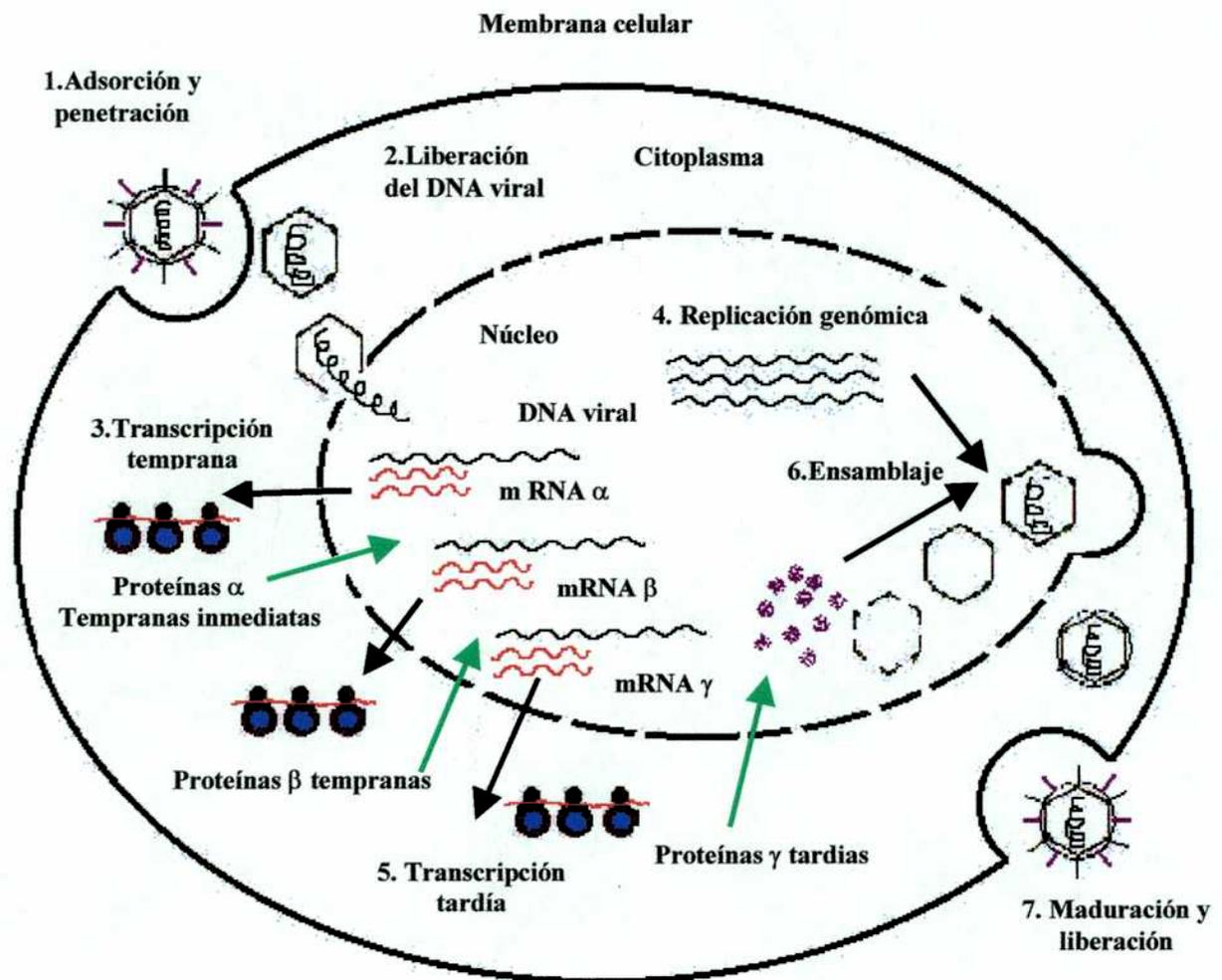


Figura 2: Ciclo de replicación viral

La expresión de los genes virales está estrechamente regulada con tres clases de mRNA,  $\alpha$  (genes tempranos inmediatos),  $\beta$  (genes tempranos) y  $\gamma$  (genes tardíos), que son transcritos en forma secuencial por la RNA polimerasa II celular. Una de las proteínas virales liberadas del tegumento se asocia con dos proteínas celulares para formar un complejo multiproteico que reconoce específicamente una secuencia nucleotídica en la región del promotor del DNA viral, gatillando, a través de la polimerasa celular, la transcripción de los genes tempranos inmediatos. Los mRNAs  $\alpha$  son transportados hacia el citoplasma y traducidos a cinco proteínas  $\alpha$ , que son reguladoras de la expresión de todos los mRNAs posteriores. Una proteína  $\alpha$  se requiere para iniciar la transcripción de los genes tempranos ó  $\beta$ . Las proteínas  $\beta$  son enzimas requeridas para aumentar el contenido intracelular de nucleótidos (ejm: timidinoquinasa, ribonucleótido reductasa) y otras necesarias para la replicación del DNA viral (ejm: DNA polimerasa, primasa-helicasa, topoisomerasa, proteínas de unión a DNA simple y doble cadena). Se produce a continuación la replicación del DNA y luego ciertas proteínas  $\beta$  inducen un nuevo cambio en el programa de transcripción, originando los mRNAs  $\gamma$  tardíos, que son traducidos a proteínas  $\gamma$ , la mayoría de las cuales son proteínas estructurales necesarias para la morfogénesis del virión. Las proteínas de la cápside se ensamblan para formar cápsides vacías en el núcleo, en las que se introduce el DNA para producir las nucleocápsides, las que se asocian con porciones de la membrana nuclear enriquecidas en proteínas del tegumento y glicoproteínas. Luego por brotación salen de la membrana nuclear los viriones envueltos que son liberados por exocitosis. Las glicoproteínas específicas virales se encuentran también en la membrana plasmática donde están involucradas en la fusión celular, pueden actuar como receptores Fc, y posibles blancos para la citólisis inmune. Estas infecciones productivas son líticas como resultado de la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares inducida por el virus, observándose redondeamiento y desprendimiento de las células.

## **Reseña histórica y situación actual de la terapia antiherpética**

La búsqueda de quimioterápicos contra las infecciones por herpesvirus se remonta a los tempranos años 50 cuando la creciente necesidad por desarrollar compuestos antitumorales hizo que se focalizara todo el esfuerzo hacia los análogos de nucleósidos. El razonamiento fue simple, el desarrollo tumoral involucra un descontrolado crecimiento celular y la división celular estaría precedida por una duplicación del DNA. Por lo tanto, los análogos de nucleósidos serían potencialmente inhibidores de la progresión tumoral y por lo tanto podría esperarse un bloqueo en la síntesis del DNA. En rigor, los propios nucleósidos no son bloqueadores. La DNA polimerasa usa deoxinucleósidos trifosfatados que son incorporados en el DNA naciente como monofosfatos y para interferir en este proceso los análogos de nucleósidos deben ser primero activados por fosforilación. Estos mismos argumentos pueden ser aplicados a la replicación del DNA viral. Así es como surge el primer compuesto antiherpético, la idoxiuridina (5-iodo-2'-deoxiuridina, IDU) sintetizada por Prusoff (1959), luego Kaufman (1962) demostró que tenía efectos curativos contra la queratitis herpética en ratones y en humanos. En el mismo año fue aprobado en Estados Unidos para terapia tópica. Dos años más tarde, la trifluridina (5-trifluoro-2'-deoxitimidina, TFF) fue incorporada al tratamiento de la queratitis herpética y en 1972 se aprobó también para ese uso la vidarabina (arabinósido de adenina, Ara-A). Sin embargo, todos estos análogos no podrían utilizarse en tratamientos sistémicos por su baja selectividad, pues ejercerían su efecto tanto sobre la DNA polimerasa viral como celular. En retrospectión, podemos considerar que la quimioterapia antiviral llegó a la "mayoría de edad" con la llegada del aciclovir [9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina] (ACV) en 1977 como el primer agente antiviral verdaderamente específico. El compuesto actúa como un inhibidor de la replicación de HSV, esencialmente al ser fosforilado por la timidina quinasa (TK) viral para pasar a la forma ACV-monofosfato, que es el paso que confiere selectividad a esta droga. La di- y tri-fosforilación es efectuada por enzimas celulares. El ACV-trifosfato actúa como inhibidor y sustrato de la DNA polimerasa viral con mayor efectividad que sobre la DNA polimerasa celular y por su estructura cíclica es un terminador de cadena. El ACV ha demostrado un excepcional perfil de seguridad y una buena tolerancia. El mayor efecto adverso del ACV sería la alteración de la función renal cuando se lo aplica en altas dosis.

Uno de los problemas cruciales de la actual terapia antiviral es el fenómeno de resistencia. Es decir, la aparición de variantes virales resistentes por tratamiento prolongado con una droga, lo que ocurre especialmente en el caso de las infecciones herpéticas en pacientes inmunocomprometidos tratados con ACV ( Crumpacker, 1989; Cohen Stuart y col, 1998; Balfour, 1999). Es por ello que se ha continuado en la búsqueda de compuestos más eficaces que el ACV para uso alternativo, ensayando diferentes derivados del mismo. En la actualidad hay tres derivados de ACV aprobados para uso clínico: ganciclovir (9-[(1,3-dihidroxi-2-propoxi)-metil]guanina), famciclovir (diacetil-6-dioxi-penciclovir) y valaciclovir (9-(4-acetoxi-3-acetoximetil-1-butil) guanina); el primero tiene su mayor aplicación en el tratamiento para CMV, el segundo es efectivo contra infecciones de herpes genital y herpes zoster mientras que valaciclovir actúa también en infecciones causadas por herpes simplex y varicella-zoster, y en forma profiláctica contra CMV (Balfour y col, 1999). El penciclovir (9-(4-hidroxi-3-hidroximetil-1-butil) guanina) ha sido aprobado sólo como una formulación tópica para el tratamiento de herpes labial, mientras que su prodroga, famciclovir, fue desarrollada mejorando su adsorción oral. Tanto el ganciclovir, como el cidofovir ((S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) citosina) y el foscarnet (fosfonoformato, PFA) fueron autorizados para el tratamiento de retinitis por CMV en pacientes con SIDA (De Clercq, 1996; Whitley y col, 1997; Cohen Stuart y col, 1998). En la Tabla 1 se presentan las drogas actualmente aprobadas por la FDA ( Food and Drug Administration, USA) para el tratamiento de las infecciones herpéticas y los efectos colaterales descritos. Considerando los rasgos adversos para la salud que ejercerían los análogos de nucleósidos y también la necesidad de combatir las resistencias a las drogas, llegaríamos a la conclusión que las futuras drogas antiherpéticas deberían tender a expandirse en el área de los no-nucleósidos. Sin embargo, hasta la fecha ha sido escaso el real progreso en su desarrollo. Una excepción es el foscarnet, análogo de pirofosfato e inhibidor de la DNA polimerasa viral y que está aprobado para el tratamiento de las infecciones con CMV, y HSV y VZV resistentes al ACV. Pero aunque este compuesto no es un nucleósido comparte como blanco una enzima en común con los análogos de nucleósidos, la DNA polimerasa, y se ha visto resistencia cruzada (Balfour,1999; Cohen Stuart y col, 1998; Mertz, 1997; Crumpacker,1989).

<b>Droga antiviral</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Efectos colaterales</b>
<b>Idoxiuridina (1962)*</b>	Tópico HSV	-
<b>Trifluridina (1964)</b>	Tópico HSV	-
<b>Vidarabina (1972)</b>	Tópico y sistémico HSV (en desuso)	-
<b>Aciclovir (1983)</b>	Tópico y sistémico HSV- VZV	Nefropatías reversibles, trastornos gastrointestinales, encefalitis, flebitis, erup- ción, cefaleas
<b>Ganciclovir (1989)</b>	Sistémico CMV	Supresión medular (granulocitopenia), insufi- ciencia renal,
<b>Foscarnet (1991)</b>	HSV y VZV resistencia a aciclovir; CMV retinitis	Insuficiencia renal, hipocal- cemia, nauseas, vómitos
<b>Cidofovir (1996)</b>	Sistémico CMV retinitis	Nefrotoxicidad
<b>Penciclovir (1996)</b>	Tópico HSV	-
<b>Famciclovir (1997)</b>	Sistémico HSV-VZV	Cefaleas, nauseas, vómitos
<b>Valaciclovir (1997)</b>	Sistémico HSV-VZV, profilaxis contra CMV	idem ACV

**Tabla 1: Drogas aprobadas para el tratamiento de las infecciones herpéticas. \*( ) Año de aprobación por FDA de la droga.**

### **Antivirales naturales**

Ante la necesidad de encontrar nuevos antivirales los recursos naturales han sido y son una fuente constante de búsqueda y evaluación de actividad biológica. Numerosos estudios experimentales muestran actividades antimicrobianas de compuestos obtenidos de plantas (Summerfield y col, 1997; Wigg y col, 1996; Montanha y col, 1995; Hayashi y col, 1994, 1993, 1992; Barnard y col, 1993; Amoros y col, 1992; Garcia y col, 1990,1995; Franz, 1989; Fukuchi y col, 1989; Renard-Nozaki y col, 1989).

Debemos tener en cuenta dos factores distinguibles entre los productos naturales y los químicamente sintéticos, principalmente la diversidad molecular y la funcionabilidad biológica. Es universalmente reconocida que la diversidad molecular de los compuestos naturales excede las combinaciones empíricas, las cuales a pesar de los considerables progresos están aún en un avance limitado.

En particular, un área rica en posibilidades dentro de los compuestos naturales con probable acción antiviral está representada por los organismos marinos. A partir de los años 80 el potencial oceánico se puso en evidencia con el hallazgo de sustancias bioactivas extraídas de plantas marinas y animales invertebrados (Scheuer, 1995, 1989; Beutler y col, 1993). La mayoría de los compuestos inicialmente descubiertos no fueron efectivos para tratamientos de enfermedades, pero algunos mostraron importantes propiedades bioquímicas que han influenciado en nuestro conocimiento. Así por ejemplo, durante este período se encontraron moléculas marinas tales como manoalide y el ácido okadaico. El manoalide es un terpenoide, aislado en Hawaii y California de la esponja *Luffariella variabilis*; fue la primera sustancia que inhibía selectivamente la fosfolipasa A<sub>2</sub>, enzima involucrada en muchas enfermedades inflamatorias. El ácido okadaico, un poliéter cíclico aislado de la esponja *Halichondria okadai*, es un inhibidor altamente selectivo de la enzima serina/treonina fosfatasa, utilizado para probar procesos de fosforilación básica (König y col, 1995). Literalmente, cientos de metabolitos bioactivos han sido subsecuentemente descubiertos. Actualmente, tanto en Estados Unidos como en Japón, existe un mayor interés y un amplio programa de investigación, sin embargo debido a competencias y secretos en la industria farmacológica es habitualmente difícil enterarse de la existencia de drogas nuevas promisorias y determinar cuántas de origen marino están corrientemente en desarrollo (Fenical, 1997).

### **Polisacáridos sulfatados como antivirales**

La actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados ha sido reconocida hace muchos años. Los polisacáridos son un grupo complejo de moléculas que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son conocidos por sus amplias y variadas propiedades fisicoquímicas, las cuales los hacen aptos para diferentes aplicaciones en el campo de la medicina y farmacología. Han mostrado ser útiles por su actividad inmunomoduladora y antitumoral, por su interferencia en el sistema de coagulación y en procesos inflamatorios, en dermatología, en programas dietarios (disminuyen el colesterol y glucemia plasmática), además de afectar el crecimiento viral (Wong y col, 1994; Franz y col, 1989; Baba y col, 1988). Entre las fuentes naturales donde los podemos hallar constituyendo la pared celular se encuentran las algas, y de acuerdo al tipo, se han aislado distintos polisacáridos con

actividad antiviral. Ya en 1974, polisacáridos obtenidos de dos algas rojas, *Crytosiphonia woodii* y *Farlowia mollis*, exhibieron actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2, virus vaccinia y VSV (Dieg y col, 1974; Richards y col, 1978). En años recientes un grupo de investigadores, siguiendo la sugerencia de De Clercq (1986), demostraron que la heparina y otros polisacáridos eran inhibidores selectivos de la replicación de HIV-1 en cultivos celulares (Hayashi y col, 1996; Sekine y col, 1995; Witvrouw y col, 1994a). Posteriormente, esta acción inhibitoria se probó contra un espectro amplio de virus envueltos como CMV, virus influenza A, virus respiratorio sincicial ( Hashimoto y col, 1996; Witvrouw y col, 1994a González y col, 1987 ) y contra algunos virus desnudos como el virus de la encefalomiocarditis y virus de la hepatitis A (S. Girond y col, 1991), tanto con genoma DNA como RNA. Del alga roja *Schizymenia pacifica* se aisló un carragenano inhibidor de la transcriptasa reversa (Nakashima y col, 1987), también se han aislado galactanos sulfatados activos contra HIV, HSV, y otros virus envueltos a partir de las algas rojas *Schizymenia dubyi* (Bourgougnon y col, 1993) y *Aghardiella tenera* (Witvrouw y col, 1994b). A partir de algas pardas se han extraído principalmente fucanos sulfatados con capacidad de inhibir al virus de la hepatitis B (Venkateswaran y col, 1989) y al HIV (Beress y col, 1993).

Las algas rojas contienen grandes cantidades de polisacáridos en su pared celular, la mayoría de los cuales son galactanos sulfatados (Cases y col, 1992). Estos galactanos están generalmente constituidos por unidades repetidas alternadamente de uniones 1,3  $\alpha$ -galactopiranososa y 1,4  $\beta$ -D-galactopiranososa y difieren en el nivel y patrón de sulfatación, en la sustitución de metoxil y/o grupos piruvatos y otros azúcares tales como manosa, xilosa . También difieren en el contenido de 3,6-anhidrogalactosa y la configuración de los residuos de 1,3- $\alpha$ -galactopiranososa. Entre estos galactanos, se encuentran los carragenanos que están ampliamente utilizados en la industria alimenticia y en biotecnología como gelificante o espesante. Ellos comprenden un amplio grupo de estructuras y pueden ser divididas en dos familias: la familia- $\kappa$ , definida por la presencia de un grupo sulfato-C4 en la unidad  $\beta$ -D, y formada por carragenanos- $\kappa/\iota$  y los carragenanos- $\mu/\nu$ , y la familia- $\lambda$ , caracterizada por un grupo sulfato-C2 y constituida por todas las variedades de estructuras- $\lambda$  (Painter, 1983). En el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales se inició en los últimos años un estudio en colaboración con el grupo dirigido por el Dr A. Cerezo, del Departamento de Química Orgánica, a fin de estudiar la actividad

antiviral en distintos polisacáridos sulfatados extraídos de algas de las costas patagónicas. Así se estudiaron xilomananos y xilogalactanos obtenidos a partir de *Nothogenia fastigiata* (E.B.Damonte y col, 1994, 1996), galactanos extraídos de *Pterocladia capillacea* (C.A.Pujol y col, 1996), fucanos presentes en *Lathesia difformis* (Feldman y col, 1999). Todos estos compuestos mostraron distinto grado de efectividad como inhibidores de la multiplicación de herpesvirus en células Vero.

Dentro de este marco y ante la necesidad de encontrar compuestos con mejores perspectivas terapéuticas, en este trabajo de tesis se presenta la caracterización de la actividad antiherpética *in vitro* e *in vivo* de distintos tipos de carragenanos obtenidos a partir del alga roja *Gigartina skottsbergii*.

**B**

## **OBJETIVO GENERAL**

- Obtención de nuevos compuestos de origen natural con propiedades antivirales selectivas que representen una alternativa a las drogas actualmente en uso.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral in vitro de los diferentes tipos estructurales de carragenanos extraídos a partir del alga patagónica *Gigartina skottsbergii* y de sus derivados.
- Caracterización de la actividad antiherpética y del modo de acción de los compuestos con mayor efecto inhibidor seleccionados en la etapa anterior.
- Estudio de la capacidad de estos compuestos de inducir resistencia antiviral in-vitro.
- Determinación de la acción protectora in vivo en un modelo animal de infección vaginal con HSV-2.

MATERIAL  
Y  
MÉTODO

## 1. Extracción y fraccionamiento de los carragenanos

La extracción y el fraccionamiento de los carragenanos y la obtención de sus derivados ciclados por tratamiento alcalino fueron realizados por el grupo de trabajo dirigido por el Dr Alberto S. Cerezo, del Departamento de Química Orgánica (FCEN- UBA). A continuación se describe brevemente el proceso realizado.

Las muestras de *Gigartina skottsbergii* se recolectaron en Bahía Camarones (Provincia de Chubut, Argentina) y fueron clasificadas en el Instituto Patagónico Nacional (Puerto Madryn, Chubut ). Los carragenanos fueron extraídos con agua a temperatura ambiente, los residuos se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se diluyó en 3 volúmenes de isopropanol. Los polisacáridos se disolvieron en agua (concentración final 0,25%) y KCl finamente dividido fue agregado en pequeñas porciones con constante agitación mecánica, incrementando la concentración en intervalos de 0,01-0,10 M cada vez. Después de cada incorporación se continuó con la agitación por 16 h para asegurar el equilibrio del sistema, el límite superior de KCl fue 2,00 M. Los precipitados y las soluciones residuales se dializaron, concentraron y liofilizaron. Las fracciones  $1C_1$ ,  $1C_2$  y  $1C_3$ , y  $1T$ ,  $1T_1$ ,  $1T_2$  y  $1T_7$  se obtuvieron de los estadios cistocárpicos (C) y tetraspóricos (T), respectivamente.

Las muestras (1,0-1,5 g ) de cada fracción se disolvieron en agua (500 ml ) y se les incorporó  $\text{NaBH}_4$  (50 mg ) para reducir los grupos terminales de la cadena. Después de 24 h a temperatura ambiente se le agregó  $\text{NaOH}$  3M (250 ml ) y mayor cantidad de  $\text{NaBH}_4$ . La solución se calentó a  $80^\circ\text{C}$  hasta obtener una cantidad constante de 3,6-anhidrogalactosa. Luego la solución se enfrió a temperatura ambiente, se dializó, se concentró y se liofilizó. El tratamiento alcalino de los carragenanos  $1C_{1-3}$  produjo los correspondientes derivados ciclados  $1C_1T$ ,  $1C_2T$  y  $1C_3T$ , mientras que el tratamiento de los carragenanos  $1T_1$ ,  $1T_2$  y  $1T_7$  originó los derivados  $1T_1T_1$ ,  $1T_2T_1$  y  $1T_7T_1$ , respectivamente.

Como consecuencia de la autohidrólisis de las fracciones T-i (insolubles en 0,6-2,0 M KCl, que incluyen  $1T$ ,  $1T_1$ ,  $1T_2$  y  $1T_7$ ) se obtuvieron siete oligosacáridos sulfatados cuyo grado de polimerización está comprendido entre 2 a 8, estas fracciones fueron denominadas  $TA_6$ ,  $TA_7$ ,  $TA_8$ ,  $TA_{12}$ ,  $TA_{13}$ , 26H y 35H.

## **2. Células**

Las células Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), HEp-2 (carcinoma epitelial de laringe humano) y CV-1 (riñón de mono verde africano *C. aethiops*) fueron crecidas en medio mínimo esencial Eagle (MEM) (GIBCO,USA) suplementado con 5% de suero de ternera inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Para el medio de mantenimiento (MM) la concentración de suero fue reducida a 1,5%.

Los cultivos de astrocitos se obtuvieron como cultivos primarios a partir de cerebro de ratón. Ratones OF1 (Iffa-Credo, Lyon, Francia) de 1-3 días de vida fueron decapitados y sus cabezas lavadas enteramente con alcohol etílico 96°. Se les abrió el cráneo y se procedió a retirarles el cerebro lavándolos posteriormente con PBS. Luego los cerebros fueron finamente cortados con tijeras y las células disgregadas por tripsinización durante 15 min a 37°C. Las células fueron centrifugadas a 1000 x g, suspendidas en MEM 10% suero fetal bovino, sembradas a una densidad de 10<sup>5</sup> células/ml e incubadas por una semana a 37°C. Los cultivos se pasaron una vez, por tripsinización, y se incubaron a 37°C durante 3-4 días antes de infectarlos.

La línea celular diploide PH (fibroblastos de prepucio humano) fue provista por el laboratorio de Virología del CEMIC dirigido por la Dra. Carballal. Se crecieron en MEM con 10% de suero fetal bovino.

## **3. Virus**

### **a. Cepas**

Se utilizaron seis cepas de HSV-1 y tres de HSV-2. HSV-1 cepa F, HSV-2 cepa G y cepa MS se obtuvieron de American Type Culture Collection y se usaron como cepas de referencia. B2006 y Field fueron cepas HSV-1 TK<sup>-</sup> (deficientes en timidina-quinasa) cedidas por el Prof. Dr. E. De Clercq (Instituto Rega, Bélgica). Las cepas de HSV-1 1213 LCR/94, 374 LCR/94 y 1180 BE/94, y la cepa 244 BE/94 (HSV-2) fueron aislamientos clínicos obtenidos a partir de pacientes infectados provistos por el Instituto Nacional de Microbiología Carlos Malbrán (Buenos Aires, Argentina). Los aislamientos clínicos se sometieron sólo a dos pasajes en fibroblastos a partir de su aislamiento.

También se utilizó citomegalovirus humano (CMV) cepa Davis.

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

Los stocks de HSV-1 y HSV-2 fueron preparados y titulados por plaqueo directo sobre células Vero. Se infectaron monocapas de células Vero con una multiplicidad de infección ( $m$ ) que osciló entre 0,1 y 0,01 UFP/célula. Se dejó adsorber por 1 h a 37 °C. Luego se procedió a retirar el inóculo y se cubrieron las células con MM. Transcurridas 24 h y observando un ataque del 90% de la monocapa por la acción citopática viral, se lisaron las células mediante dos ciclos de congelamiento y descongelamiento. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación durante 15 min a 1000 g y se guardó el sobrenadante a -70°C hasta su posterior uso. Los títulos virales obtenidos oscilaron entre  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  UFP/ml.

El stock de CMV se preparó siguiendo igual procedimiento en células PH, pero recogiendo las células infectadas a los 7-8 días p.i.

#### **c. Marcación de viriones con radioisótopos y su purificación**

Se infectaron monocapas de células Vero con HSV-1 cepa F ( $m : 0,1$ ). Luego de 1 h de adsorción a 37 °C, se descartó el inóculo y se adicionó MM. Se incubó durante 3 h más a 37 °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 [ $^{35}$ S]-L-metionina (10  $\mu$ Ci/ml) (NEN, actividad específica 1250 Ci/mmol). Cuando se observó un 85% de la monocapa redondeada por el efecto citopático viral, se procedió a retirar el medio y lavar las células con buffer TRIS 0,01 M, NaCl 50 mM, se resuspendieron las células en 1,3 ml del mismo buffer y se las sometió a dos procesos de congelamiento y descongelamiento para liberar el virus producido. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación 15 min a 5000 rpm y el sobrenadante se sembró en un colchón de sacarosa 30% en buffer TRIS 50 mM, NaCl 0,85%. Se ultracentrifugó 3 h a 40.000 rpm a 4°C en un rotor Beckman SW 55 Ti. El sedimento se resuspendió en PBS con 1,5 mg/ml de seroalbúmina bovina (BSA) por sonicación.

#### **4. Ensayos de la citotoxicidad**

##### **a. Efecto sobre células confluentes**

###### Recuento de células viables

Monocapas confluentes de células Vero se incubaron en presencia de distintas concentraciones de los compuestos en MM durante 48 h a 37°C. Cada concentración se ensayó por duplicado. Luego, se retiró el medio, las células se tripsinaron y se determinó el número de células viables por el método de exclusión del azul Tripán. Como controles se utilizaron células que recibieron idéntico tratamiento pero en ausencia de los compuestos. La concentración citotóxica 50% ( $CC_{50}$ ) fue definida como la concentración del compuesto capaz de reducir el número de células viables en un 50% respecto al control.

###### Método del MTT ([ 3-4,5-dimetiltiazol-2-yl ]-2,5-difenil bromuro de tetrazolio)

Células Vero crecidas en microplacas de 96 pocillos se incubaron con diferentes concentraciones de los compuestos por triplicado por 48 h a 37 °C . Luego, sin retirar el medio se incorporaron 10 µl de MTT (concentración final : 5 mg/ml ) por pocillo y se dejó actuar durante 2 h a 37°C. Luego se retiró el medio y se incorporaron 200 µl de etanol 96° en cada pocillo, se agitó vigorosamente para asegurar la solubilización total del formazan (producto azul obtenido como consecuencia del clivaje del MTT por enzimas mitocondriales ) y se mantuvo durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la densidad óptica en cada pocillo con una longitud de referencia de 690 nm y de prueba de 560 nm. A partir de los datos obtenidos se calculó la  $CC_{50}$  como se describió en el ítem anterior.

###### Síntesis de proteínas celulares

Monocapas confluentes de células Vero se incubaron durante 48 h a 37 °C con MM conteniendo distintas concentraciones de cada compuesto, por duplicado, utilizando como control MM. Luego se retiró el medio, se lavó con PBS y se cubrió con 0,2 ml de MEM sin metionina conteniendo 1µCi /ml de [<sup>35</sup> S ]-metionina (New England Nuclear, actividad específica 1175 Ci/mmol) y 2 % de suero bovino dializado. Después de 1 h a 37 °C se detuvo la incorporación agregando en cada vial 1 ml de PBS frío. Se descartó el

sobrenadante y se incorporó 1 ml de ácido perclórico 1,5 % que se dejó actuar por 15 min a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS frío, lisándose finalmente las monocapas con 0,2 ml de SDS 1% en OHNa 0,1 N y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

#### **b. Efecto sobre la proliferación celular**

Se sembraron células Vero en viales ( $4 \times 10^4$  cél/ml), luego de 3 h de incubación a 37 °C para permitir la adhesión de las células a la superficie, se agregaron distintas concentraciones de los compuestos al medio de crecimiento. Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24, 48 y 72 h, procediéndose posteriormente a la tripsinización y conteo celular para cada período, utilizando el método de exclusión del azul Tripan.

### **5. Determinación de actividad antiviral**

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

Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos con 50 UFP/pocillo de HSV-1 y HSV-2 en ausencia o presencia de distintas concentraciones de los compuestos. Se ensayó cada dilución por duplicado. Luego de 1h de adsorción a 37°C, se descartó el inóculo, y las células se cubrieron con MM conteniendo 0,7 % de metilcelulosa. Luego de 2 días de incubación a 37 °C, se procedió a contar las placas previa tinción con cristal violeta. La concentración inhibitoria 50% ( $CI_{50}$ ) fue definida como la concentración del compuesto requerida para reducir el número de placas en un 50%.

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

Se infectaron monocapas de células Vero, PH ó astocitos murinos con HSV-1 ó HSV-2 (m : 0,1), en ausencia o presencia de distintas concentraciones de los compuestos. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrieron las monocapas con MM incubándolas durante 24 h a 37°C. Luego los cultivos se sometieron a 2 ciclos de

congelación y descongelación para romper las células. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación durante 15 min a 1000 g y se tituló el virus del sobrenadante mediante formación de placas en células Vero. Se calculó la  $CI_{50}$  como la concentración del compuesto que redujo al 50% el rendimiento de virus.

### **c. Inhibición del efecto citopático**

Se infectaron monocapas de células PH con CMV. Luego de 1h de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrió con MM incubándose 10 días a 37°C con observación diaria del efecto citopático. La  $CI_{50}$ , concentración que redujo al 50% el efecto citopático, se calculó según el método de Reed Muench.

## **6 . Determinación de la actividad virucida**

Una suspensión de HSV-1 cepa F conteniendo  $4,2 \times 10^4$  UFP se incubó durante 1,5 h a 37 °C en presencia de igual volumen de distintas concentraciones de los compuestos. Como control se incubó en las mismas condiciones, la suspensión viral con igual volumen de MM. Luego se realizaron diluciones de las distintas mezclas y se procedió a su titulación por UFP en células Vero, tomando en cuenta que en las diluciones ensayadas sobre las células los compuestos no ejercieran efecto antiviral. Se calculó para cada compuesto el porcentaje de infectividad remanente respecto del control.

## **7. Acción de los compuestos por pretratamiento celular**

Monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pocillos fueron tratadas con distintas concentraciones de los carragenanos, luego de 2 h a 37°C, se retiró el medio, las células fueron lavadas y se procedió a infectarlas con HSV-1 cepa F, y a las 48 h se hizo el recuento de placas.

## **8. Influencia del tiempo de adición de los compuestos sobre la actividad antiviral**

Se infectaron monocapas de células Vero con HSV-1 cepa F (m: 0.1) y se agregaron los carragenanos (20 µg/ml) simultáneamente (tiempo 0) o a distintos tiempos p.i.. Como control se utilizó un cultivo sin droga. Se determinó para cada caso el rendimiento viral a las 24 h p.i. por un ensayo de UFP.

## **9. Acción de los compuestos sobre la adsorción**

### **a . Adición de los compuestos durante o después de la adsorción en un ensayo de plaqueo directo**

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

Tratamiento 1: Se infectaron células en presencia de los compuestos y luego de 1 h de adsorción a 4°C se retiró el inóculo, las células fueron lavadas con PBS y se las cubrió con medio de plaqueo.

Tratamiento 2: Los compuestos estuvieron presentes en la adsorción y posteriormente en el medio de plaqueo.

Tratamiento 3: Los compuestos estuvieron ausentes en la adsorción, fueron incorporados posteriormente en el medio de plaqueo.

Tratamiento 4: Los compuestos estuvieron ausentes en la adsorción y en el medio de plaqueo (control).

En todos los tratamientos los cultivos se incubaron 48 h a 37°C y posteriormente se determinó el número de placas .

### **b . Efecto de los compuestos en la cinética de adsorción viral**

#### **Determinada por infectividad**

Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F (m : 1) en ausencia o presencia de los compuestos (20 µg/ml ) y se incubaron durante 0, 15, 30, 45 y 60 min a 4°C. Luego se

lavaron las células 3 veces con PBS frío, lisándolas posteriormente por congelamiento y descongelamiento (2 ciclos). Se centrifugó para eliminar restos celulares y en el sobrenadante se determinó la cantidad de virus adsorbido a las células por UFP.

#### **Determinada por la unión de viriones radiactivos**

Células Vero fueron pretratadas por 1 h con PBS conteniendo 1% de suero de ternera, 0,1% de glucosa y 0,5 % de BSA para evitar uniones inespecíficas. Luego se infectaron con 50 µl de HSV-1 marcado con [<sup>35</sup>S]-L-metionina (título viral : 6,5 x 10<sup>6</sup> UFP /ml, 5,3 x 10<sup>6</sup> cpm /ml ) en ausencia o presencia de los compuestos y se incubaron a 4°C durante 0 y 60 min. Posteriormente se retiró el inóculo y se lavaron las monocapas 3 veces con PBS frío. Luego se agregaron 0,1 ml de OHNa 0,1N, SDS 1 % y se lo dejó actuar durante 15 min, colocando posteriormente 1 ml de líquido de centelleo y se contó la radioactividad unida a la célula en un contador de centelleo líquido.

#### **10 . Efecto de los polisacáridos sobre la internalización viral**

Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F (m : 1), realizándose la adsorción a 4 °C durante 1h. Luego se lavaron las células 3 veces con PBS frío y se incubaron a 37°C en presencia de 20µg/ml de los compuestos, o en ausencia de ellos como control. A distintos tiempos post-adsorción se lavaron las células 2 veces con PBS frío, se incorporó 0,1 ml de buffer citrato (ácido cítrico 40 mM, KCl 10 mM, NaCl 135 mM, pH 3,0 ) se lo dejó actuar 1 min permitiendo que el bajo pH inactive el virus unido pero que aún no ha penetrado. Se realizaron 3 lavados con PBS, posteriormente se adicionó 0,1ml de tripsina y cuando se observó que la totalidad de la monocapa estaba levantada se incorporó PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) 2mM en PBS conteniendo 3 % de BSA para bloquear la acción de la tripsina. Se centrifugó 5 min a 800 rpm, se lavaron las células 2 veces con PBS conteniendo 3% de BSA y luego se resuspendieron en MM. Se realizaron diluciones seriadas al décimo de la suspensión celular y se inocularon sobre monocapas de células Vero. Después de 2 h a 37°C se cubrió con medio de plaqueo y se revelaron las placas a las 48 h de incubación.

## **11. Acción de los carragenanos sobre la síntesis de proteínas virales**

Se infectaron células Vero con HSV-1 (m: 10 ), luego de 1h de adsorción a 37°C se retiró el inóculo y se agregó MM conteniendo 20 µg/ml de los compuestos. A distintos intervalos p.i, las monocapas fueron lavadas y se agregó MM libre de metionina, conteniendo 10 µCi/ml de [<sup>35</sup> S]-metionina, se incubaron las células entre 2-4, 6-8 y 10-12 h p.i a 37°C. Posteriormente las monocapas fueron despegadas con varilla de vidrio previa suspensión con PBS y centrifugadas durante 5 min a 10.000 rpm, y las células fueron lisadas con TRIS-HCl 0,06M, pH 6,8, SDS 5%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 2% y azul de bromofenol 0,05%.

Las células lisadas fueron sometidas a una electroforesis en gel 12% de poliacrilamida-SDS. Los marcadores de peso molecular usados fueron de 97, 68, 43 y 25 KDa (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). Los geles se revelaron por fluorografía.

## **12. Medida de la expresión de GFAP, de tubulina y de proteínas virales en astrocitos**

Monocapas de astrocitos, crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 pocillos, se infectaron con HSV-1 cepa F (m: 0,1). Los compuestos se agregaron durante la adsorción y con posterioridad, utilizando como controles células infectadas en ausencia de los compuestos y células no infectadas. A las 24 h p.i. se lavaron las monocapas 3 veces con 1 ml de PBS, y se procedió a fijar las células con metanol a -20°C por 10 min. Posteriormente se lavaron nuevamente 3 veces con PBS y se incorporó 0,5 ml de una solución 1: 150 de IgG de cabra purificada por DEAE y se incubó 15 min a 37°C. Sin retirar el medio se levantaron los cubreobjetos y se incubaron con IgG de conejo purificada anti HSV-1 ó Ig G de ratón anti-GFAP (SIGMA Chemical Co, USA) ó IgG de ratón anti-tubulina (SIGMA Chemical Co, USA) en cámara húmeda durante 30 min a 37 °C. Se lavaron las células 3 veces con PBS y se incubaron con IgG de cabra anti IgG de conejo ó de ratón marcada con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Chemical Co.). Se incubó 30 min a 37°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 min 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.

### **13 . Ensayo de la actividad anticoagulante**

Se midió el tiempo de trombina (TT) para varias concentraciones de los polisacáridos sulfatados utilizando plasma humano. Se mezclaron 170  $\mu$ l de plasma humano con 30  $\mu$ l de la solución a probar, las mezclas se incubaron durante 2 min a 37 °C. Luego se agregó trombina bovina (Sigma Chemical Co, 7,5 U/ml, 100  $\mu$ l ) y se registró el tiempo de coagulación.

### **14. Selección de variantes de HSV-1 en presencia de carragenano**

Se realizaron pasajes sucesivos de HSV-1 cepa F (m: 0,1) en monocapas de células Vero en presencia de concentraciones crecientes de 1C<sub>3</sub> , presente durante y después de la infección. Se comenzó con una concentración del compuesto dos veces mayor que su CI<sub>50</sub> , duplicándola hasta el pasaje 4, desde el pasaje 5 hasta el pasaje 18 la concentración se mantuvo en 32  $\mu$ g/ml, finalizando los últimos pasajes con 64  $\mu$ g/ml. Se incubaron las células durante un período comprendido entre 24 a 72 h p.i, hasta que la monocapa manifestaba una ACP entre 70 a 90%, procediendo a lisar las células con dos ciclos de congelamiento y descongelamiento. Con el fin de eliminar los restos celulares, se centrifugó el lisado celular durante 15 min a 1000 rpm, conservando el sobrenadante a -70°C. Se determinó el título y la CI<sub>50</sub> de cada pasaje utilizando el método de reducción en el número de placas. En forma similar se realizaron pasajes sucesivos de HSV-1 en presencia de 1T<sub>1</sub>. Cepas resistentes al ACV se obtuvieron de igual manera que para 1C<sub>3</sub> , utilizando una concentración equivalente a la CI<sub>50</sub> para los dos primeros pasajes, se la duplicó para el pasaje 3 y 4, en el pasaje 5 se utilizó 0,1  $\mu$ g/ml y 1,0  $\mu$ g/ml en el último.

Como control se realizaron pasajes sucesivos de HSV-1 cepa F sin compuesto, determinando para cada uno de ellos su título y su CI<sub>50</sub> por el método de reducción de placas.

Para la obtención de clones a partir de los pasajes realizados, monocapas de células Vero crecidas en placas de 6 pocillos se infectaron con el pasaje seleccionado. Después de 1h de

adsorción, se retiró el inóculo y se cubrió con agarosa 1,2% y MM en partes iguales, incubando por 72 h a 37°C, luego se incorporó rojo neutro 2% mezclado en partes iguales de agarosa 1,2% y MM. Se cubrió la placa con papel metálico y se mantuvo a 37°C durante 2 h, con la ayuda de un transiluminador se procedió a picar los clones aislados, cada uno se diluyó en MM, se los sometió a una vigorosa agitación y a dos ciclos de congelamiento y descongelamiento.

Para la amplificación de los clones se infectaron células Vero con cada clon seleccionado; después de la adsorción 1h a 37°C, se descartó el inóculo y se cubrió con MM, incubando entre 24-48 h a 37°C hasta desarrollo de ACP en 80% de la monocapa. Posteriormente se procedió a realizar dos ciclos de congelamiento y descongelamiento, se retiraron los restos celulares por centrifugación durante 15 min a 1000 rpm y el sobrenadante se conservó a -70°C. Se determinó el título de cada clon amplificado por el método de formación de placas.

#### **15. Tinción de Giemsa para observación del efecto citopático**

Se infectaron monocapas confluentes de distintos tipos de líneas celulares crecidas sobre cubreobjetos con 1, 10 y 100 UFP de variantes virales sinciciales y el stock original de HSV-1 cepa F. Luego de 1h a 37 °C se retiró el inóculo y se cubrió con MM. A las 24 y 48 h p.i. se tiñeron las monocapas con Giemsa, previa fijación con metanol.

#### **16. Virulencia para ratón adulto y lactante**

Se inocularon: a) ratones OF1 entre 4 a 6 semanas de vida, por vía intraperitoneal con 0,1 ml de distintas diluciones de HSV-1; b) ratones lactantes OF1 de 2-3 días de edad por vía intracerebral, con 0,02 ml de distintas diluciones de virus. Los animales se estudiaron durante 30 días, registrándose morbilidad y mortalidad. La dosis letal 50 % (DL<sub>50</sub>) se calculó utilizando el método de Reed y Muench. Paralelamente se infectaron monocapas con células Vero para determinar el título de las cepas empleadas por UFP, y así calcular la relación UFP/DL<sub>50</sub>.

## **17. Modelo de infección vaginal**

Se infectaron ratones hembras OF1 y BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, por vía vaginal con 0,05 ml de diluciones seriadas decimales correspondientes a las cepas G, MS y 244 BE/94 de HSV-2. Paralelamente se infectaron monocapas de células Vero para determinar el título de las cepas empleadas. Cinco días antes de la inoculación, los animales fueron inyectados subcutáneamente, con 0,020 ml de acetato de medroxiprogesterona (25mg/ml en PBS) (Medrosterona, Gador, Argentina), este tratamiento mostró incrementar la susceptibilidad de los ratones a la infección con HSV-2 (Zacharopoulos y col, 1997; Maguire y col, 1998; Bourne y col, 1999). Durante 3 semanas luego de la inoculación se siguió la evolución de la morbilidad y mortalidad de los animales inoculados.

Para el ensayo de la actividad antiviral de los carragenanos, cinco días después del tratamiento con medroxiprogesterona, se administró por vía intravaginal 0,1 ml del carragenano 1C<sub>3</sub> ó 1T<sub>1</sub> (1% en PBS) en diferentes dosis ( 5 min pre-infección, 2h post-infección y 24 h post-infección ). Se procedió a la inoculación intravaginal de  $1,6 \times 10^5$  UFP de HSV-2 cepa MS en un volumen de 0,05 ml. Los animales se examinaron durante 20 días clasificándolos como enfermos, si presentaban inflamación, lesiones o parálisis, y registrando la mortalidad. Al tercer día p.i se realizaron lavados vaginales con 100µl de PBS a todos los animales tratados y no tratados, las muestras se almacenaron a -70°C hasta titularlas en células Vero por UFP.

**RESULTAD**

# I. Evaluación de las actividades biológicas de los carragenanos y sus derivados

## I. 1. Características estructurales

Las diferentes fracciones de carragenanos aislados a partir de los estadios cistocárpico y tetraspórico del alga *Gigartina skottsbergii* fueron clasificadas de acuerdo a sus características estructurales como carragenanos  $\kappa/\iota$  ( $1C_1$  y  $1C_2$ ), carragenano  $\mu/v$  parcialmente ciclado ( $1C_3$ ) y carragenanos  $\lambda$  ( $1T$ ,  $1T_1$ ,  $1T_2$  y  $1T_7$ ) (Figura 3). Cuando estos compuestos fueron sometidos a un tratamiento alcalino se obtuvieron los correspondientes derivados ciclados ( $1C_1T$ ,  $1C_2T$ ,  $1C_3T$ ,  $1T_1T_1$  y  $1T_2T_1$  y  $1T_7T_1$ ), por ciclización de las unidades  $\alpha$ -D-galactosa 6-sulfato y 2,6 disulfato a unidades 3,6 anhidro-D-galactosa y 3,6-anhidro-D-galactosa-2 sulfato (Figura 3).

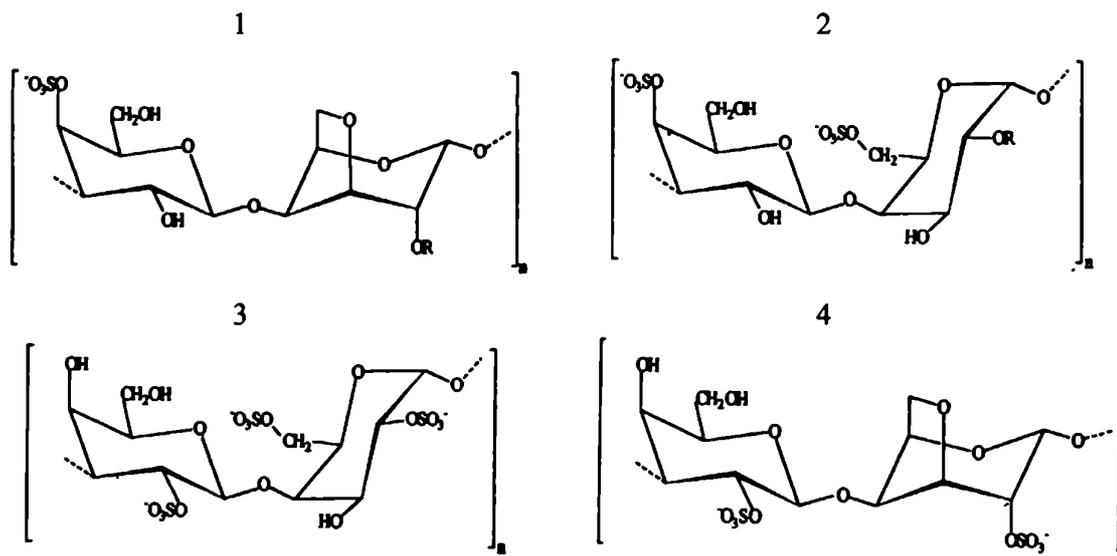


Figura 3: Estructura química de los carragenanos aislados de *G. skottsbergii*.

(1) R: H, carragenano- $\kappa$ ; R:  $SO_3^-$ , carragenano- $\iota$ . En carragenanos  $\kappa/\iota$  naturales algunas de las unidades 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactosa y 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactosa 2-sulfato están reemplazadas por unidades  $\alpha$ -D-galactosa 6-sulfato y  $\alpha$ -D-galactosa 2,6-disulfato. (2) R: H, carragenanos- $\mu$ ; R:  $SO_3^-$ , carragenanos- $v$ . Por ciclización parcial de los carragenanos  $\mu/v$  algunas de las unidades de  $\alpha$ -D-galactosa están reemplazadas por 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactosa y 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactosa 2-sulfato. (3) Carragenanos  $\lambda$ . (4) Carragenanos ciclados  $\lambda$ .

En la Tabla 2 se muestran las características analíticas de estos compuestos. El porcentaje de sulfatación para estos carragenanos oscila entre 22 y 40%, estando definidos sus pesos moleculares en un rango de 11.900 y 198.000.

Carragenano	Tipo	Relación molar Gal:3,6-An- Gal:sulfato	Sulfato (% SO <sub>3</sub> Na)	PM (kD)
1C <sub>1</sub>	κ/ι	1,00:0,64:1,32	33,1	75
1C <sub>2</sub>	κ/ι	1,00:0,62:1,20	31,4	124
1C <sub>3</sub>	parcialmente ciclado μ/ν	1,00:0,37:1,14	33,6	198
1T	λ	1,00:0,06:1,77	38,5	n.d.
1T <sub>1</sub>	λ	1,00:0,03:1,12	40,0	83
1T <sub>2</sub>	λ	1,00:0,03:1,20	39,2	121
1T <sub>7</sub>	λ	1,00:0,38:0,89	22,5	16
1C <sub>1</sub> T		1,00:0,72:1,36	34,5	73
1C <sub>2</sub> T		1,00:0,68:1,38	35,3	18
1C <sub>3</sub> T		1,00:0,62:1,12	31,4	112
1T <sub>1</sub> T <sub>1</sub>		1,00:0,88:1,72	35,9	66,6
1T <sub>2</sub> T <sub>1</sub>		1,00:0,77:1,62	35,8	17,6
1T <sub>7</sub> T <sub>1</sub>		1,00:0,41:0,95	26,8	11,9

**Tabla 2:** Análisis estructural de los carragenanos aislados de los estadios cistocárpicos y tetraspóricos de *Gigartina skottsbergii*.

## **I. 2. Actividad antiviral y citotoxicidad**

La actividad antiherpética fue determinada para todos los tipos de carragenanos por el método de reducción en el número de placas contra HSV-1 cepa F y HSV-2 cepa G, utilizando como sustancias de referencia el dextran sulfato de peso molecular 8000 (DS8000) y 500000 (DS500000) y la heparina. Dentro de los carragenanos naturales, los carragenanos- $\lambda$  1T<sub>1</sub>, 1T<sub>2</sub> y 1T<sub>7</sub> y el carragenano- $\mu/\nu$  1C<sub>3</sub> demostraron ser los más potentes inhibidores de herpesvirus, con un valor de CI<sub>50</sub> menor que 1  $\mu\text{g/ml}$  contra ambos serotipos de HSV (Tabla 3). Estos compuestos fueron inhibidores más efectivos en comparación con las sustancias de referencia (DS8000, DS500000 y la heparina). Los carragenanos  $\kappa/\iota$  1C<sub>1</sub> y 1C<sub>2</sub> fueron escasamente menos activos con una CI<sub>50</sub> entre 1,5 y 4,1  $\mu\text{g/ml}$ .

En general, los derivados ciclados obtenidos por tratamiento alcalino mostraron una menor actividad antiherpética con respecto a los compuestos naturales (Tabla 3). Esta disminución fue considerable (3-115 veces) para 1T<sub>2</sub>T<sub>1</sub>, 1C<sub>1</sub>T, 1C<sub>2</sub>T y 1C<sub>3</sub>T, sin embargo la actividad se mantuvo en el mismo nivel para 1T<sub>1</sub>T<sub>1</sub> y 1T<sub>7</sub>T<sub>1</sub>.

Para evaluar la citotoxicidad de todos los compuestos se midió la viabilidad celular por exclusión de azul Tripán luego de 48 h de incubación con distintas concentraciones de las drogas. No se observaron efectos citotóxicos en ningún caso hasta concentraciones de 1000  $\mu\text{g/ml}$ , excepto para 1T<sub>2</sub> que mostró un valor de la CC<sub>50</sub> de 650  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 3). A fin de evaluar la verdadera efectividad antiviral de los compuestos, se calculó para cada uno el índice de selectividad (IS) que es la relación CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>. Como puede observarse, el valor del IS fue para todos los carragenanos naturales similar o superior al obtenido para las sustancias de referencia, y aquellos compuestos muy activos (como 1C<sub>3</sub>, 1T<sub>1</sub>, 1T<sub>7</sub> y el derivado ciclado 1T<sub>1</sub>T<sub>1</sub>) mostraron IS >10<sup>3</sup> para ambos serotipos de HSV.

Compuesto	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	CI <sub>50</sub> (µg/ml)		IS	
		HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
1C <sub>1</sub>	>1000	2,3 ± 1,2	2,2 ± 0,3	>435	>461
1C <sub>2</sub>	>1000	4,1 ± 1,2	1,5 ± 0,4	>244	>667
1C <sub>3</sub>	>1000	0,7 ± 0,3	0,5 ± 0,1	>1334	>1961
1T	>1000	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1	>1429	>770
1T <sub>1</sub>	>1000	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1	>1334	>2500
1T <sub>2</sub>	650	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2	928	793
1T <sub>7</sub>	>1000	0,9 ± 0,2	0,6 ± 0,1	>1136	>1562
1C <sub>1</sub> T	>1000	6,5 ± 0,8	6,2 ± 0,9	>153	>161
1C <sub>2</sub> T	>1000	69,4 ± 9,9	50,1 ± 14,4	>15	>20
1C <sub>3</sub> T	>1000	64,4 ± 18,6	57,2 ± 10,2	>16	>17
1T <sub>1</sub> T <sub>1</sub>	>1000	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	>3846	>3704
1T <sub>2</sub> T <sub>1</sub>	>1000	2,2 ± 0,3	27,4 ± 10,6	>454	>36
1T <sub>7</sub> T <sub>1</sub>	>1000	0,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	>2128	>617
DS8000	>1000	2,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	>472	>990
DS500000	>1000	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,2	>833	>1010
Heparina	>1000	1,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1	>735	>476

**Tabla 3: Actividad antiviral y citotoxicidad de los carragenanos aislados de *G. skottsbergii*.**

Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE. CI<sub>50</sub>: concentración requerida para reducir al 50 % el número de placas. CC<sub>50</sub>: concentración requerida para reducir al 50 % el número de células viables. IS: índice de selectividad, CC<sub>50</sub> / CI<sub>50</sub>.

Por autohidrólisis de los carragenanos λ se obtuvieron siete fracciones puras de oligosacáridos sulfatados: TA<sub>6</sub>, TA<sub>7</sub>, TA<sub>8</sub>, TA<sub>12</sub>, TA<sub>13</sub>, 26H y 35H las cuales no demostraron tener actividad antiherpética (datos no mostrados), lo que indicaría que dicha actividad sería dependiente del peso molecular.

### **I. 3. Actividad anticoagulante**

Muchos polisacáridos sulfatados (incluyendo heparina y dextran sulfato) se caracterizan por sus notorias propiedades anticoagulantes. Por ello, se midió el tiempo de trombina (TT) para determinar la actividad anticoagulante de los carragenanos y sus derivados (Tabla 4).

Compuesto	TT (seg)				
	concentración (µg/ml)				
	0,5	5	50	100	200
1C <sub>1</sub>	15,7 ± 0,7	16,1 ± 0,5	23,0 ± 0,1	23,5 ± 0,1	30,9 ± 0,2
1C <sub>2</sub>	14,4 ± 0,2	15,8 ± 0,1	23,4 ± 0,6	26,0 ± 0,1	32,0 ± 0,2
1C <sub>3</sub>	16,1 ± 0,6	16,3 ± 0,6	25,9 ± 1,3	30,5 ± 0,6	37,5 ± 0,7
1T	20,0 ± 0,5	22,6 ± 0,1	56,8 ± 2,1	>180	>180
1T <sub>1</sub>	20,2 ± 0,7	33,7 ± 2,2	>180	>180	n.d.
1T <sub>2</sub>	22,4 ± 1,3	33,4 ± 0,7	>180	>180	n.d.
1T <sub>7</sub>	17,5 ± 0,1	16,9 ± 0,1	21,9 ± 0,6	25,8 ± 0,2	28,8 ± 0,7
1C <sub>1</sub> T	15,2 ± 0,3	15,0 ± 0,1	20,5 ± 0,7	20,1 ± 1,9	19,0 ± 0,1
1C <sub>2</sub> T	15,5 ± 0,8	15,4 ± 1,1	15,5 ± 1,3	16,2 ± 0,4	15,9 ± 0,3
1C <sub>3</sub> T	15,4 ± 0,6	16,3 ± 0,9	15,5 ± 0,1	14,8 ± 0,4	15,7 ± 0,1
1T <sub>1</sub> T <sub>1</sub>	16,9 ± 0,1	17,7 ± 0,4	24,4 ± 1,9	31,4 ± 0,3	34,5 ± 0,7
1T <sub>2</sub> T <sub>1</sub>	16,2 ± 0,7	16,5 ± 0,4	19,2 ± 0,6	20,6 ± 0,8	23,0 ± 0,7
1T <sub>7</sub> T <sub>1</sub>	16,1 ± 0,1	20,0 ± 0,7	43,4 ± 3,2	56,9 ± 1,4	>180
DS8000	18,3 ± 0,3	24,0 ± 2,1	30,1 ± 1,1	46,7 ± 0,9	>180
DS500000	35,6 ± 1,3	>180	>180	n.d.	n.d.
Heparina	>180	>180	n.d.	n.d.	n.d.

**Tabla 4: Actividad anticoagulante de los carragenanos aislados de *G. skottsbergii*.** TT para la muestra control sin compuesto: 15,6 seg. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE. n.d.: no determinado. TT: Tiempo de trombina en plasma humano.

El tratamiento del plasma con los carragenanos- $\kappa/\iota$ ,  $\mu/\nu$  y el carragenano  $\lambda$  1T<sub>7</sub> a concentraciones cercanas de la CI<sub>50</sub> (0,5-5  $\mu\text{g/ml}$ ) no mostró cambios significativos con respecto a los valores de TT (Tabla 4). A concentraciones 50-280 veces mayores que las CI<sub>50</sub> contra HSV-1 y HSV-2 el valor del TT solamente fue duplicado. Como se puede ver en la Tabla 4, los carragenanos lambda 1T, 1T<sub>1</sub> y 1T<sub>2</sub> mostraron un TT más prolongado que los carragenanos antes mencionados. Sin embargo, debe notarse que 1T, 1T<sub>1</sub> y 1T<sub>2</sub> tuvieron una actividad anticoagulante marcadamente reducida comparada con la heparina y el DS500000, ya que se requerían concentraciones 10-200 veces mayores para producir el mismo efecto.

Los derivados ciclados de todo tipo de carragenano no mostraron alteraciones significativas del TT, excepto para la fracción 1T<sub>1</sub>T<sub>1</sub> donde se observó dos veces incrementado su valor a una concentración de 100-200  $\mu\text{g/ml}$  y para 1T<sub>7</sub>T<sub>1</sub> que aumentó significativamente el TT a partir de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

En conclusión, el muestreo de las actividades biológicas ensayadas en los carragenanos naturales y sus derivados permitió detectar la presencia de compuestos de distinta estructura, con una muy selectiva actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2, carentes de significativas propiedades anticoagulantes. En base a los resultados obtenidos, se decidió caracterizar las propiedades antivirales de los polisacáridos más activos dentro de cada tipo estructural de carragenano. Para ello se eligió seguir trabajando con los compuestos 1T<sub>1</sub> ( $\lambda$ ), 1C<sub>3</sub> ( $\mu/\nu$ ) y 1C<sub>1</sub> ( $\kappa/\iota$ ).

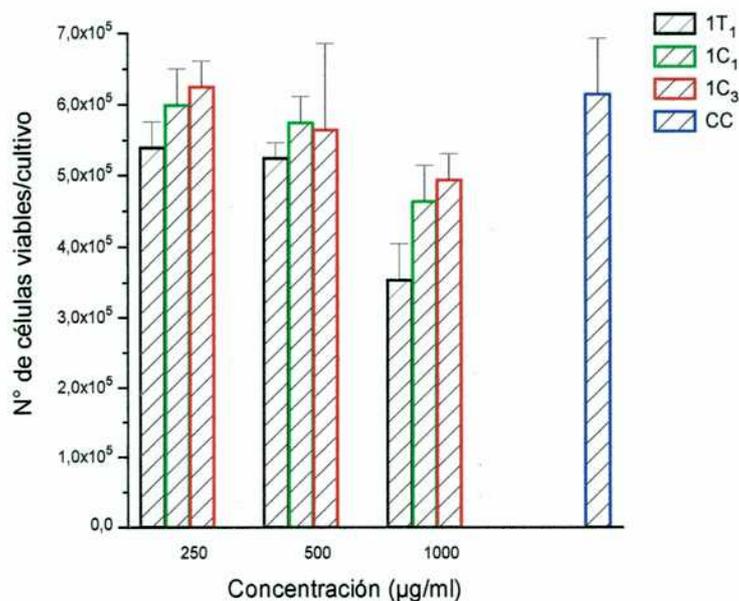
## II. Caracterización de la actividad antiviral y citotóxica de los carragenanos 1T<sub>1</sub>, 1C<sub>3</sub> y 1C<sub>1</sub> frente a diferentes parámetros experimentales

Para evaluar mejor el potencial citotóxico de estos compuestos se estudiaron sus efectos sobre células Vero confluentes y en proliferación mediante distintas metodologías.

### II. 1. Efecto sobre células confluentes

#### a. Recuento de células viables

El recuento de células viables por exclusión con azul Tripan luego de tratar monocapas confluentes de células Vero con diferentes concentraciones de los compuestos por 48 h fue el método utilizado para el muestreo general (Tabla 3). Los datos obtenidos para 1C<sub>1</sub>, 1C<sub>3</sub> y 1T<sub>1</sub> se ilustran en la Figura 4.

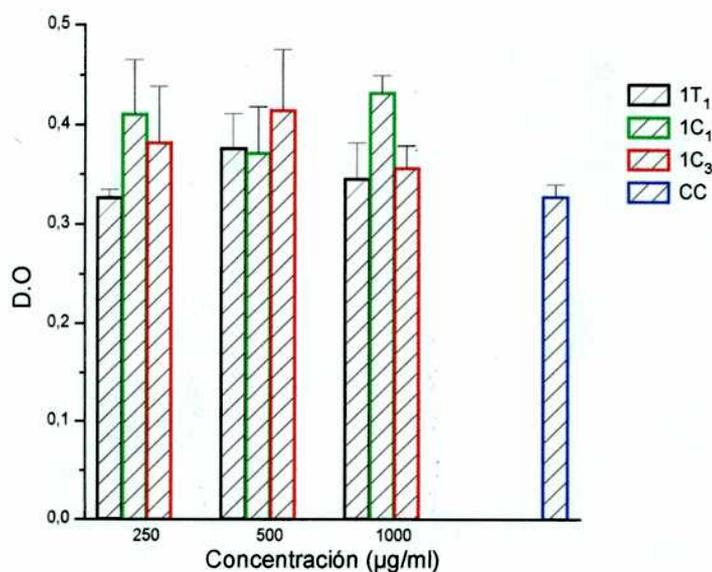


**Figura 4: Efecto de los carragenanos sobre la viabilidad de células Vero determinada por el método de tinción con azul Tripan.** Monocapas confluentes de células Vero se incubaron durante 48 h a 37°C con distintas concentraciones de 1T<sub>1</sub>, 1C<sub>3</sub> y 1C<sub>1</sub>. Luego, se retiró el medio, las células se tripsinaron, se tiñó con azul Tripan y se realizó el conteo de células viables. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE. CC: control de células sin compuesto.

Puede observarse que no hay alteraciones significativas en el número de células viables para concentraciones de 250-500  $\mu\text{g/ml}$  de los carragenanos, en tanto que se observa una pequeña reducción con 1000  $\mu\text{g/ml}$ , siendo este efecto más notable con  $1T_1$  (42% de reducción respecto del control). Por lo tanto para los tres compuestos, la  $CC_{50}$  determinada por este método es  $>1000 \mu\text{g/ml}$ , como se había indicado antes.

#### b. Método del MTT

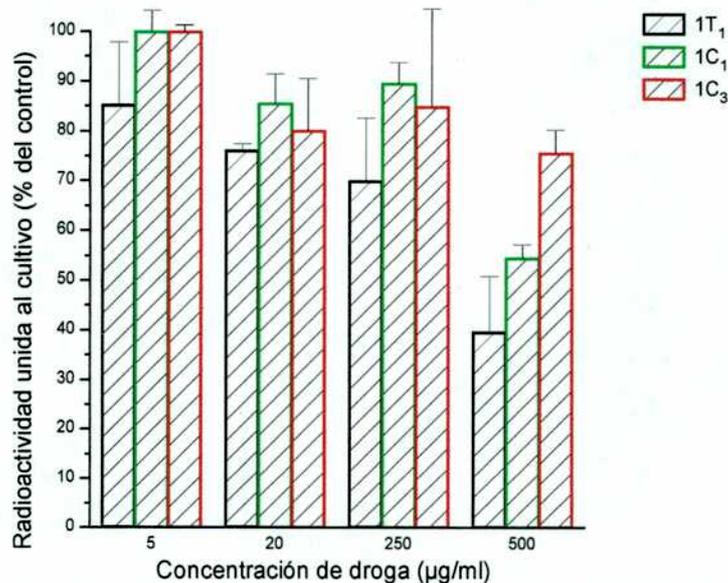
Sobre células sometidas al mismo tratamiento que en el experimento anterior se midió por DO la producción de formazan, compuesto azul obtenido por clivaje del MTT con la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, siendo la cantidad producida de formazan proporcional al número de células viables presentes (Denizot y Lang, 1986). Como se observa en la Figura 5, por esta técnica no hubo disminución significativa en la DO hasta la mayor concentración ensayada de cada compuesto, por lo que la  $CC_{50}$  medida por esta técnica es también  $>1000 \mu\text{g/ml}$  para los 3 tipos de carragenanos.



**Figura 5: Efecto de los carragenanos sobre la viabilidad celular determinada por el método del MTT.** Células Vero confluentes se trataron con distintas concentraciones de los compuestos por 48 h a  $37^\circ\text{C}$ . Luego se hizo la reacción con MTT y se midió la densidad óptica. Los resultados son el promedio de dos experimentos  $\pm$  DE.

### c. Síntesis de proteínas celulares

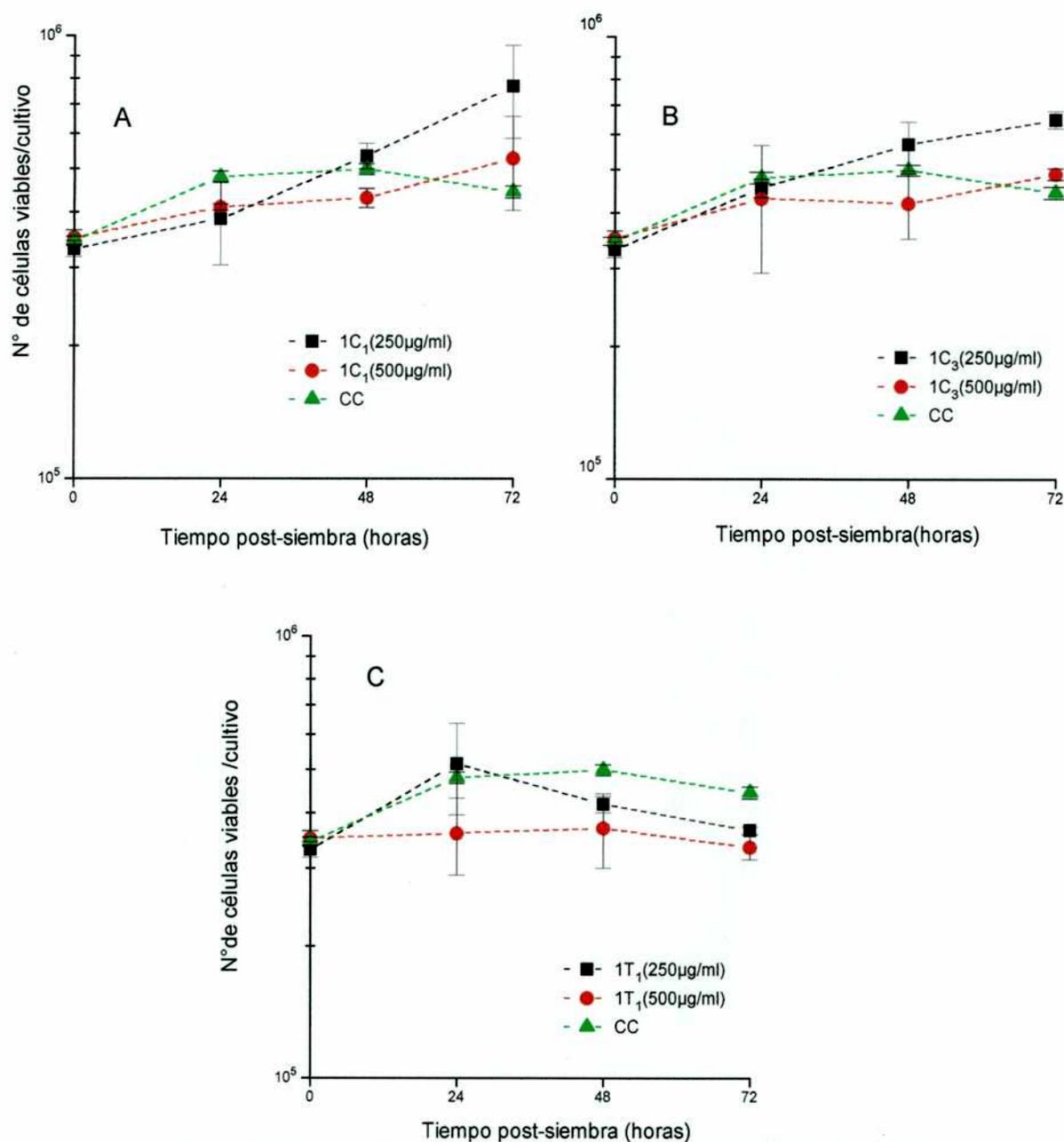
También se evaluó el efecto de estos carragenanos sobre el metabolismo celular, midiendo el nivel de síntesis de proteínas celulares en monocapas confluentes luego de 48 h de tratamiento con distintas concentraciones de cada compuesto. Como se observa en la Figura 6 hasta una concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$  no se observaron variaciones importantes en la síntesis de proteínas celulares, que se mantiene en todos los casos entre el 70-100% respecto del control. En presencia de 500  $\mu\text{g/ml}$ , aun cuando no se afectaba significativamente la viabilidad celular ( Figura 4 ), se comenzó a detectar una reducción en la capacidad biosintética de la célula, efecto que es nuevamente más notorio con  $1\text{T}_1$  (39,6 % de síntesis respecto del control) en tanto que para  $1\text{C}_3$  la actividad de síntesis proteica se mantuvo en 75,6 % respecto del control.



**Figura 6: Efecto de los carragenanos sobre la síntesis de proteínas celulares.** Monocapas de células Vero se incubaron 48 h con distintas concentraciones de cada compuesto. Luego se retiró el medio y se cubrió con MEM sin metionina conteniendo  $^{35}\text{S}$ -metionina. Después de 1h a  $37^\circ\text{C}$  se descartó el sobrenadante y se midió la radioactividad incorporada. Los resultados son el promedio de dos experimentos  $\pm$  DE.

## II. 2. Efecto sobre células en proliferación

Para medir el efecto de los carragenanos sobre la capacidad proliferativa de las células Vero, se agregaron los compuestos a las 3 h de sembradas y a las 24, 48 y 72 h post-siembra se midió el número de células viables por exclusión con azul Tripan.



**Figura 7: Efecto de los carragenanos sobre la proliferación celular.** Se sembraron células Vero, luego de 3 h de incubación a 37°C se agregaron distintas concentraciones de 1C<sub>1</sub> (A), 1C<sub>3</sub> (B) y 1T<sub>1</sub> (C), y se incubaron a 37°C durante 24, 48 y 72 h, procediéndose a la tripsinización y conteo de células viables para cada período. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE. CC: Control de células.

Como puede observarse en las Figura 7, nuevamente 1T<sub>1</sub> fue el compuesto que produjo una mínima reducción en el número de células, en tanto que para 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> el número de células luego de 72 h en presencia de los compuestos fue similar ó algo superior al control. En la Tabla 5 se muestra, en forma comparativa, el número de células viables luego de 48h de tratamiento con 500 y 250 µg/ml de carragenanos sobre células en proliferación (compuesto agregado a las 3h de sembradas) y células confluentes (compuesto agregado a

las 24 h ). Se observa que en el sistema de células Vero confluentes la presencia de los compuestos ejerce escasa influencia sobre la viabilidad celular, presentando 1T<sub>1</sub> el mayor efecto, con sólo un 14% de reducción en el número de células en presencia de 500 µg/ml. Para el sistema de células Vero en proliferación, la presencia de 1T<sub>1</sub> amplía la diferencia con el control, siendo leve el efecto ejercido por 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub>. Sin embargo, para una concentración de 500 µg/ml (1000 veces superior a la CI<sub>50</sub> ) 1T<sub>1</sub> reduce el número de células en crecimiento sólo en 30%, remarcando el elevado índice de selectividad de estos compuestos.

Compuesto	Células en proliferación		Células confluentes	
	Nº células (x 10 <sup>4</sup> )	% control	Nº células (x 10 <sup>4</sup> )	% control
<b>500 µg/ml</b>				
1C <sub>1</sub>	43 ± 2,1	86	57 ± 3,5	93
1T <sub>1</sub>	37 ± 7,0	74	52 ± 2,1	86
1C <sub>3</sub>	42 ± 7,0	84	56 ± 12,0	92
<b>250 µg/ml</b>				
1C <sub>1</sub>	53 ± 3,5	100	60 ± 4,9	98
1T <sub>1</sub>	42 ± 1,7	84	54 ± 3,5	89
1C <sub>3</sub>	57 ± 7,0	100	62 ± 3,5	100
control	50 ± 1,4		61 ± 7,7	

**Tabla 5: Efecto de los carragenanos sobre el Nº de células viables en cultivos confluentes y en proliferación.** Cultivos de células Vero se incubaron en presencia de 500 y 250 µg/ml de carragenanos, agregados a las 3 h de sembradas las células (células en proliferación) ó a las 24 h post-siembra (células confluentes). A las 48 h de agregado el compuesto, se hizo el recuento de células viables por azul Tripan. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE.

### II. 3. Espectro de actividad antiviral contra herpesvirus

Para evaluar el espectro de la actividad contra HSV de los carragenanos se ensayaron dos cepas de HSV-1 TK<sup>-</sup> resistentes al aciclovir y varios aislamientos clínicos de HSV-1 y HSV-2, por el método de reducción de placas.

Como se ve en la Tabla 6 los valores de la CI<sub>50</sub> encontrados fueron comparables en todos los casos con los obtenidos para las cepas de referencia, indicando el amplio espectro de actividad de estos compuestos frente a HSV.

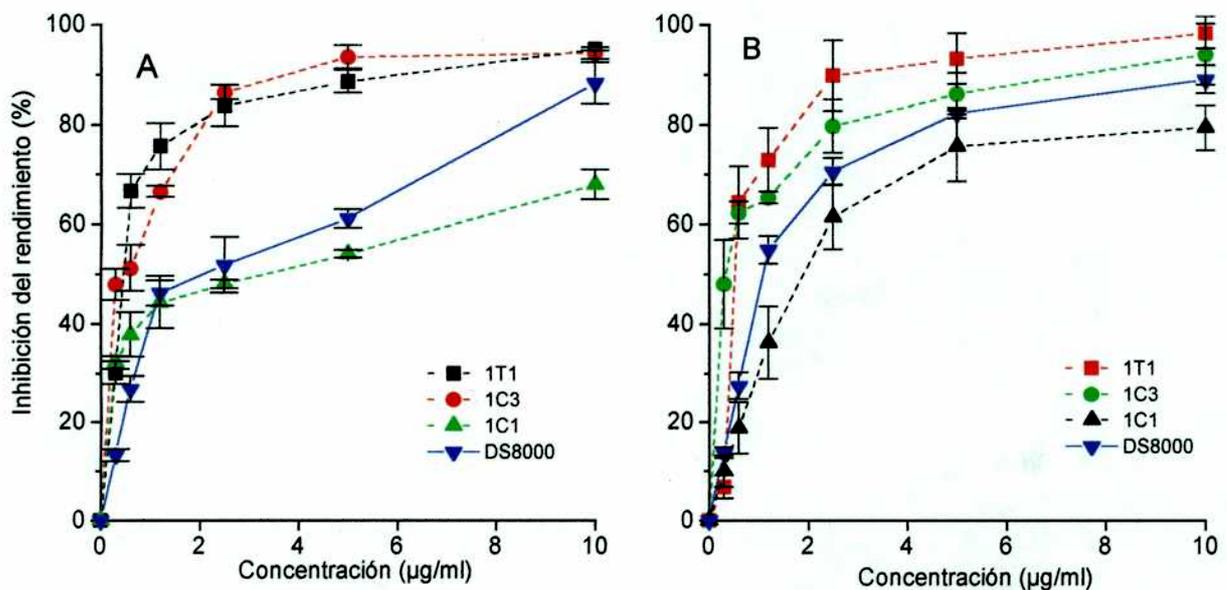
También se ensayó otros virus de la familia *Herpesviridae*, el citomegalovirus humano (CMV). Este virus que utiliza también como receptor los residuos heparan sulfato de proteoglicanos fue sensible a los tres carragenanos, con valores de CI<sub>50</sub> similares a los obtenidos contra HSV-1 y HSV-2 (Tabla 6).

Cepa Viral	CI <sub>50</sub> (µg/ml)		
	1T <sub>1</sub>	1C <sub>1</sub>	1C <sub>3</sub>
<b><u>Cepas de referencia</u></b>			
HSV-1 F	0,75 ± 0,08	1,44 ± 0,14	0,75 ± 0,30
HSV-2 G	0,41 ± 0,05	2,14 ± 0,28	0,51 ± 0,01
CMV Davis	0,50 ± 0,05	3,50 ± 0,09	1,00 ± 0,12
<b><u>Variantes resistentes a aciclovir</u></b>			
HSV-1 TK- B2006	0,30 ± 0,04	2,88 ± 0,11	0,97 ± 0,18
HSV-1 TK- Field	0,30 ± 0,01	5,60 ± 0,14	0,40 ± 0,13
<b><u>Aislamientos clínicos</u></b>			
HSV-1 1213 LCR/94	0,21 ± 0,06	1,40 ± 0,28	0,22 ± 0,01
HSV-1 374 LCR/94	0,36 ± 0,09	1,20 ± 0,21	0,59 ± 0,02
HSV-1 1180 BE/94	0,46 ± 0,19	1,90 ± 0,24	0,36 ± 0,08
HSV-2 244 BE/94	0,55 ± 0,21	2,40 ± 0,49	2,24 ± 0,22

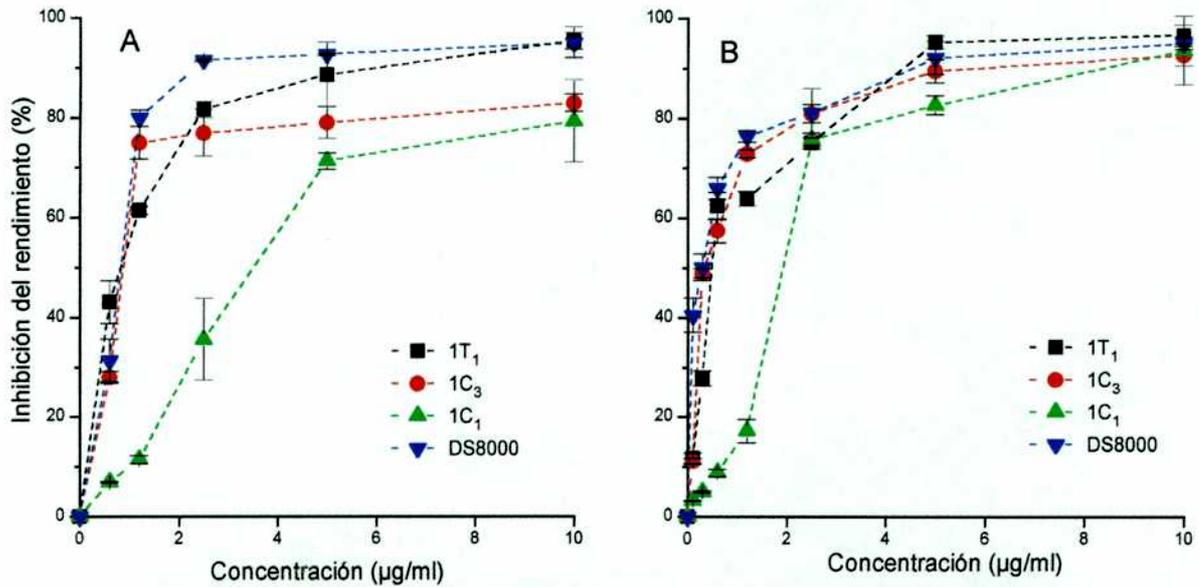
**Tabla 6: Espectro de actividad antiherpética de los carragenanos.** La CI<sub>50</sub> se determinó por el método de reducción de placas para HSV-1 y HSV-2, y por reducción del efecto citopático para CMV. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE.

## II. 4. Actividad contra HSV en distintos tipos celulares

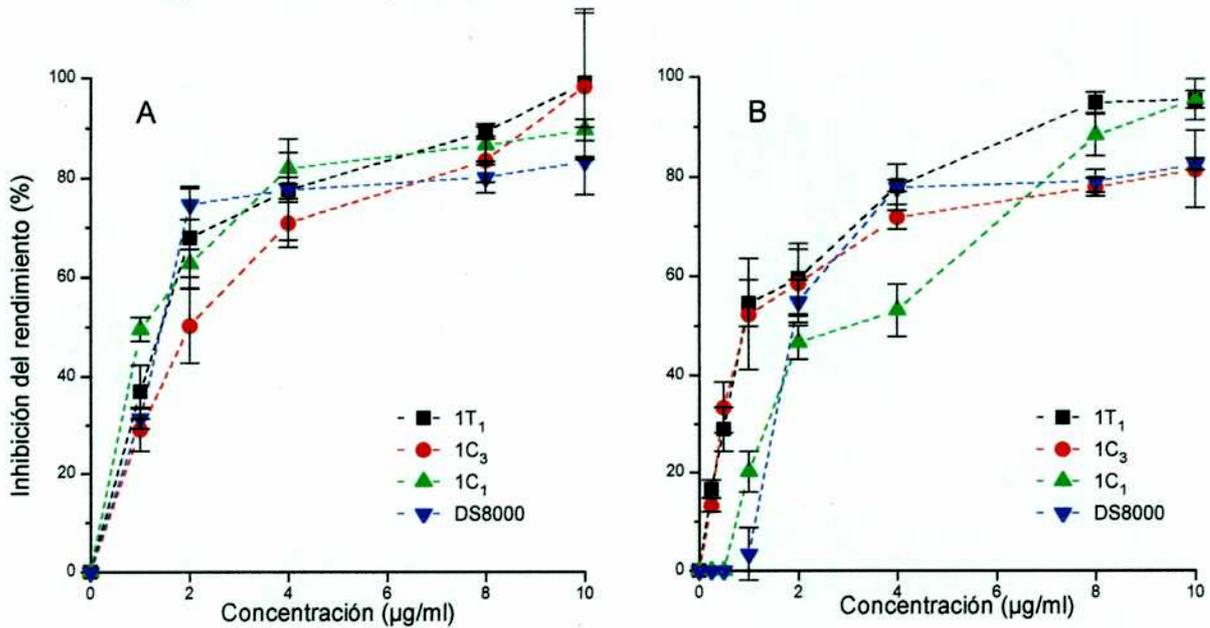
Para demostrar que el efecto inhibitorio de los carragenanos sobre los herpesvirus no se limitaba al sistema de células Vero de riñón de mono, se probó la actividad antiviral sobre dos tipos celulares de distinto origen, más relevantes a la infección herpética. Debido a la capacidad de HSV-2 y, en menor medida, HSV-1 de producir infecciones genitales y a las propiedades neurotrópicas de ambos serotipos, que pueden diseminarse al sistema nervioso central tanto en las infecciones primarias como en las recurrentes, se eligieron células de origen neural, astrocitos murinos, y fibroblastos derivados de prepucio humano, células PH, para analizar la actividad antiviral de 1C<sub>1</sub>, 1C<sub>3</sub> y 1T<sub>1</sub>, en forma comparativa con el sistema de células Vero. Dadas las dificultades en desarrollar un ensayo de plaqueo directo en los cultivos de astrocitos, se evaluó la actividad contra HSV-1 y HSV-2 mediante un ensayo de inhibición del rendimiento viral a las 24 h p.i. en los tres sistemas celulares.



**Figura 8: Curvas de respuesta a la dosis de la actividad antiviral de los carragenanos en células Vero.** Se infectaron células Vero con HSV-1 (A) y HSV-2 (B) en presencia de distintas concentraciones de los compuestos y a las 24 h p.i. se determinaron los rendimientos virales por UFP en células Vero. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE.



**Figura 9: Curvas de respuesta a la dosis de la actividad antiviral de los carragenanos en células PH.** Se infectaron células PH con HSV-1 (A) y HSV-2 (B) en presencia de distintas concentraciones de los compuestos y a las 24 h p.i. se determinaron los rendimientos virales por UFP en células Vero. Los resultados son el promedio de dos experimentos  $\pm$  DE.



**Figura 10: Curvas de respuesta a la dosis de la actividad antiviral de los carragenanos en astrocitos murinos.** Cultivos de astrocitos se infectaron con HSV-1 (A) y HSV-2 (B) en presencia de distintas concentraciones de los compuestos y a las 24 h p.i. se determinaron los rendimientos virales por UFP en células Vero. Los resultados son el promedio de dos experimentos  $\pm$  DE.

Como puede observarse en las figuras 8, 9 y 10, en los tres tipos celulares los carragenanos mostraron una notoria acción inhibitoria en forma dependiente de la concentración, tanto contra HSV-1 como HSV-2. Asimismo los tres carragenanos no

mostraron efectos citotóxicos sobre cultivos confluentes de células PH ni de astrocitos cuando se ensayaron hasta una concentración máxima de 1000 µg/ml.

A partir de las curvas de respuesta a la dosis se calcularon las  $CI_{50}$  que se presentan en la Tabla 7. Los resultados obtenidos demostraron que los carragenanos mantuvieron su actividad inhibitoria independientemente del tipo de célula utilizada, registrándose *pequeñas variaciones* en los valores de la  $CI_{50}$ , pero siempre dentro del mismo orden de magnitud, con un rango de valores entre 0,3 y 3,3 µg/ml. Comparados con la sustancia antiviral de referencia, DS8000, los carragenanos naturales fueron tan activos como este polisacárido sulfatado en los tres tipos de células.

Compuesto	$CI_{50}$ (µg/ml)					
	Vero		PH		Astrocitos	
	HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
1C <sub>1</sub>	3,2 ± 0,3	1,8 ± 0,1	3,3 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,3 ± 0,2	3,6 ± 0,5
1C <sub>3</sub>	0,9 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,02	1,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2
1T <sub>1</sub>	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,01	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1
DS <sub>8000</sub>	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,03	1,7 ± 0,2	2,3 ± 0,5

**Tabla 7: Actividad antiviral de los carragenanos en distintos tipos celulares.** La  $CI_{50}$  se determinó por el método de inhibición del rendimiento viral. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE.

La infección de astrocitos con HSV puede inducir alteraciones de las propiedades astrocitarias in vitro que sean relevantes a la patogenia de la enfermedad neurológica. Estas alteraciones pueden también ser afectadas por la presencia de los carragenanos. Es por ello que se consideró interesante examinar la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), ya que esta proteína está asociada a los filamentos intermedios de la glía y es un marcador específico de la actividad astrocítica ampliamente utilizado.

Los astrocitos protoplásmicos y fibrosos se identificaron por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos anti-GFAP en cultivos sin infectar ( Figura 11A). Después de 24 h de infección, fue evidente el efecto citopático debido a la infección por HSV-1 con pérdida de la normal morfología celular, retracción citoplasmática con redondeamiento y desprendimiento celular (Figura 11B). La marcación de la GFAP fue más intensa en las células infectadas que en las células normales (Figura 11A y B) sugiriendo un incremento de GFAP debido a la activación astrocítica por la infección con HSV-1. Así, el porcentaje

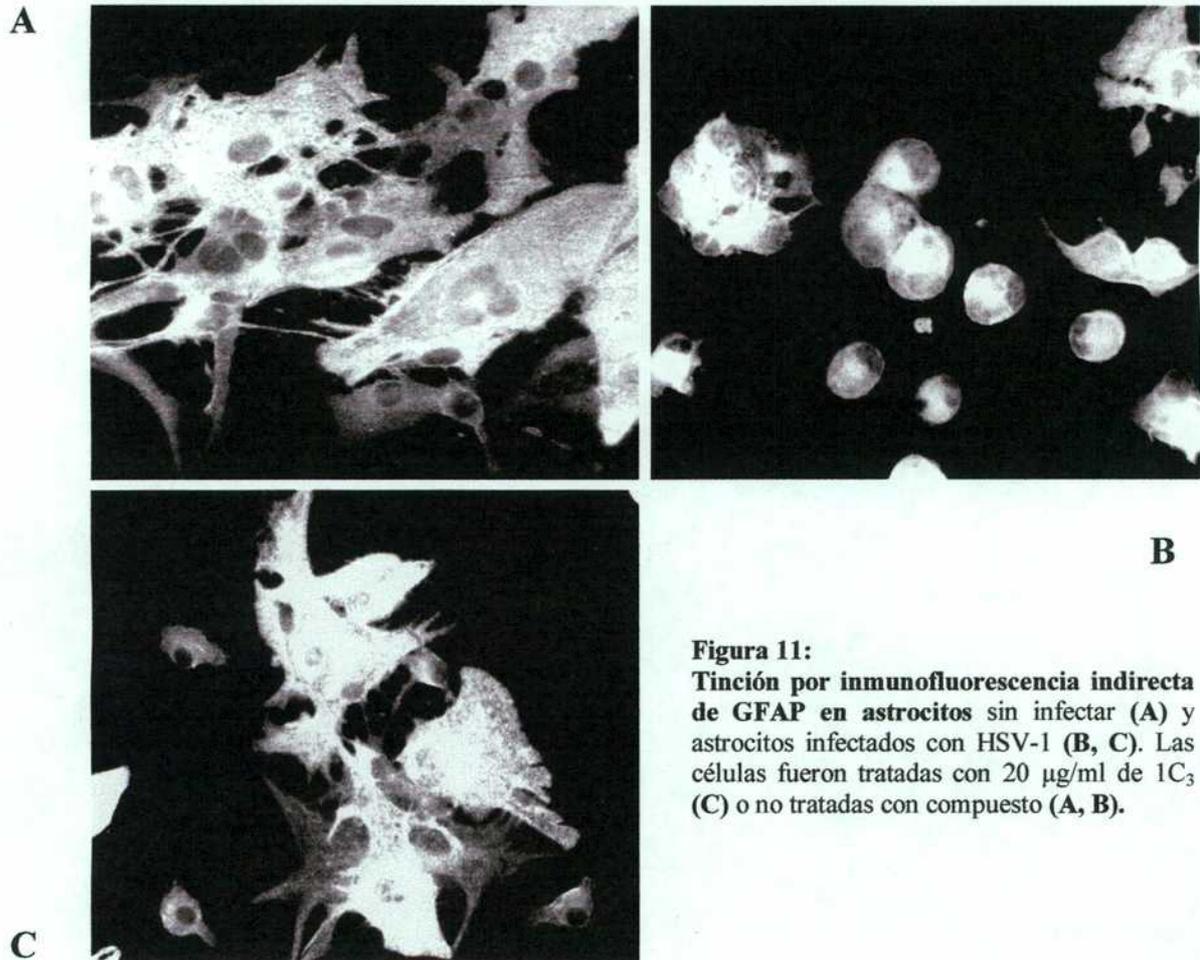
promedio de células GFAP + en cultivos infectados fue de 83,6% comparado con un valor de 70,4% de células GFAP + en los cultivos controles no infectados (Tabla 8). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( test t de Student ,  $p < 0,001$ ).

Tratamiento celular	Células positivas (%)	
	anti-GFAP	anti-HSV-1
<b><i>Células no infectadas</i></b>		
Control	70,4 ± 3,1	0
1T <sub>1</sub>	88,4 ± 3,3	0
1C <sub>1</sub>	66,8 ± 5,3	0
1C <sub>3</sub>	65,0 ± 5,1	0
<b><i>Células infectadas</i></b>		
Control	83,6 ± 0,3	81,6 ± 1,4
1T <sub>1</sub>	83,9 ± 2,1	9,5 ± 1,3
1C <sub>1</sub>	65,1 ± 5,4	5,8 ± 1,2
1C <sub>3</sub>	67,6 ± 5,3	11,5 ± 1,2

**Tabla 8: Expresión de GFAP y HSV-1 en astrocitos.** Cultivos de astrocitos se infectaron ó no con HSV-1 en ausencia (control) o en presencia de 20 µg/ml de los carragenanos. A las 24 h p. i. se ensayó por inmunofluorescencia indirecta la expresión de GFAP y de las proteínas de HSV-1. Se contaron el número de células totales y positivas en 20 campos para cada muestra por duplicado. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas con su desviación estándar.

Los carragenanos 1C<sub>3</sub> ( Figura 11C ), 1C<sub>1</sub> y 1T<sub>1</sub> inhibieron la citopatología inducida por HSV-1, y los astrocitos mantuvieron su morfología normal. Además, el número de astrocitos GFAP + en los cultivos infectados con HSV-1 y tratados con 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> no difirió significativamente de los niveles detectados en células sin infectar (  $p < 0,1$  ) (Tabla 8). Por lo tanto, puede concluirse que 1C<sub>3</sub> y 1C<sub>1</sub> inhibieron la multiplicación de HSV-1 y consecuentemente también anularon la estimulación astrocítica debida a la infección viral. Por el contrario, el carragenano-λ 1T<sub>1</sub> no redujo el incremento en la expresión de GFAP (Tabla 8). Este efecto particular no fue debido a una falla de 1T<sub>1</sub> en revertir la acción de HSV-1, ya que como se ve en la Tabla 8, el tratamiento de los astrocitos sin infectar con el compuesto fue suficiente para incrementar significativamente el número de astrocitos GFAP + (  $p < 0,001$  ), independientemente de la infección con HSV-1. Además, la tinción

con anticuerpos contra HSV-1 confirmó que los tres carragenanos fueron igualmente efectivos en reducir la expresión de proteínas virales en comparación con las células sin tratar infectadas (Tabla 8).



**Figura 11:**  
Tinción por inmunofluorescencia indirecta de GFAP en astrocitos sin infectar (A) y astrocitos infectados con HSV-1 (B, C). Las células fueron tratadas con 20 µg/ml de 1C<sub>3</sub> (C) o no tratadas con compuesto (A, B).

Para determinar si el efecto modulador de los carragenanos era específico sobre la expresión de esta proteína activada o era una acción general sobre las proteínas celulares astrocíticas, se hicieron dos experimentos. Primero, se realizó la tinción por inmunofluorescencia de la tubulina, otro componente proteico del citoesqueleto, en astrocitos tratados con los carragenanos y sin tratar. No se observaron diferencias en la intensidad de la marcación o en el número de células positivas (datos no mostrados). Simultáneamente, los cultivos tratados con los carragenanos se marcaron con <sup>35</sup>S-metionina durante 1 h para medir el nivel de la síntesis de proteínas celulares. No se registró incremento o disminución significativos en la síntesis de proteínas totales después

de 24 h de tratamiento, ya que el porcentaje de radiactividad insoluble en PCA incorporada en presencia de 20  $\mu\text{g/ml}$  de  $1\text{C}_3$  o  $1\text{T}_1$  fue de  $99 \pm 2$  y  $98 \pm 1\%$ , respectivamente, con respecto a los cultivos sin tratar.

## **II. 5. Influencia de la multiplicidad de infección sobre la actividad antiviral**

Uno de los factores que más puede afectar la eficacia de un antiviral es la concentración inicial de virus. Para determinar la influencia de la concentración viral sobre la  $\text{CI}_{50}$ , se realizó un ensayo de inhibición del rendimiento viral, inoculando monocapas de células Vero con la cepa F de HSV-1 a diferentes multiplicidades de infección en el intervalo de 0,001 a 1 UFP/cél en presencia de distintas concentraciones de  $1\text{C}_3$ . En la Tabla 9 se muestran los valores de la  $\text{CI}_{50}$  correspondientes a las distintas multiplicidades ensayadas. Se observó un leve aumento de la  $\text{CI}_{50}$  en función de la multiplicidad de infección. Al aumentar 10 y 100 veces la  $m$ , la  $\text{CI}_{50}$  se incrementó en aproximadamente 3 veces para ambos casos, mientras que al elevar 1000 veces la cantidad de virus inicial, la  $\text{CI}_{50}$  aumentó 13,4 veces. Por lo tanto, se puede concluir que la variación en la capacidad inhibitoria de  $1\text{C}_3$  fue mínima frente a grandes incrementos en la multiplicidad de infección viral, indicando que el compuesto es muy efectivo aún en presencia de inóculos virales elevados.

<b>multiplicidad de infección</b>	<b><math>\text{CI}_{50}</math> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>0,001</b>	<b><math>1,8 \pm 0,14</math></b>
<b>0,01</b>	<b><math>5,6 \pm 0,84</math></b>
<b>0,1</b>	<b><math>5,7 \pm 0,80</math></b>
<b>1</b>	<b><math>22,8 \pm 0,64</math></b>

**Tabla 9: Influencia de la multiplicidad de infección de HSV-1 sobre la  $\text{CI}_{50}$  de  $1\text{C}_3$ .** Monocapas de células Vero fueron infectadas con HSV-1 cepa F empleando distintas multiplicidades de infección, en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de  $1\text{C}_3$ . La  $\text{CI}_{50}$  se obtuvo por el método de reducción del rendimiento viral a las 24 h p.i. Los resultados son el promedio de dos experimentos  $\pm$  DE.

## **II. 6. Evaluación de la $CI_{50}$ por distintas técnicas**

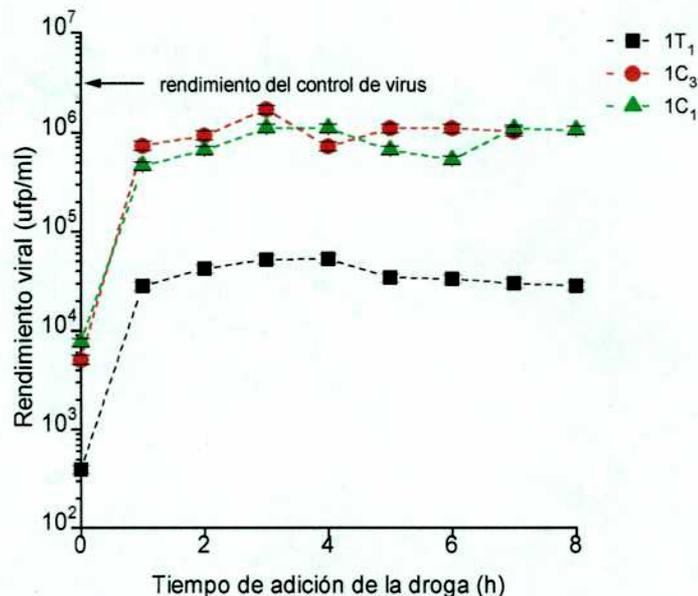
La comparación de los datos presentados en las Tablas 3 y 7 permite analizar la influencia de la técnica empleada para evaluar la actividad antiviral en los valores de la  $CI_{50}$ . Allí se emplearon el método de reducción del número de placas que mide en forma directa el efecto de los compuestos sobre la acción citopática del virus (Tabla 3) y el ensayo de inhibición del rendimiento viral que evidencia la capacidad de las drogas de bloquear la replicación del virus (Tabla 7). Los valores de  $CI_{50}$  para  $1C_1$ ,  $1C_3$  y  $1T_1$  obtenidos por plaqueo directo oscilaron entre 0,4 - 2,2  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 3) en tanto que por inhibición del rendimiento, las  $CI_{50}$  en células Vero fueron 0,3 -3,2  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 7), por lo que se puede concluir que para estos carragenanos no se registraron variaciones en la  $CI_{50}$  determinada por ambos métodos estándar.

En conclusión, el análisis de la influencia de distintas condiciones experimentales sobre la acción de los carragenanos  $1C_1$ ,  $1C_3$  y  $1T_1$  permite concluir que su actividad antiherpética es independiente de la cepa de HSV-1 y HSV-2, del tipo de célula utilizada, de la técnica empleada para evaluar la  $CI_{50}$  y muestra una variación mínima frente a un gran aumento de la multiplicidad de infección.

### III. Mecanismo de acción antiviral de los carragenanos

#### III. 1. Influencia del tiempo de adición de los carragenanos sobre su actividad antiviral

Para comenzar a estudiar el modo de acción de estos compuestos y evaluar si la actividad antiviral se ejercía en etapas tempranas ó tardías del ciclo de replicación de HSV-1, se determinó el efecto de la adición de los compuestos a distintos tiempos de infección sobre su actividad antiviral. En la Figura 12 se ve que la inhibición del rendimiento viral fue máxima al incorporar los compuestos al tiempo 0 (junto con el inóculo viral), siendo más pronunciada para  $1T_1$  (reducción del rendimiento en 4 log) que para  $1C_3$  y  $1C_1$  (reducción del rendimiento de 3 log).



**Figura 12: Influencia del tiempo de adición de los carragenanos sobre la actividad antiviral.** Células Vero se infectaron con HSV-1 cepa F (m: 0,1) y se agregaron los compuestos (20 µg/ml) simultáneamente (tiempo 0) y a distintos tiempos p.i., determinándose para cada caso el rendimiento viral a las 24 h p.i. por ensayo de placas. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE.

Cuando los compuestos se agregaron después de la adsorción, no hubo prácticamente inhibición en presencia de  $1C_1$  y  $1C_3$ , en tanto que para  $1T_1$  el efecto fue menor que cuando la droga estaba desde el comienzo, pero se mantuvo siempre una inhibición de aproximadamente 2 log en el rendimiento viral obtenido. Estos resultados parecen indicar

que los tres compuestos ejercen su acción inhibitoria fundamentalmente en la etapa inicial de adsorción, pero además 1T<sub>1</sub> podría tener un efecto posterior.

Para corroborar la hipótesis anterior, se hizo un experimento similar de agregado de los compuestos a distintos tiempos, pero en un ensayo de plaqueo directo. Es decir, se hizo un ensayo de reducción en el número de placas agregando los compuestos sólo en la adsorción, después de la adsorción ó durante todo el período de incubación (Tabla 10).

Compuesto presente		Inhibición (% ± DE)			
durante la adsorción	después de adsorción	1C <sub>1</sub>	1C <sub>3</sub>	1T <sub>1</sub>	1T <sub>1</sub> T <sub>1</sub>
SI	SI	98 ± 2	93 ± 2	97 ± 6	96 ± 2
SI	NO	97 ± 4	90 ± 6	90 ± 5	97 ± 3
NO	SI	25 ± 9	16 ± 5	79 ± 20	17 ± 1
NO	NO	0	0	0	0

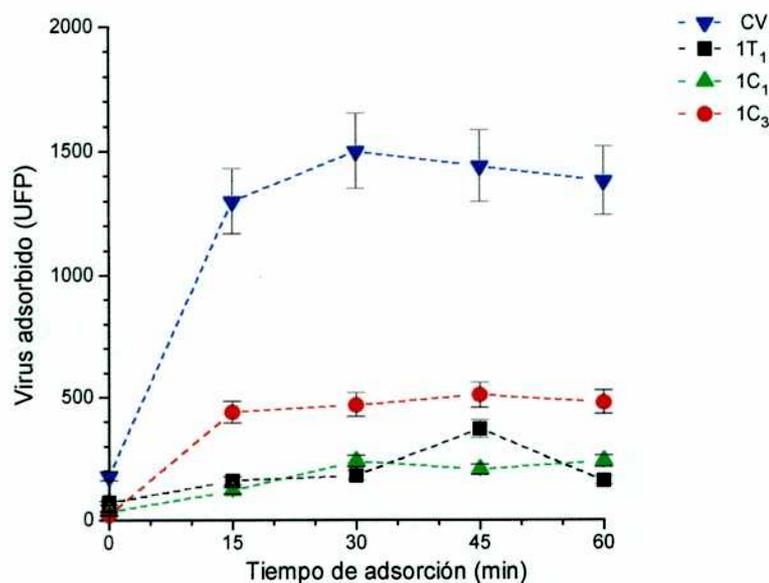
**Tabla 10: Influencia del tiempo de tratamiento con los carragenanos sobre la inhibición en la formación de placas.** Se infectaron células Vero con aproximadamente 60 UFP de HSV-1 en ausencia o presencia de 20 µg/ml de 1C<sub>1</sub>, 1C<sub>3</sub>, 1T<sub>1</sub> ó 1T<sub>1</sub>T<sub>1</sub>. Después de la adsorción durante 1 h a 4°C, se retiró el virus no adsorbido y las células se cubrieron con MM conteniendo 0,7% de metilcelulosa con o sin compuesto, y se incubó a 37°C durante 2 días. Los resultados son el promedio de dos experiencias ± DE.

Para 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> la inhibición fue máxima ( ≥ 90%) cuando los compuestos estuvieron presentes a lo largo de todo el ensayo o cuando se los agregó solamente en la adsorción, mientras que cuando los compuestos se agregaron con posterioridad a la adsorción la inhibición fue marcadamente menor ( 16-25%). Para 1T<sub>1</sub> también los mayores efectos se obtuvieron cuando el compuesto estuvo presente durante la adsorción, pero el agregado después de esta etapa aunque disminuyó el efecto inhibitorio mostró una reducción altamente significativa en el número de placas (79%), confirmando que habría otro blanco de acción además de la etapa de adsorción.

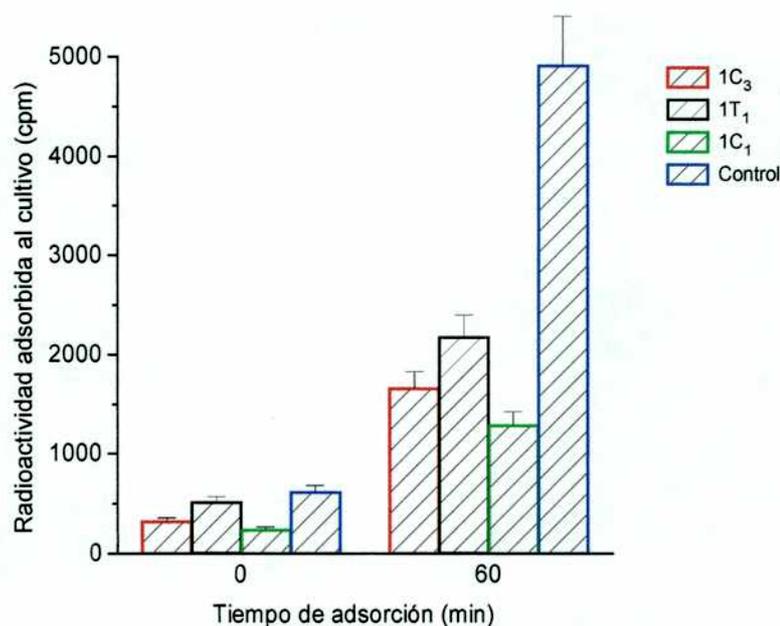
Por otra parte, la alteración estructural del carragenano 1T<sub>1</sub> que se produce por tratamiento alcalino originando el derivado 1T<sub>1</sub>T<sub>1</sub> ( Figura 3) hizo que se pierda el efecto inhibitorio ejercido luego de la adsorción (Tabla 10) indicando que hay una relación entre estructura y función.

### III. 2. Efecto de los carragenanos sobre la adsorción viral

Para confirmar que el modo de acción de estos carragenanos se debe principalmente a un bloqueo en la adsorción del virus a la célula, se determinó directamente la cinética de adsorción viral en presencia o ausencia de los compuestos. Para ello se midió la cantidad de virus unido a las células Vero luego de distintos tiempos de incubación a 4°C por dos técnicas: medida de la cantidad de virus infeccioso adsorbido determinada por UFP (Figura 13) y medida de la unión de partículas virales marcadas radiactivamente con  $^{35}\text{S}$ -metionina (Figura 14). En ambos casos se observó una notoria disminución en la cantidad de virus unido a la célula, el que se mantuvo casi constante en presencia de los carragenanos en tanto que en el control se incrementó con el tiempo la cantidad de virus adsorbido.



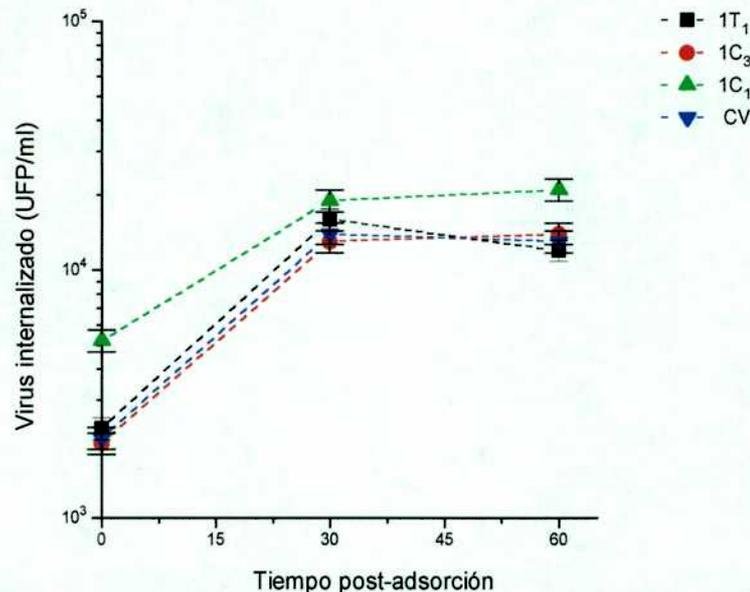
**Figura 13: Efecto de los carragenanos en la cinética de adsorción de HSV-1.** Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F (m: 1) en presencia o ausencia de los compuestos (20 µg/ml) y luego de distintos tiempos de incubación a 4°C se determinó la cantidad de virus adsorbido a la células por UFP. CV: control de virus sin droga. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE.



**Figura 14: Efecto de los carragenanos sobre la unión a células Vero de HSV-1 marcado radiativamente.** Células Vero fueron infectadas con HSV-1 cepa F marcado con [<sup>35</sup>S]-L- metionina, en ausencia y presencia de 20 µg/ml de los compuestos y luego de 60 min de incubación a 4°C se determinó la radioactividad asociada al cultivo. CV: control de virus sin droga. Los valores representados son el promedio de dos experimentos ± DE.

### III. 3. Efecto de los carragenanos sobre la internalización viral

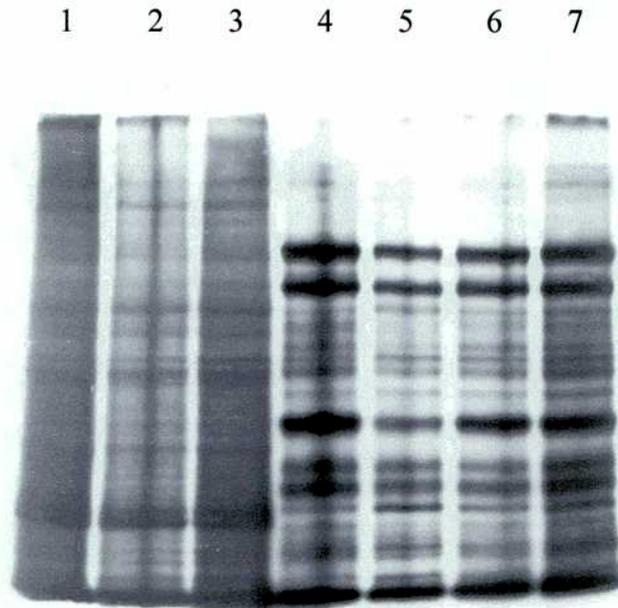
La internalización es la etapa del ciclo de replicación viral que transcurre inmediatamente después de la adsorción. Para analizar el probable efecto de los carragenanos en la misma, se adsorbió el virus a 4°C y luego se elevó la temperatura a 37°C para permitir la internalización en presencia ó ausencia de los compuestos. Los resultados de la Figura 15 demuestran que la cantidad de virus internalizado en presencia de los carragenanos, medido como el número de centros infecciosos después de inactivar el virus adsorbido no penetrado, fue similar que en las células sin tratar, indicando que estos polisacáridos actúan sobre la adsorción sin afectar la internalización.



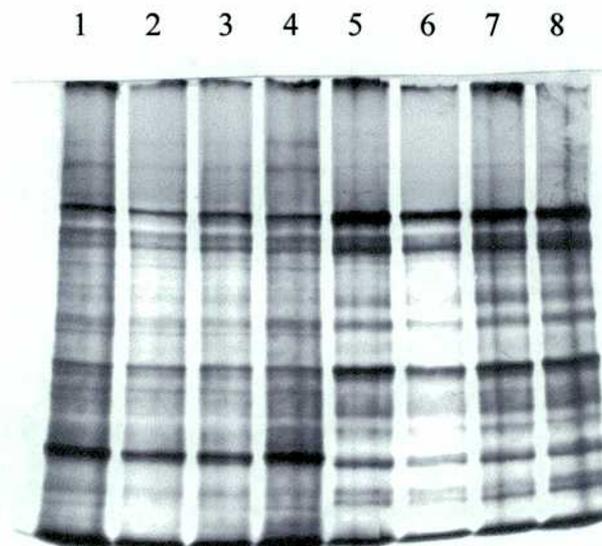
**Figura 15: Efecto de los carragenanos sobre la internalización de HSV-1.** Se infectaron células Vero con HSV-1 (m: 1). Luego de 1 h de adsorción a 4°C, las células se incubaron a 37°C en ausencia y en presencia de 20 µg/ml de los compuestos. A distintos tiempos post-adsorción se midió el virus internalizado. CV: control de virus sin droga. Los valores representados son el promedio de dos experimentos ± DE.

### **III. 4. Efecto de los carragenanos sobre la síntesis de proteínas virales**

A continuación se estudió el efecto de los carragenanos sobre la síntesis de proteínas en células infectadas con HSV-1. Para ello, se infectaron células Vero con HSV-1 y los carragenanos se agregaron después de la infección, analizándose la síntesis de proteínas por agregado de [<sup>35</sup>S]-metionina en distintos períodos, 2-4 h, 6-8 h y 10-12 h p.i., y electroforesis en geles de poliacrilamida. En las células normales tratadas con los compuestos no se observó ningún efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas celulares tal como lo demuestra la Figura 16 -líneas 1 a 3 confirmando así la falta de citotoxicidad de estos carragenanos. En células infectadas con HSV-1 fue evidente la inhibición de la síntesis de proteínas celulares inducida por el virus y la aparición de bandas correspondientes a las proteínas virales (Figura 16 línea 4), en tanto que en las células infectadas y tratadas con los compuestos no se observó ninguna alteración en la síntesis de proteínas virales a lo largo de los tres períodos estudiados (Figura 16 línea 5 a 7 y Figura 17 líneas 2 a 4 y 6 a 8) con respecto a sus respectivos controles. Por lo tanto, ninguno de los tres carragenanos afectó la síntesis de proteínas virales tempranas ó tardías.



**Figura 16: Electroforesis en gel de poliacrilamida de polipéptidos marcados radiactivamente con  $[^{35}\text{S}]$ -metionina.** 1. células no infectadas tratadas con 1T<sub>1</sub>; 2. células no infectadas tratadas con 1C<sub>3</sub>; 3. células no infectadas tratadas con 1C<sub>1</sub>; 4. células infectadas; 5. células infectadas tratadas con 1C<sub>1</sub>; 6. células infectadas tratadas con 1C<sub>3</sub>; 7. células infectadas tratadas con 1T<sub>1</sub>. La incorporación de  $[^{35}\text{S}]$ -metionina se realizó entre 2-4 h p.i.



**Figura 17: Electroforesis en gel de poliacrilamida de polipéptidos marcados radioactivamente con  $[^{35}\text{S}]$ -metionina.** 1. células infectadas; 2. células infectadas tratadas con 1T<sub>1</sub>; 3. células infectadas tratadas con 1C<sub>3</sub>; 4. células tratadas con 1C<sub>1</sub>; 5. células infectadas; 6. células infectadas tratadas con 1T<sub>1</sub>; 7. células infectadas tratadas con 1C<sub>3</sub>; 8. células infectadas tratadas con 1C<sub>1</sub>. 1-4: período de incubación 6-8 h p.i. ; 5-8: período de incubación 10-12 h p.i.

### **III. 5. Efecto de los carragenanos por pretratamiento de las células y de los viriones**

Como no se demostró actividad inhibitoria de 1T<sub>1</sub> en alguna etapa del ciclo de replicación posterior a la adsorción pero el rendimiento viral se redujo significativamente cuando este carragenano se agregó después de la adsorción (Figura 12, Tabla 10), se decidió investigar la posibilidad de que el compuesto actúe directamente sobre la partícula viral o sobre la célula antes de la infección. Cuando monocapas de células Vero fueron tratadas con los compuestos en distintas concentraciones durante 2 h a 37°C, y luego infectadas con 80 UFP de HSV-1, no se observó ninguna reducción en el número de placas respecto a los controles sin tratar (datos no mostrados), sugiriendo que los carragenanos no interactúan con el receptor u otra molécula en la célula huésped.

Por el contrario, la preincubación de los virus con los carragenanos resultó en una reducción concentración -dependiente de la infectividad remanente (Tabla 11). Se observó una notable diferencia en los niveles de actividad virucida entre los diferentes tipos de carragenanos: 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> no tuvieron efecto significativo en la inactivación de los viriones de HSV-1 a concentraciones cercanas a la CI<sub>50</sub> determinada por ensayo de reducción de placas, mientras que 1T<sub>1</sub> mostró actividad virucida aún en dosis menores de 1 µg/ml.

Concentración (µg/ml)	Infectividad remanente ( % del control )			
	1C <sub>1</sub>	1C <sub>3</sub>	1T <sub>1</sub>	1T <sub>1</sub> T <sub>1</sub>
0,5	91 ± 2	81 ± 1	51 ± 3	95 ± 4
2	78 ± 1	70 ± 6	32 ± 5	93 ± 1
10	70 ± 1	61 ± 5	18 ± 1	76 ± 5
25	64 ± 5	52 ± 9	23 ± 4	63 ± 3
50	56 ± 3	39 ± 7	17 ± 6	16 ± 4

**Tabla 11: Efecto virucida de los carragenanos.** Una suspensión de HSV-1 cepa F se incubó durante 1,5 h a 37°C en presencia de iguales volúmenes de distintas concentraciones de los compuestos y de MM como control. Luego se realizaron diluciones de las mezclas y se procedió a su titulación por UFP en células Vero. Los resultados se expresan como: 100 x título de virus tratado con compuesto / título de virus control y son el promedio de dos experimentos ± DE.

Los valores de la  $CI_{50}$  para la actividad virucida calculada a partir de los datos mostrados en la Tabla 11 fueron  $>50$ , 27,9 y 0,5  $\mu\text{g/ml}$  para  $1C_1$ ,  $1C_3$  y  $1T_1$  respectivamente. La comparación de estos datos con la  $CI_{50}$  correspondiente al ensayo de reducción de placas (Tabla 3) indicó que la concentración de  $1C_1$  y  $1C_3$  necesaria para inactivar a HSV-1 por pretratamiento antes de la infección fue 21,7-39,8 veces mayor que la concentración requerida para reducir el número de placas cuando los compuestos se agregaron en el momento de la adsorción. Por el contrario, los valores de la  $CI_{50}$  para  $1T_1$  en ambas condiciones experimentales fueron similares (1,0 y 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Además, las propiedades virucidas de  $1T_1$  se ensayaron con otras cepas de HSV-1 y también para HSV-2: la  $CI_{50}$  para la actividad virucida de  $1T_1$  contra las cepas 1180 BE/94 y B2006 de HSV-1 y las cepas G y 244 BE/94 de HSV-2 fueron 0,4, 0,8, 0,5 y 0,6  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, mientras que los valores correspondientes de  $CI_{50}$  para el ensayo de reducción de placas fueron 0,3, 0,3, 0,4 y 0,6  $\mu\text{g/ml}$ .

Las diferencias estructurales entre  $1T_1$ , y  $1C_1$  y  $1C_3$ , pueden ser las responsables de los distintos modos de acción, otorgándole una mayor estabilidad a la unión de  $1T_1$  con HSV-1, y permitiendo así la inactivación viral. Esta hipótesis fue confirmada al analizar las propiedades biológicas de un derivado de  $1T_1$  modificado químicamente. El tratamiento alcalino de  $1T_1$  produjo la ciclización de unidades  $\alpha$ -D-galactosa 6-sulfato y 2,6-disulfato a unidades 3,6- anhidro-D-galactosa 2-sulfato, produciendo el derivado ciclado  $1T_1T_1$  (Figura 3). Este compuesto mantuvo la actividad antiviral de  $1T_1$  medida por ensayo de reducción de placas en células Vero con una  $CI_{50}$  de 0,3  $\mu\text{g/ml}$  para HSV-1 (Tabla 3), pero la propiedad virucida fue significativamente disminuída (Tabla 11) siendo la  $CI_{50}$  de  $1T_1T_1$  determinada por inactivación directa del virión de 30,4  $\mu\text{g/ml}$ .

## **IV. Selección y caracterización de variantes de HSV-1 aisladas en presencia de 1C<sub>3</sub>**

Uno de los problemas en el uso de antivirales es la generación, ante el empleo continuado de una droga, de mutantes resistentes a la misma. Asimismo, estas mutantes son una herramienta para caracterizar el blanco de acción del compuesto en el virus. Para evaluar esta situación en los carragenanos naturales aquí estudiados, se inició un estudio utilizando como compuesto modelo el carragenano 1C<sub>3</sub>.

### **IV. 1. Selección y clonado de variantes de HSV-1 por pasajes seriados**

Para estudiar el efecto del tratamiento prolongado con 1C<sub>3</sub>, se realizaron pasajes sucesivos en células Vero infectadas con HSV-1 cepa F en presencia de concentraciones crecientes de 1C<sub>3</sub> como se describe en Materiales y Métodos. Se realizó la titulación de cada pasaje como se muestra en la Tabla 12, para luego determinar la CI<sub>50</sub>. Lo primero que se observó es que con los pasajes fue aumentando el tiempo necesario para obtener efecto citopático (de 24 a 72 h, aproximadamente). Respecto de la CI<sub>50</sub>, se observó una gran heterogeneidad de valores que se extienden de 0,6 a 7,3 µg/ml, producto de la misma presión de selección y de las posibles interferencias entre cepas de distintas sensibilidades a 1C<sub>3</sub>. Con estos valores se calculó la resistencia relativa, definida como el cociente entre la correspondiente CI<sub>50</sub> del pasaje y la CI<sub>50</sub> de la cepa original, detectando un máximo valor de 6,6 en el pasaje 15. Asimismo, se realizaron como control los pasajes sucesivos de HSV-1 sin droga, como se ve en la Tabla 13, determinando igual que lo expuesto anteriormente el título, la CI<sub>50</sub> y la resistencia relativa de cada pasaje. En este caso, como era de esperar, la variación observada estuvo algo más acotada, con valores de resistencia relativa entre 0,7 y 3,3.

Con el fin de evaluar esta situación con otro carragenano natural de ciertas características distintas a 1C<sub>3</sub>, se repitieron los pasajes sucesivos en presencia de 1T<sub>1</sub>. A medida que se aumentaban los pasajes se detectó que el tiempo necesario para obtener efecto citopático aumentaba ( de 48 a 96 h ) y el título viral disminuía. La causa fundamental de este hecho sería la doble acción que ejerce este compuesto, antiviral y virucida, que dificulta la obtención de cepas resistentes. En la Tabla 14 se resumen los resultados obtenidos. Los

efectos citopáticos de los pasajes fueron los característicos de la cepa control. Por lo tanto, se desistió en el intento de aislar variantes virales en presencia de 1T<sub>1</sub>.

Nº de pasaje en presencia de 1C <sub>3</sub>	Título (UFP/ml)	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Resistencia relativa*
0	1,1 x 10 <sup>7</sup>	1,1	1,0
1	7,8 x 10 <sup>5</sup>	0,9	0,8
2	2,4 x 10 <sup>7</sup>	2,6	2,4
3	1,4 x 10 <sup>7</sup>	3,2	2,9
4	3,5 x 10 <sup>7</sup>	2,6	2,4
5	1,5 x 10 <sup>7</sup>	1,0	0,9
6	5,4 x 10 <sup>7</sup>	0,6	0,5
7	2,0 x 10 <sup>7</sup>	2,1	1,9
8	4,5 x 10 <sup>6</sup>	3,5	3,2
9	1,6 x 10 <sup>7</sup>	4,6	4,2
10	1,0 x 10 <sup>8</sup>	1,5	1,4
11	6,0 x 10 <sup>7</sup>	1,6	1,5
12	6,1 x 10 <sup>7</sup>	4,3	3,9
13	2,2 x 10 <sup>7</sup>	4,1	3,7
14	4,2 x 10 <sup>6</sup>	6,8	6,2
15	4,1 x 10 <sup>7</sup>	7,3	6,6
16	2,9 x 10 <sup>8</sup>	3,1	2,8
17	3,2 x 10 <sup>8</sup>	4,4	4,0
18	2,5 x 10 <sup>8</sup>	3,1	2,8
19	6,2 x 10 <sup>6</sup>	6,5	5,9
20	5,1 x 10 <sup>6</sup>	4,9	4,4
21	1,4 x 10 <sup>8</sup>	3,2	2,9

**Tabla 12: Pasajes sucesivos de HSV-1 en presencia de 1C<sub>3</sub>. \* Resistencia relativa: CI<sub>50</sub> de cada pasaje de HSV-1 / CI<sub>50</sub> stock original.**

Nº de pasajes de HSV-1 (control)	Título (UFP/ml)	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Resistencia relativa*
0	1,1 x 10 <sup>7</sup>	1,1	1,0
1	3,3 x 10 <sup>7</sup>	1,1	1,0
2	1,2 x 10 <sup>8</sup>	3,0	2,7
3	9,5 x 10 <sup>6</sup>	0,8	0,7
4	3,0 x 10 <sup>7</sup>	0,8	0,7
5	2,2 x 10 <sup>7</sup>	1,7	1,5
6	1,0 x 10 <sup>8</sup>	1,1	1,0
7	4,6 x 10 <sup>7</sup>	0,8	0,7
8	4,3 x 10 <sup>7</sup>	2,0	1,8
9	5,4 x 10 <sup>7</sup>	2,4	2,2
10	3,4 x 10 <sup>8</sup>	0,6	0,5
11	4,2 x 10 <sup>8</sup>	3,6	3,3
12	3,6 x 10 <sup>8</sup>	2,1	1,9
13	7,1 x 10 <sup>8</sup>	1,8	1,6
14	1,3 x 10 <sup>8</sup>	1,8	1,6
15	2,0 x 10 <sup>8</sup>	2,8	2,5
16	4,8 x 10 <sup>8</sup>	3,7	3,4
17	9,1 x 10 <sup>8</sup>	2,4	2,2
18	2,5 x 10 <sup>8</sup>	1,1	1,0

**Tabla 13: Pasajes de HSV-1 en ausencia de 1C<sub>3</sub>.** \* Resistencia relativa: CI<sub>50</sub> de cada pasaje / CI<sub>50</sub> stock original.

Nº de pasajes en presencia de 1T <sub>1</sub>	Título (UFP/ml)	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Resistencia relativa*
0	1,2 x 10 <sup>7</sup>	0,7	1,0
1	6,5 x 10 <sup>6</sup>	1,0	1,4
2	2,2 x 10 <sup>7</sup>	1,2	1,7
3	2,1 x 10 <sup>7</sup>	1,9	2,7
4	2,0 x 10 <sup>6</sup>	n.d	n.d
5	9,9 x 10 <sup>6</sup>	2,2	3,1
6	2,8 x 10 <sup>4</sup>	2,0	2,8

**Tabla 14: Pasajes de HSV-1 en presencia de 1T<sub>1</sub>.** \* Resistencia relativa: CI<sub>50</sub> de cada pasaje / CI<sub>50</sub> stock original. n.d: no determinado

Para evaluar el patrón de resistencia generada por 1C<sub>3</sub>, se comparó con aciclovir (ACV), el antiviral actualmente en uso para las infecciones herpéticas, repitiendo el mismo procedimiento de pasajes sucesivos de HSV-1 en células Vero. Como se puede apreciar en la Tabla 15, la CI<sub>50</sub> aumentó muy rápidamente ya en los primeros pasajes y la resistencia relativa se vio incrementada notablemente a partir del pasaje 4 con un valor de 46,6 llegando a 60,0 en el pasaje 6, pudiendo así apreciar la selección de resistencia en escasos pasajes. Las diferencias con 1C<sub>3</sub> en los valores de resistencia relativa alcanzados fueron realmente notables.

Nº de pasaje en presencia de ACV	Título (UFP/ ml)	CI <sub>50</sub> ( µg/ml )	Resistencia relativa*
0	1,1 x 10 <sup>7</sup>	0,03	1,0
1	5,5 x 10 <sup>7</sup>	0,09	3,0
2	2,3 x 10 <sup>7</sup>	0,07	2,3
3	5,5 x 10 <sup>7</sup>	0,10	3,3
4	6,0 x 10 <sup>7</sup>	1,40	46,6
5	1,2 x 10 <sup>8</sup>	1,30	43,3
6	5,8 x 10 <sup>7</sup>	1,80	60,0

**Tabla 15: Pasajes de HSV-1 en presencia de ACV. \* Resistencia relativa: CI<sub>50</sub> de cada pasaje / CI<sub>50</sub> stock original.**

Junto con las variaciones descritas en la CI<sub>50</sub> en función de los pasajes sucesivos en presencia de 1C<sub>3</sub>, a partir del pasaje 11 se notaron cambios en el tipo de efecto citopático producido por el virus. En los pasajes iniciales se observaba redondeamiento celular, primero en focos sobre la monocapa, luego diseminado a todo el cultivo. A partir del pasaje 11, se observó la formación de células multinucleadas tipo sincicio, por fusión de células contiguas infectadas. Asimismo al titular cada pasaje, se detectó a partir del pasaje 11 un cambio notorio en el tamaño de las placas, coexistiendo placas chicas de 1 mm

(características de la cepa original) y placas grandes de 1,5-2 mm, hasta el pasaje 16, a partir del cual se mantuvo una homogeneidad en las placas de mayor tamaño. Esta característica en la citopatogenicidad de cada pasaje se cuantificó, tal como se muestra en la Tabla 16.

<b>N° de pasaje</b>	<b>Título (UFP/ml)</b>	<b>Placas chicas (%)</b>	<b>Placas grandes (%)</b>
11	$6,0 \times 10^7$	58,8	41,2
12	$6,5 \times 10^7$	89,2	10,8
13	$2,3 \times 10^7$	72,7	27,3
14	$4,0 \times 10^6$	70,0	30,0
15	$4,6 \times 10^7$	71,7	28,3
16*	$2,7 \times 10^8$	59,2	40,7

**Tabla 16: Características de las placas producidas por distintos pasajes con 1C<sub>3</sub>. \*A partir del pasaje 16, 100% de placas grandes.**

Para estudiar mejor las variaciones producidas en HSV-1 por los pasajes continuados en presencia de 1C<sub>3</sub>, se aislaron clones a partir de los pasajes 13 y 14. Cada clon fue amplificado en células Vero y los correspondientes stocks fueron titulados, a fin de determinar el tipo de placa que producían. Para cada clon se registró el título del stock, el tamaño de placa y el tipo de efecto citopático (sincicial ó no sincicial). Como puede verse en la Tabla 17, se estudiaron 9 clones del pasaje 13 y 6 clones del pasaje 14. Del total de 15 clones, 13 clones mostraron efecto citopático diferente al stock original con formación de sincicios y muchos de ellos también produjeron placas de mayor tamaño. Sólo 2 clones del pasaje 14 ( 14-4 y 14-6) retuvieron el fenotipo no sincicial de la cepa original.

Clones seleccionados con 1C <sub>3</sub>	Título del stock ( UFP/ml )	Efecto citopático	Tamaño de placa
13-1	3,6 x 10 <sup>8</sup>	sincicial	1 mm
13-2	4,1 x 10 <sup>8</sup>	sincicial	1,5 mm
13-3	3,5 x 10 <sup>8</sup>	sincicial	1 mm
13-4	4,8 x 10 <sup>8</sup>	sincicial	> 2 mm
13-5	1,0 x 10 <sup>9</sup>	sincicial	1,5 - 2 mm
13-6	8,3 x 10 <sup>8</sup>	sincicial	1,5 - 2 mm
13-7	1,2 x 10 <sup>9</sup>	sincicial	1 mm
13-8	1,8 x 10 <sup>9</sup>	sincicial	> 2 mm
13-9	2,3 x 10 <sup>9</sup>	sincicial	1,5 - 2 mm
14-1	4,6 x 10 <sup>7</sup>	sincicial	1,5 mm
14-2	6,4 x 10 <sup>7</sup>	sincicial	1 - 1,5 mm
14-3	6,5 x 10 <sup>7</sup>	sincicial	1 mm
14-4	2,1 x 10 <sup>7</sup>	no sincicial	1 mm
14-5	6,7 x 10 <sup>7</sup>	sincicial	> 2 mm
14-6	7,7 x 10 <sup>7</sup>	no sincicial	1 - 1,5 mm

**Tabla 17: Características citopáticas de los distintos clones obtenidos de los pasajes 13 y 14 en presencia de 1C<sub>3</sub>.**

Como control, se hizo el mismo procedimiento de clonado con el pasaje 10 de HSV-1 en ausencia del compuesto. Se estudiaron 6 clones y ninguno mostró variaciones en el tamaño de placas ni fenotipo sincicial, indicando que estas características fueron efectivamente inducidas por 1C<sub>3</sub> y no por los pasajes sucesivos en células Vero.

#### **IV. 2. Susceptibilidad a polisacáridos de las variantes de HSV-1**

Con el fin de comprobar si el fenotipo sincicial de los clones aislados se relacionaba con la resistencia parcial a 1C<sub>3</sub> y a otros tipos de polisacáridos, se procedió a determinar la CI<sub>50</sub> por plaqueo directo en monocapas de células Vero, frente a distintos compuestos: 1C<sub>3</sub>, los

otros dos carragenanos 1T<sub>1</sub> y 1C<sub>1</sub>, otros polisacáridos como heparina y dextran sulfato, y aciclovir, ya que está descrito que algunas cepas sinciciales de HSV son resistentes a aciclovir (Morfin y col, 1996; Pertel y col, 1996; Andrei y col, 1997; Pelosi y col, 1997).

Clon	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup> (RR) <sup>b</sup>					
	1C <sub>3</sub>	1T <sub>1</sub>	1C <sub>1</sub>	Aciclovir	Heparina	DS 8000
F	1,1	0,4	3,2	0,013	1,3	1,8
13-3	3,9 (3,5)	0,8 (2,0)	8,4 (2,6)	0,010 (0,8)	6,8 (5,2)	5,2 (2,9)
13-8	1,2 (1,1)	0,6 (1,5)	2,6 (0,8)	0,018 (1,4)	6,3 (4,8)	4,4 (2,4)
13-9	4,5 (4,1)	3,9 (9,7)	9,7 (3,0)	0,006 (0,5)	>10 (>7,7)	3,4 (1,9)
14-1	11,6 (10,5)	2,9 (7,2)	40,0 (12,5)	0,032 (2,5)	13,2 (10,1)	10,0 (5,5)
14-3	3,9 (3,5)	1,2 (3,0)	6,8 (2,1)	n.d	3,1 (2,4)	1,0 (0,6)
14-4	6,4 (5,8)	8,1 (20,5)	12,1 (3,8)	n.d	3,7 (2,8)	2,1 (1,2)

**Tabla 18 : Susceptibilidad a distintos compuestos de las variantes de HSV-1.** <sup>a</sup> CI<sub>50</sub> (µg/ml) determinada por reducción de placas en células Vero. <sup>b</sup> Resistencia Relativa: relación entre la CI<sub>50</sub> para cada variante y la CI<sub>50</sub> de la cepa F original.

Como se observa en la Tabla 18 las variantes de HSV-1 mostraron un rango variado de susceptibilidad frente a 1C<sub>3</sub> respecto de la cepa parental. Los valores más altos de resistencia los presentaron las variantes 14-1 y 14-4, la primera de fenotipo sincicial y la segunda no. Además un clon típicamente sincicial como el 13-8 mostró una CI<sub>50</sub> similar a la cepa original, en tanto que otros clones sinciciales (13-3, 13-9, 14-3) fueron moderadamente resistentes con valores de CI<sub>50</sub> 3-4 veces superiores al de la cepa F. Por lo tanto se puede concluir que el fenotipo sincicial es independiente de la resistencia a 1C<sub>3</sub>. La susceptibilidad de los clones frente a los otros carragenanos y polisacáridos ensayados fue similar que ante 1C<sub>3</sub>, en tanto que la mayoría de los clones fueron susceptibles al ACV. Se eligieron las variantes 13-3, 13-8 y 14-1 con diferente nivel de susceptibilidad a 1C<sub>3</sub> a fin de caracterizar su capacidad sincicial y tratar de relacionarla con las propiedades biológicas de estas variantes y las alteraciones inducidas por el tratamiento con 1C<sub>3</sub>.

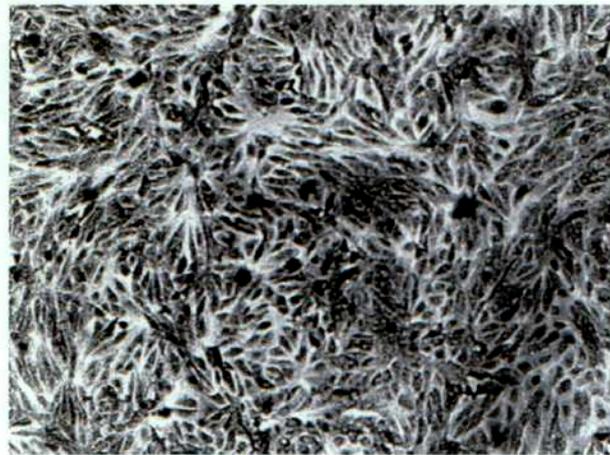
### **IV. 3. Caracterización de los sincicios producidos por las variantes de HSV-1**

La mayoría de los clones aislados mostraron capacidad de formar sincicios en células Vero, induciendo una extensiva fusión célula-célula en los cultivos infectados, a diferencia de lo que se observa con la cepa salvaje que produjo redondeamiento celular y desprendimiento ( Figura 18 ).

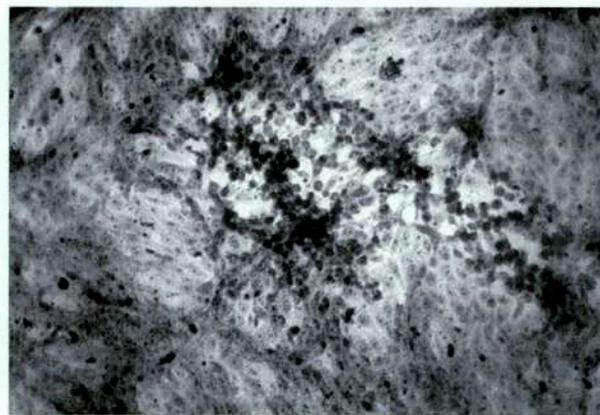
Para establecer si la capacidad de formar sincicios era dependiente del tipo de célula, se ensayaron diferentes cultivos susceptibles a HSV-1. Con células CV-1 ( línea celular de riñón de mono verde africano, como las Vero), las variantes produjeron un efecto citopático comparable con el obtenido en células Vero ( Figura 19 ). La capacidad fusogénica se puso de manifiesto en el tamaño de los sincicios pues se formaron policariocitos con un elevado número de núcleos/sincicios en ambos tipos de células (Tabla 19 ). Por el contrario, en células HEp-2, astrocitos y células PH las variantes no formaron sincicios sino que dieron el redondeamiento característico de la cepa salvaje.

<b>Tipo de célula</b>	<b>Fenotipo</b>	<b>Núcleos/sincicio</b>
<b>Vero</b>	sincicial	708 ± 76
<b>CV1</b>	sincicial	588 ± 150
<b>HEp-2</b>	redondeamiento	
<b>Astrocitos</b>	redondeamiento	
<b>PH</b>	redondeamiento	-

**Tabla 19: Caracterización de los sincicios producidos por la variante 13-8.** Se infectaron monocapas de células crecidas en cubreobjetos con la cepa sincicial 13-8 ( m: 0,01 UFP/célula) y se incubó a 37°C durante 48 h. Luego se lavaron con PBS y se visualizó los sincicios por tinción con Giemsa y microscopía. Los resultados son el promedio del recuento de 20 sincicios ± DE.



A

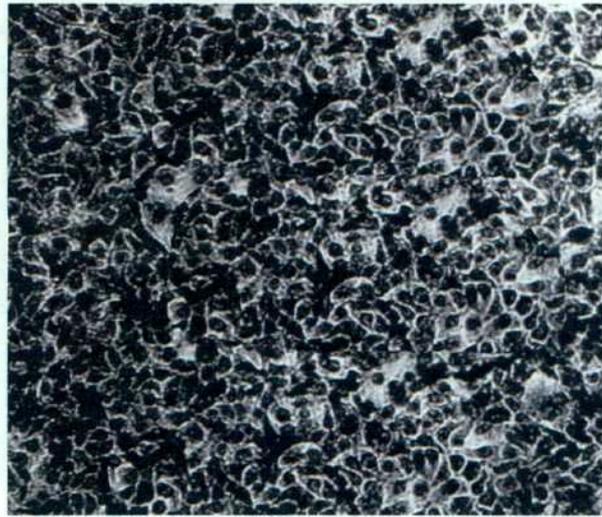


B

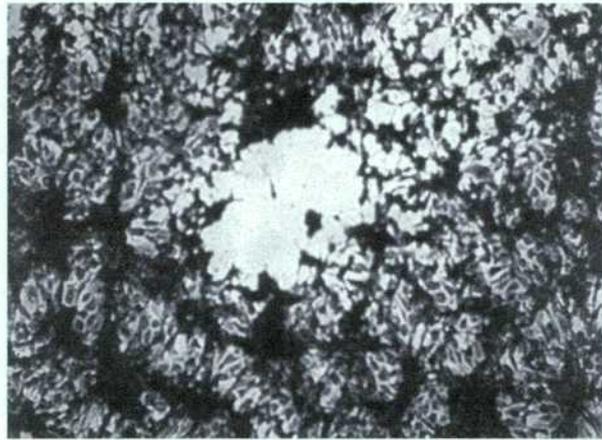


C

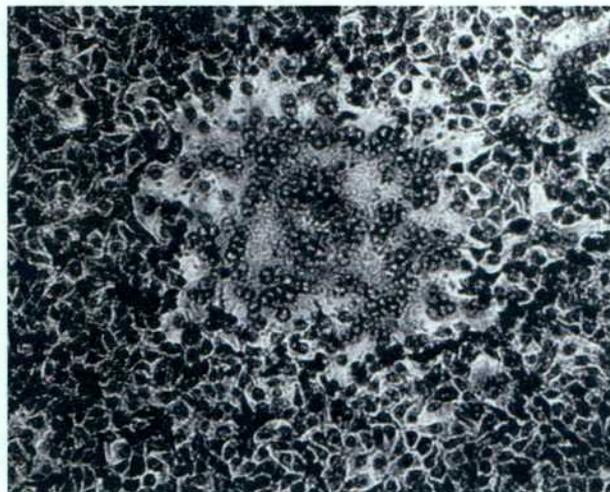
**Figura 18: Efecto citopático en células Vero infectadas con HSV-1.** Monocapas de células Vero se infectaron con 100 UFP de la variante sincicial 13-8 y la cepa original de HSV-1 (F). A las 48 h p.i. se tiñeron las monocapas con Giemsa. Control celular (A), cepa F (B), clon 13-8 (C) (100X).



A



B



C

**Figura 19: Efecto citopático en células CV1 infectadas con HSV-1.** Monocapas de células CV1 se infectaron con 100 UFP de la variante sincicial 13-8 y la cepa original de HSV-1 (F). A las 24 h p.i. se tiñeron las monocapas con Giemsa. Control celular (A), cepa F (B), clon 13-8 (C) (100X).

#### **IV. 4. Susceptibilidad de las variantes de HSV-1 a melitina y ciclosporina A**

Se ha descrito que mutaciones no letales en algunos de los genes de HSV-1, incluyendo U<sub>L</sub>20, U<sub>L</sub>24, gB y gK, producen mutantes formadoras de sincicios (Pertel y col 1996; Dolter y col, 1994). Para una primera aproximación de la localización de la alteración responsable del fenotipo sincicial en nuestras mutantes, se utilizaron dos inhibidores de la formación de sincicios inducidos por HSV.

La ciclosporina A inhibe la formación de sincicios dando redondeamiento celular si la mutación no está en la cola citoplasmática de gB (Walev y col, 1994). Cuando se titularon los clones 13-8 y 14-1, en presencia de distintas concentraciones de ciclosporina A ( 0,6-100 µg/ml), no se observó ninguna inhibición de la formación de sincicios y la infectividad de las mutantes no mostró reducción significativa (Tabla 20). Esto implicaría que las mutaciones responsables del fenotipo sincicial estarían en gB.

<b>Cepa</b>	<b>Melitina</b>	<b>Ciclosporina A</b>	<b>MM</b>
<b>F</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>clon 13-8</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>clon 14-1</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>

**Tabla 20: Capacidad fusogénica de las variantes sinciciales frente a diferentes inhibidores.** Monocapas de células Vero se infectaron con 40 UFP/pocillo de cada clon. Después de la adsorción, se descartó el inóculo y las células se cubrieron con MM en presencia ó ausencia de distintas concentraciones de los inhibidores. Luego de 48 h de incubación a 37°C se visualizaron y contaron las placas previa tinción de Giemsa. R: Redondeamiento celular S: Sincicios. MM: medio de mantenimiento.

La melitina, un veneno de abeja que bloquea las ATPasas de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, inhibe la formación de sincicios si la mutación se encuentra en gK (Baghian y Kousoulas, 1993). Cuando se titularon, en presencia de distintas concentraciones de melitina (0,06-1 µM), los mismos clones utilizados con la ciclosporina A no mostraron reducción de la infectividad ni inhibición en la formación de sincicios (Tabla 20). Esto sugeriría que las mutaciones sinciciales de estos clones no estarían involucrando a la gK.

Por lo tanto, estos resultados indicarían que la mutación responsable del fenotipo sincicial inducido por 1C<sub>3</sub> estaría localizada en gB. A su vez, la resistencia de algunos de estas

variantes a 1C<sub>3</sub>, con independencia de su capacidad sincicial, podría indicar una alteración en gC.

#### **IV. 5. Virulencia para ratón de las variantes sinciciales**

En una variante sincicial de HSV-1 con mutación en gB se han descrito alteraciones en la patogenicidad para ratón ( Goodman y col, 1990), sugiriendo un posible rol de gB en la infección in vivo con HSV-1. A fin de comparar la capacidad patogénica de los clones sinciciales aislados con 1C<sub>3</sub> respecto a la cepa parental F se procedió a la inoculación por vía intraperitoneal de distintas diluciones de virus, en ratones OF1 de 4 a 6 semanas de vida. En la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos, pudiendo apreciarse que tanto la cepa parental como las sinciciales presentaron índices de virulencia (IV) parecidos con valores del orden de  $10^5$  UFP/DL<sub>50</sub>, con un pequeño atraso en el día promedio de muerte para los clones sinciciales. Por lo tanto, el modelo de infección intraperitoneal en ratones OF1 es poco susceptible a la infección con HSV-1, tanto para la cepa original como para las variantes sinciciales. Con el objeto de exacerbar las posibles diferencias en la patogenicidad de las cepas sinciciales con respecto a la cepa salvaje se trató de encontrar un sistema más sensible a la infección con HSV-1.

Con tal propósito, se inocularon por vía intracerebral ratones lactantes de 2-3 días, con distintas diluciones de virus. Como lo muestra la Tabla 21, el modelo resultó más susceptible para medir la virulencia de HSV-1 ya que los índices de virulencia oscilaron entre 0,19-0,54 UFP/DL<sub>50</sub>, pero nuevamente no hubo variaciones importantes entre las variantes sinciciales y la cepa salvaje.

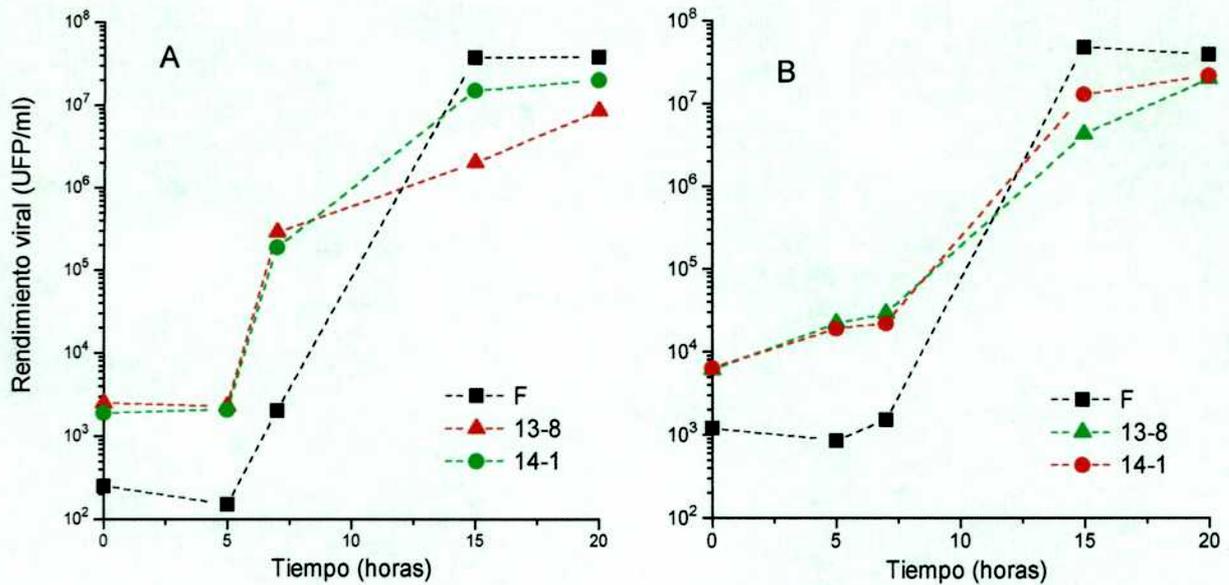
	Cepa F	HSV-1 Clon 13-3	Clon 13-8
<i>Vía intraperitoneal</i>			
Titulo (UFP/ml)	$2,6 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
Titulo (DL <sub>50</sub> /ml)	$0,8 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$9,5 \times 10^2$
Indice de virulencia (UFP/DL <sub>50</sub> )	$3,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
Día promedio de muerte	$13,5 \pm 0,7$	$10,2 \pm 3,4$	$12,3 \pm 5,7$
<i>Vía intracerebral</i>			
Título (UFP/ml)	$1,2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$
Título (DL <sub>50</sub> /ml)	$2,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
Indice de virulencia (UFP/DL <sub>50</sub> )	0,54	0,21	0,20
Día promedio de muerte	$4,3 \pm 1,0$	$4,6 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,9$

**Tabla 21: Virulencia para ratón de las variantes sinciciales.** Se inocularon ratones OF1 de 4-6 semanas de edad por vía intraperitoneal y neonatos por vía intracerebral con diluciones seriadas decimales correspondientes a las cepas sinciciales y parental. La dosis letal 50% se calculó analizando el método de Reed y Muench. El índice de virulencia se calculó como la relación: Título (UFP/ ml) / Título (DL<sub>50</sub>/ ml ).

#### IV. 6. Ciclo de crecimiento

Se estudió el ciclo de crecimiento de las variantes en células Vero y, en particular, las etapas tempranas del ciclo, adsorción y penetración, en comparación con la cepa parental, para establecer si el fenotipo sincicial y las probables alteraciones en gB/gC podrían estar asociados a algún cambio en la capacidad de multiplicación de las variantes.

En primer término, se realizaron las curvas de crecimiento en células Vero de los 3 virus, titulándose la producción de virus intra y extracelular. Como se observa en la Figura 20, el ciclo de crecimiento para las variantes sinciciales mostró escasas diferencias con respecto a la cepa original, igualándose la producción viral a las 20 h de infección.



**Figura 20: Curvas de crecimiento intracelular y extracelular.** Se infectaron células Vero con las distintas variantes y la cepa control ( m:1 ). A los distintos tiempos p.i, se determinó por UFP en células Vero el rendimiento viral intracelular (A) y extracelular (B). Los resultados son el promedio de dos experiencias  $\pm$  DE.

También se comparó el comportamiento de las variantes 13-8 y 14-1 y la cepa parental en las etapas tempranas de la infección, estudiando la adsorción e internalización en células Vero. No se encontraron diferencias ni en la eficiencia ni en la cinética de ambos procesos entre las variantes y la cepa F.

## **V. Evaluación de la actividad antiviral in vivo**

### **V.1 Modelo de infección vaginal con HSV-2**

Con el fin de poner a punto un modelo experimental que reprodujera las infecciones vaginales provocadas por HSV-2 y posibilite las pruebas in vivo de los antivirales seleccionados, se procedió a ensayar la inoculación por esa vía de diferentes cepas de ratones (OF1 y BALB/c) y cepas de HSV-2 (G, 244 BE/94 y MS).

En primer término, se utilizó la cepa G de HSV-2 que fue la empleada en los estudios in vitro. Como se puede observar en la Tabla 22, los resultados obtenidos para los ratones OF1 infectados con esta cepa fueron muy irregulares, no guardando una relación adecuada dosis-respuesta. Tanto la morbilidad, caracterizada por inflamación, lesión ó parálisis, como la mortalidad no se incrementaron proporcionalmente al aumentar la dosis de virus inoculada.

Los ratones BALB/c infectados con cepa G mostraron una mejor relación entre dosis inoculada y respuesta. Sin embargo, los niveles de mortalidad alcanzados fueron aun muy bajos e irregulares y muy retrasado el día promedio de muerte (Tabla 22).

Para tratar de conseguir mejor respuesta en los animales se probaron otra cepa de referencia, MS, y un aislamiento clínico, 244 BE/94, utilizando sólo los ratones BALB/c. La cepa 244 BE/94 produjo un alto porcentaje de morbilidad y mortalidad sólo con dosis de virus superiores a  $10^7$  UFP. (Tabla 22). Por el contrario, la cepa MS exhibió el mayor grado de virulencia, ya que con una dosis de  $2,7 \times 10^5$  UFP produjo enfermedad en todos los animales, caracterizada por inflamación y enrojecimiento, pérdida de pelo y lesiones ulcerosas perivaginales, y parálisis flácida bilateral, con un 90% de mortalidad en menos de 10 días. Con esa misma dosis, la respuesta con todas las otras cepas fue mínima ó nula.

Cepa ratón	Cepa viral	N° de ratonas	UFP por dosis	n°/total	Morbilidad %	Día promedio $\pm$ 0	n°/total	Mortalidad %	Día promedio sobrevida
OFI	G	5	$1,6 \times 10^6$	1/5	20,0	$11,0 \pm 0$	0/5	0	
		5	$1,6 \times 10^5$	2/5	40,0	$11,5 \pm 0,7$	1/5	20,0	$18,0 \pm 0$
		5	$1,6 \times 10^4$	4/5	80,0	$15,2 \pm 3,8$	0/5	0	sobrevida
	G	5	$6 \times 10^6$	4/5	80,0	$5,0 \pm 0$	2/5	40,0	$15,5 \pm 4,9$
		5	$6 \times 10^5$	3/5	60,0	$5,0 \pm 0$	1/5	20,0	$19,0 \pm 0$
BALB/c	MS	10	$2,7 \times 10^5$	10/10	100	$7,2 \pm 0,4$	9/10	90,0	$9,7 \pm 2,0$
		9	$2,7 \times 10^4$	8/9	88,0	$7,4 \pm 0,7$	4/9	44,0	$11,2 \pm 2,1$
		10	$2,1 \times 10^6$	10/10	100	$6,7 \pm 0,5$	10/10	100	$8,1 \pm 0,9$
	244 BE/94	9	$2,1 \times 10^6$	4/9	44,4	$7,0 \pm 0$	3/9	33,3	$13,0 \pm 0$

Tabla 22: Comparación de distintos modelos de infección vaginal con HSV-2. Todos los animales se inocularon con una sola dosis de HSV-2, previa administración de medroxiprogesterona 5 días antes. Se siguió la evolución de morbilidad y mortalidad a lo largo de 20 días.

## V.2. Efecto protector de 1C<sub>3</sub> y 1T<sub>1</sub>

Obtenidas las condiciones óptimas de infección herpética por vía vaginal en un modelo murino, se procedió a ensayar la actividad protectora de 1C<sub>3</sub> y 1T<sub>1</sub> que fueron los carragenanos más efectivos in vitro.

Para ello, se infectaron ratones BALB/c con  $1,6 \times 10^5$  UFP de HSV-2 cepa MS por vía intravaginal. Se trabajó con 4 lotes de animales: el primero se lo utilizó como control, inoculando dos dosis de PBS 5 min antes de la infección y a las 2 h post-infección; el segundo lote recibió sólo una dosis de 1C<sub>3</sub> ó 1T<sub>1</sub> 5 min antes de la infección; el tercero recibió 3 dosis, 5 min antes de la infección, 2 h y 24 h post-infección y el cuarto lote, 4 dosis, 5 min antes de la infección, 2 h, 5 h y a las 24 h post-infección.

Lote	dosis 1C <sub>3</sub>	Mortalidad			LV UFP/ml
		n°/total	%	día promedio	
control		8/10	80,0	10,2 ± 4,2	4300
1°	1	8/10	80,0	8,7 ± 2,3	360
2°	3 (0, 2, 24)*	6/11	54,5	9,0 ± 2,5	230
3°	4 (0, 2, 5, 24)	7/10	70,0	12,0 ± 4,3	140

**Tabla 23: Efecto antiviral del carragenano 1C<sub>3</sub> en infecciones intravaginales murinas por HSV-2.**

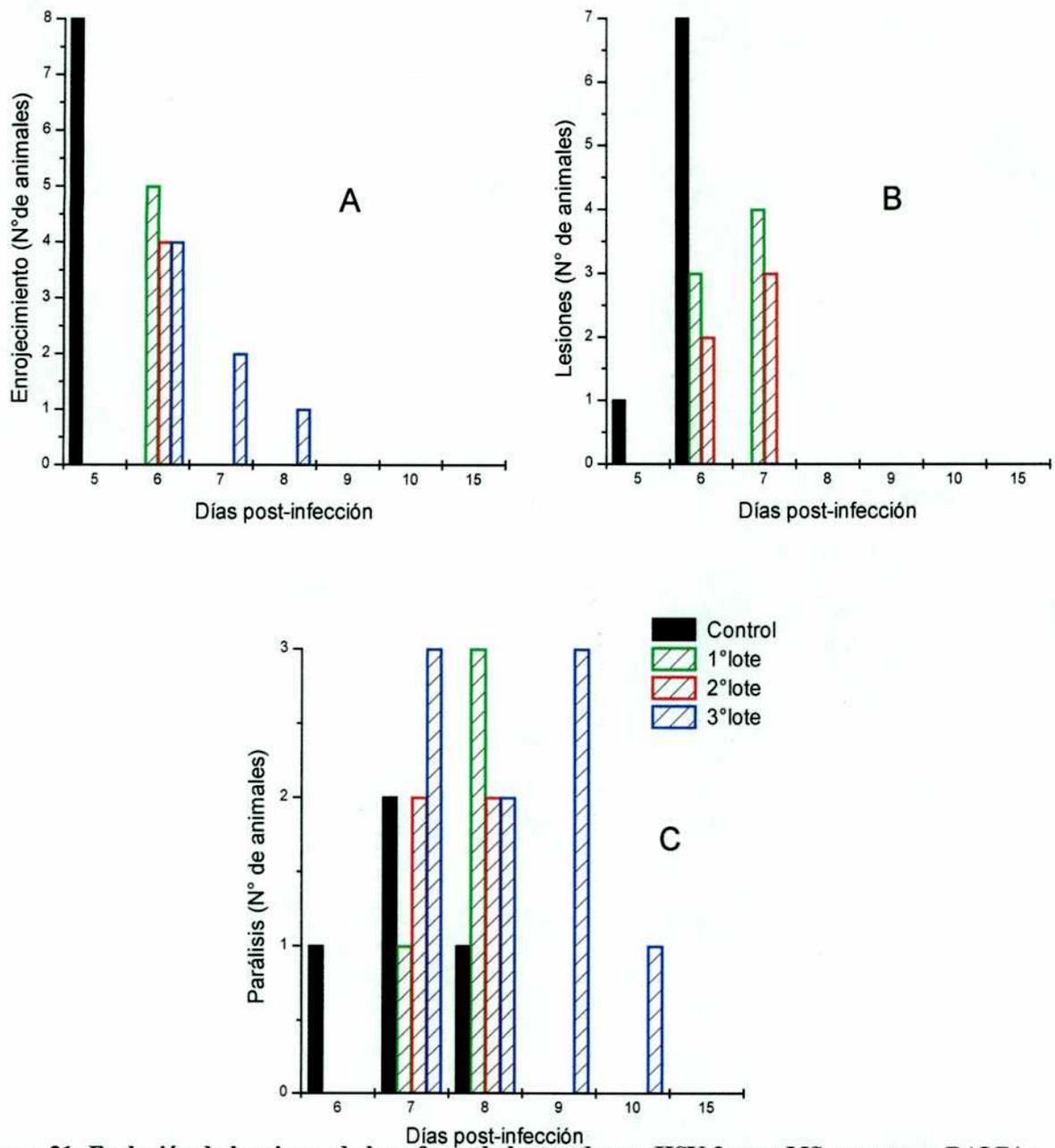
\*Tiempo de aplicación de las dosis, 0: 5 min antes de la infección, 2: 2 h post-infección, 5: 5 h post-infección, 24: 24 h post-infección. LV: Lavado vaginal a los 3 días post-infección.

Como se puede observar en la Tabla 23, el tratamiento con una sola dosis de 1C<sub>3</sub> inmediatamente antes de la infección no fue efectivo ya que los valores de mortalidad y día promedio de muerte resultaron similares a los obtenidos para el grupo control. Al aumentar el tratamiento a 3 dosis la mortalidad se redujo al 54,5% respecto del 80% obtenido para el grupo control. El agregado de una cuarta dosis de 1C<sub>3</sub> no resultó en un aumento de la protección. En todos los lotes tratados con 1C<sub>3</sub> la detección de partículas virales en los

lavados vaginales realizados al tercer día post-infección mostró un notable descenso en la cantidad de virus infectivo producido, ya que para los 3 casos los títulos virales experimentaron una reducción superior al 90% respecto del control, mostrando un efecto gradual de acuerdo al número de dosis de  $1C_3$  inoculadas.

En la Figura 21 se presenta el detalle de la evolución diaria de signos de morbilidad en los distintos lotes de animales infectados con HSV-2 y tratados con  $1C_3$ .

Los animales inoculados en el lote control desarrollaron la sintomatología característica de manera temprana, detectándose a los 5 días post-infección enrojecimiento e inflamación de la zona perivaginal (Figura 21 A) en el 80% de los ratones. La patología cursó rápidamente con desarrollo de lesiones conspicuas (Figura 21 B) que aparecieron en la mayoría de los animales al 7° día post-infección para terminar con parálisis flácida del tren posterior (Figura 21 C) seguida de muerte. Esta sintomatología también se observó en los lotes tratados con  $1C_3$  aunque en forma retrasada respecto del lote control. Estas manifestaciones resultaron evidentes para el lote que recibió 4 dosis del compuesto ya que el enrojecimiento perivaginal continuó apareciendo hasta el día 8° post-infección. Resultó sorprendente el hecho de no observar lesiones en estos animales tal como ocurrió en el control y los lotes 1 y 2, a pesar de que la proporción de animales paralíticos como así también el porcentaje de mortalidad no fue significativamente menor a dichos lotes. Este hecho podría indicar que si bien el aumento en el número de dosis de tratamiento reduciría las lesiones locales, no sería capaz de impedir la diseminación viral dentro del organismo, causa de la parálisis y posterior muerte de los animales.



**Figura 21: Evolución de los signos de la enfermedad causada por HSV-2 cepa MS en ratones BALB/c tratados con 1C<sub>3</sub>. 1º lote: tratados con 1 dosis, 2º lote: tratados con 3 dosis, 3º lote: tratados con 4 dosis, Control: tratados con 2 dosis de PBS. A: enrojecimiento e inflamación, B: lesiones ulcerosas con pérdida de pelo, C: parálisis.**

Como lo muestra la Tabla 24, los resultados obtenidos con 1T<sub>1</sub> fueron altamente satisfactorios.

Lote	dosis 1T <sub>1</sub>	Mortalidad			LV UFP/ml
		n°/total	%	día promedio	
<b>control</b>		8/10	80,0	10,2 ± 4,2	4300
1°	1	1/10	10,0	16,0 ± 0	<10
2°	3 (0, 2, 24)*	0/10	0,0	sobrevida	<10
3°	4 (0, 2, 5, 24)	0/10	0,0	sobrevida	<10

**Tabla 24: Efecto antiviral del carragenano 1T<sub>1</sub> en infecciones intravaginales murinas por HSV-2.**

\* Tiempo de aplicación de las dosis, 0: 5 min antes de la infección, 2: 2 h post-infección, 5: 5 h post-infección, 24: 24 h post-infección. LV: Lavado vaginal a los 3 días post-infección.

La capacidad protectora de este carragenano fue muy superior a la de 1C<sub>3</sub>, obteniéndose un 90% de protección con la aplicación de una sola dosis y el 100% de sobrevida al aumentar su dosificación. En el 10% de los animales tratados con 1 sola dosis que se produjo mortalidad, la sintomatología fue similar al control, pero se extendió el día promedio de muerte de 10,2 a 16 días. Las diferencias obtenidas en mortalidad entre los animales tratados con 1T<sub>1</sub> respecto del control fueron significativas (P<0,001), mientras que para 1C<sub>3</sub> no presentaron diferencias significativas (P<0,05). No se detectó infectividad en los tres lotes de animales tratados con 1T<sub>1</sub>.



El presente estudio acerca de las propiedades biológicas de los carragenanos obtenidos del alga *Gigartina skottsbergii* demostró que la mayor actividad antiviral estuvo asociada con los carragenanos naturales (kappa/iota, mu/nu y lambda) extraídos de los diferentes estadios del alga, en tanto que los derivados ciclados preparados por tratamiento alcalino de los anteriores en general mostraron menor efecto antiviral. Como se observa en la Tabla 2, las alteraciones producidas en los compuestos en el proceso de ciclación comprenden en muchos casos un aumento de la proporción de 3, 6-anhidro galactosa y una disminución del peso molecular. Sin embargo, no pudo establecerse claramente una relación estructura-función ya que las mayores variaciones observadas en las características químicas no siempre se correspondieron con la mayor pérdida de actividad (Tablas 2 y 3).

Para otros polisacáridos sulfatados, se ha descrito que la actividad antiviral puede estar aportada por distintos factores estructurales como peso molecular, grado de sulfatación, distribución de los grupos sulfatos y tipo de uniones poliméricas ( Neyts y col, 1992 ). Respecto del peso molecular y el grado de sulfatación, todos los compuestos ensayados caen dentro del rango descrito para una buena capacidad antiviral, ya que presentan un contenido de SO<sub>3</sub>Na superior al 20% y el peso molecular oscila entre 12 y 198 kD. Por ejemplo, con dextran sulfato se ha observado que con un peso molecular entre 10 y 500 kD no hay grandes variaciones en la actividad antiviral contra distintos virus envueltos, en tanto que con muestras de peso molecular inferior a 5 kD se pierde bruscamente la capacidad inhibitoria (Witvrouw y col, 1991). En nuestro caso, también se cumplieron estas condiciones ya que todos los compuestos ensayados con peso molecular mayor a 12 kD mostraron un grado variable de actividad antiherpética (Tabla 3), en tanto que la hidrólisis de los carragenanos lambda produjo oligosacáridos sulfatados de bajo peso molecular y que perdieron totalmente sus propiedades biológicas.

Para el estudio más detallado de la actividad antiviral de los carragenanos se seleccionaron los compuestos más activos dentro de cada tipo estructural: 1C<sub>1</sub> (kappa/iota), 1C<sub>3</sub> (mu/nu) y 1T<sub>1</sub> (lambda).

Hay tres puntos muy importantes que cabe destacar inicialmente respecto de estos tres compuestos:

- 1) el amplio espectro de la actividad antiherpética; 2) la falta de citotoxicidad; 3) la carencia de actividad anticoagulante significativa.

Los tres carragenanos fueron igualmente activos contra cepas de referencia de HSV-1 y HSV-2 como contra aislamientos clínicos obtenidos en el país y contra variantes TK-resistentes al aciclovir (Tabla 6), antiviral actualmente en uso generalizado para el tratamiento de las infecciones herpéticas. Estas características abren la posibilidad del ensayo de los carragenanos en combinación con aciclovir para determinar si existe o no sinergismo entre ambos, como etapa previa del empleo de ambos compuestos en terapias combinadas, única posibilidad actual de enfrentar con éxito un tratamiento prolongado de infección herpética en individuos inmunocomprometidos. Estos ensayos tienen buenas perspectivas de éxito ya que, carragenanos y aciclovir tendrían distintos blancos de ataque en la infección viral.

Además de mostrar amplitud de espectro de acción respecto del virus, los carragenanos también fueron activos en distintos tipos celulares, incluyendo células de origen neural como los astrocitos murinos y células de prepucio humano (PH) (Tabla 7). Esto indica que su acción es independiente de la naturaleza de la células y la cantidad de receptores celulares. Estos resultados señalan una ventaja para estos polisacáridos respecto de otros tipos de antivirales ensayados, en los que se detectó diferencias en la actividad antiviral medida a través de la  $CI_{50}$  según el tipo celular utilizado (De Clercq, 1982).

La falta de toxicidad de los tres carragenanos se demostró utilizando distintas metodologías. Tanto por recuento de células viables como por lectura de densidad óptica en la reacción de MTT, los tres carragenanos no afectaron la viabilidad celular hasta la mayor concentración ensayada (1 mg/ml) sobre células confluentes, que son las utilizadas para los ensayos antivirales. En consecuencia, los valores del índice de selectividad para estos compuestos están muy por encima de los niveles mínimos (alrededor de 10) que avalan el estudio más detallado de las propiedades antivirales de una sustancia. Asimismo se demostró que los carragenanos tampoco afectan la capacidad de crecimiento de células en proliferación, luego de 72 horas de incubación en presencia de concentraciones del orden de 250-500  $\mu\text{g/ml}$ , aproximadamente 500 veces superiores a la concentración efectiva antiviral (Tabla 5). En concordancia con estos resultados, la síntesis de proteínas celulares tampoco resultó significativamente afectada por los carragenanos, con la sola excepción de  $1T_1$  que redujo la síntesis de proteínas al 40% al ser utilizado en una dosis de 500  $\mu\text{g/ml}$ . Sin embargo, debe hacerse notar que hasta 250  $\mu\text{g/ml}$ , concentración muy

superior a la  $CI_{50}$  (que está en el orden de 1  $\mu\text{g/ml}$ ) ninguno de los tres carragenanos afectó el metabolismo celular, la viabilidad ni la capacidad proliferativa, remarcando la gran selectividad de los compuestos.

Numerosos polisacáridos con actividad antiviral han presentado la desventaja de tener una notoria acción anticoagulante, lo que frustra sus posibilidades de aplicación terapéutica (Yamada y col 1997; Hirata y col, 1994). Como se observa en la Tabla 4, los carragenanos aislados de *Gigartina skottsbergii* no presentan este inconveniente ya que se requieren concentraciones muy superiores a la  $CI_{50}$  para producir alteraciones en el tiempo de trombina y algunos compuestos como  $1C_1$  y  $1C_3$ , ensayados en dosis de hasta 200  $\mu\text{g/ml}$ , sólo llegan a duplicar este valor.

En los últimos años, varios trabajos han reportado la actividad antiviral de distintos polisacáridos sulfatados, efectivos contra HSV, HIV y CMV. Los compuestos ensayados incluyen mananos, glucanos, galactanos y fucanos sulfatados ( McClure y col, 1991; Koizumi y col 1993; Beutler y col, 1993; Damonte y col, 1994; Witvrouw y col 1994; Kolender y col, 1997) como así también  $\kappa$ -,  $\iota$ - y  $\lambda$ -carragenanos ( Gonzalez y col, 1987; Nakashima y col, 1987; Baba y col, 1988; Girond y col, 1991; Hamasuna y col, 1993), de origen comercial ó extraídos de fuentes naturales. Sin embargo, los resultados presentados en cuanto a la falta de efectos citotóxicos y citostáticos, la carencia de actividad anticoagulante, el amplio espectro de acción antiherpética y la eficacia de  $1C_1$ ,  $1C_3$  y  $1T_1$  de bloquear la multiplicación de HSV aún a multiplicidades de infección muy elevadas, marcan importantes ventajas de estos carragenanos naturales, que nos impulsaron a estudiar su modo de acción y probarlos en modelos de infección herpética in vivo.

Los estudios del mecanismo de acción de los distintos tipos de carragenanos sobre HSV-1 indican que  $1C_3$ ,  $1C_1$  y  $1T_1$  afectarían principalmente la etapa inicial de adsorción viral, demostrado tanto por ensayos de infectividad como de unión de viriones marcados radiactivamente (Figuras 13 y 14). También se analizó la posibilidad de que estos compuestos actúen además sobre una etapa posterior en el ciclo viral, dado que hay trabajos de otros grupos que han mostrado que polisacáridos sulfatados pueden actuar en etapas posteriores a la unión a la célula (Gonzalez y col, 1987; Callahan y col, 1991; De Vreese y col, 1996). Ninguno de los tres compuestos afectó la internalización (Figura 15), ni la síntesis de proteínas tempranas y tardías de HSV (Figuras 16 y 17).

Se sabe que la interacción inicial de HSV con la célula huésped es a través de la unión de los viriones a los residuos heparan sulfato de proteoglicanos de la membrana celular. Hasta ahora, se han descrito diez glicoproteínas de membrana en HSV. Dos de ellas, gC y gB, tienen capacidad de unirse a heparan sulfato y heparina (Laquerre y col, 1998; Herold y col, 1991, 1994; Spear, 1993). La unión inicial a heparan sulfato ocurre a través de gC ( Herold y col, 1994, Goodman y col, 1990 ) actuando gB como antirreceptor en ausencia de gC (Klupp y col, 1997; Herold y col, 1994; Weizhong y col, 1988). Luego, la glicoproteína gD se une a un segundo receptor de naturaleza proteica. Hay 3 clases de moléculas en la superficie celular que pueden actuar como receptores para gD: HVEM, también llamada HveA, un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral; nectin-1, conocida como Prr1 o HveC, y nectin-2, también llamada Prr2 o HveB, ambos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas; y sitios especiales en heparan sulfato generados por 3-O- sulfotransferasas específicas (Terry-Allison y col, 2001, 1998). Esta unión a gD dispara el evento de fusión de la membrana celular con la envoltura de HSV para permitir la entrada del virus a la célula. Se ha demostrado que hay cuatro glicoproteínas virales necesarias para la entrada de HSV-1: gB, gD, gH y gL.

Por lo tanto cabría postular que los carragenanos interferirían a través de las cargas negativas de los grupos sulfato con la interacción inicial entre gC y los residuos heparan sulfato, dada la similitud estructural entre el receptor celular y los polisacáridos analizados. Un mecanismo similar se ha postulado para otros polisacáridos activos como heparina y dextran sulfato (Baba y col, 1988). Sin embargo, hay muchos datos contradictorios en la bibliografía sobre el mecanismo de acción antiviral de sustancias polianiónicas tanto sobre herpesvirus como sobre HIV, y el análisis de los resultados obtenidos en nuestro caso también indicaría que la situación no es tan sencilla. Aunque hasta el presente, el sitio de unión al receptor de la gC no está totalmente claro, hay un grupo de aminoácidos básicos en la proximidades de una región muy hidrofílica cerca del N-terminal de gC, el cual podría ser considerado como dominio de unión al heparan sulfato (Tal-Singer y col, 1995; Trybala y col, 1994). Esta región en la porción N-terminal, compartida por otros miembros de la familia de la proteína gC dentro de los alfa herpesvirus (Flynn y col, 1993; Liang y col, 1993), es tal vez el sitio con el cual los carragenanos pueden interactuar.

Los estudios del efecto del tiempo de adición de los compuestos ( Figura 12 ) mostraron que aunque los tres carragenanos afectaban predominantemente la unión del virus a la

célula, no podía descartarse otro efecto adicional, particularmente en el caso de 1T<sub>1</sub>. Dado que una posibilidad es que el virus no pueda unirse a la célula debido a que es inactivado por unión directa al carragenano, se midió la actividad virucida de los compuestos. Este estudio confirmó las diferencias entre 1T<sub>1</sub> y los otros dos carragenanos, ya que 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> inactivaron el virus sólo a concentraciones muy altas en tanto que para 1T<sub>1</sub> la CI<sub>50</sub> determinada por inactivación viral fue similar al valor obtenido sobre células (Tabla 11). Esto indicaría que 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> efectivamente interfieren en la unión entre el virus y la célula, sin tener capacidad directa de unión al virus ni a la célula. Por el contrario 1T<sub>1</sub> sería capaz de establecer una unión estable con el virus y a través de este mecanismo impediría la posterior unión a la célula. Esta propiedad de 1T<sub>1</sub> se pierde por tratamiento químico, ya que 1T<sub>1</sub>T<sub>1</sub> no es virucida y muestra un modo de acción similar a 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub>, por lo que alguna característica estructural de 1T<sub>1</sub> parece ser responsable de su unión estable a HSV-1 y de su actividad virucida. La divergencia de la estructura química entre los carragenanos podría explicar sus diferentes comportamientos. Las diferencias principales de la estructura primaria de 1T<sub>1</sub> comparada con 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> han sido descritas en la Figura 3, Tabla 2 (Carlucci y col, 1997): la relación molar galactosa: 3,6-anhidrogalactosa es 1:0,03, 1:0,64 y 1:0,37 para 1T<sub>1</sub>, 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub>, respectivamente; la ubicación en los residuos de β-D-galactosa del grupo sulfato es en 1T<sub>1</sub> sobre C-2 y en 1C<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> sobre C-4; y el contenido de residuos de α-D-galactosa 2,6-disulfato es mayor en 1T<sub>1</sub>. Hasta el presente, es difícil asegurar cual (o todas) de estas diferencias químicas es la responsable del particular comportamiento de 1T<sub>1</sub> interaccionando con HSV-1.

Son conocidas las consecuencias que desencadena el uso de ciertos antivirales en terapias prolongadas ó de uso continuo, como lo demuestra el empleo del ACV con la aparición de cepas resistentes (Fillet y col, 1998; Sasadeusz y col, 1996). El comportamiento de los carragenanos de *Gigartina skosbergii* en cuanto a su capacidad de inducir la aparición de variantes resistentes fue notablemente diferente al del ACV. Como ya se ha descrito, ACV seleccionó rápidamente en células Vero por mutantes de HSV-1 resistentes con un valor de CI<sub>50</sub> 60 veces superior luego de sólo 6 pasajes. Con el mismo esquema de pasajes seriados, 1T<sub>1</sub> no indujo resistencia sino que llevó a la desaparición del virus del cultivo, probablemente por su capacidad virucida. Por su parte, 1C<sub>3</sub> produjo variantes que sólo llegaron a aumentar el valor de la CI<sub>50</sub> 10 veces como máximo de resistencia. La diferencia

en el comportamiento con ACV puede atribuirse a que los blancos sobre los que actúan ambos antivirales son distintos. La resistencia al ACV se debe a mutaciones en la TK ó en la DNA polimerasa virales ( Pelosi y col, 1998; Sasadeusz y col, 1997), que no son letales para el virus. En cambio, para obtener resistencia a los carragenanos deberían producirse mutaciones en el sitio de reconocimiento de la interacción virus-célula. Aunque aparentemente existen receptores secundarios para HSV, puede presumirse que mutaciones en la secuencia antirreceptora limitarían sensiblemente la capacidad de propagación del virus generado, como lo demuestran las deleciones de la gC que reducen la infectividad del virus (Pertel y col, 1996). Las cepas parcialmente resistentes obtenidas con 1C<sub>3</sub> mostraron tener resistencia cruzada con otros polianiones (Tabla 18), no pudiéndose explicar hasta ahora si una única mutación es común para todas las variantes seleccionadas. Así por ejemplo otros autores han encontrado heterogeneidad de mutantes en poblaciones de HIV seleccionados con ciclodextrin sulfato ( Mori y col, 1999 ).

Resultó llamativa la aparición de variantes alteradas en su citopatogenicidad, con fenotipo sincicial, luego de los pasajes seriados en presencia de 1C<sub>3</sub>. En general, las cepas salvajes de HSV de aislamientos clínicos así como las cepas de referencia no inducen la fusión celular. Sin embargo, bajo condiciones especiales se han aislado mutantes capaces de formar sincicios, denominados syn. Precisamente una posibilidad que se ha descripto, es el aislamiento de mutantes sinciciales en presencia de heparina (Pertel y col, 1996). Se sabe que las mutantes syn pueden deberse a mutaciones en cuatro genes UL20, UL24, UL53 (gK) ó UL27 (gB). Con el fin de evaluar un posible compromiso de la gK, se realizó el ensayo del efecto de la melitina sobre las variantes seleccionadas, no mostrando inhibición de la formación de sincicios. Tampoco se inhibió la formación de sincicios en presencia de ciclosporina lo que parecería indicar que una alteración en gB sería responsable del fenotipo sincicial inducido por 1C<sub>3</sub>. Asimismo, los ensayos realizados con las mutantes sinciciales seleccionadas con 1C<sub>3</sub> mostraron una falta de correlación entre el grado de resistencia a la droga y la característica sincicial (Tabla 18). Dado que gC y gB son las dos glicoproteínas que interactúan con el heparan sulfato podrían indicar que el fenotipo sincicial inducido por 1C<sub>3</sub> estaría localizado en una mutación en gB, mientras que la resistencia a 1C<sub>3</sub> de algunas variantes con independencia de su capacidad sincicial, podría deberse a una alteración en gC. La caracterización molecular de estas variantes permitirá

confirmar si efectivamente el carragenano 1C<sub>3</sub> interactúa con ambas glicoproteínas gB y gC en su acción antiviral sobre HSV.

Hoy se conoce que las sustancias polianiónicas como los polisacáridos sulfatados, exhiben importantes y únicas propiedades como: 1) Una efectiva actividad antiviral contra HIV, HSV y CMV. 2) En HIV, inhiben la formación de sincicios entre células infectadas y células T CD4<sup>+</sup> normales frenando la infección. 3) Muy baja inducción de resistencia antiviral in vitro.

Sin embargo los ensayos realizados in vivo no coinciden con los resultados esperables, debido a serias dificultades en la farmacocinética y biodisponibilidad de estos compuestos (Lüscher-Mattli, 2000; Neyts y col, 1995; Flexner y col, 1991), ya que:

- a) Son pobremente adsorbidos por vía digestiva y rápidamente degradados manifestando una corta vida plasmática media de 1,5-2 h.
- b) Su efecto antiviral es fuertemente reducido en presencia de suero humano ya que como todo polianión es adsorbido por los componentes catiónicos no específicos del suero.
- c) En muchos casos, poseen actividad anticoagulante y pueden producir trombocitopenia.
- d) Tienen pobre capacidad de penetración en tejidos y células infectadas.

Sin embargo, han sido muy alentadoras las respuestas obtenidas recientemente para usos tópicos vaginales en infecciones con HSV y HIV ya que inhiben la transmisión de la infección del virus libre a la célula y la transmisión célula-célula, presentan baja citotoxicidad, tienen escasa adsorción, no perturban la flora bacteriana vaginal ni la función del epitelio celular (Piret y col, 1999; Maguire y col, 1998, Zacharopoulos y col, 1997).

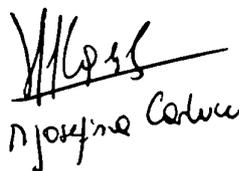
El ensayo de los carragenanos 1T<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> en un modelo de infección vaginal murino mostró que a pesar de que los dos compuestos tienen similar efectividad herpética in vitro, su capacidad protectora in vivo fue muy diferente. El tratamiento con 1T<sub>1</sub> mostró más del 90% de eficacia en la prevención de la infección con HSV-2, en tanto que 1C<sub>3</sub> redujo la mortalidad en forma poco significativa, produciendo un retraso en el día de muerte promedio (Tablas 23 y 24). Ambos compuestos se inocularon en los animales en soluciones acuosas al 1%, sin el empleo de una formulación ó vehículo que asegure la permanencia del compuesto un cierto tiempo in situ. Por lo tanto, la diferente efectividad in vivo de 1T<sub>1</sub> y 1C<sub>3</sub> podría deberse a dos razones:

1) la capacidad virucida de 1T<sub>1</sub> puede reforzar su acción antiviral y aumentar su capacidad de bloquear el ingreso del virus a la célula en el sitio de infección; 2) la solución de 1T<sub>1</sub> presenta mucha mayor viscosidad que la de 1C<sub>3</sub>, lo que podría facilitar su acción in situ. La prueba de 1C<sub>3</sub> en un vehículo más adecuado para su administración tópica permitirá dilucidar cuál de los dos factores mencionados tiene mayor responsabilidad en la mejor respuesta obtenida con 1T<sub>1</sub>.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis nos marcan el camino para probar una combinación de compuestos que actúan en diferentes niveles del ciclo de replicación viral para optimizar el tratamiento de las infecciones genitales con HSV. Una combinación ideal sería: 1) un compuesto que inactiva el virus fuera de la célula por acción virucida directa, y además previene la adsorción viral ó fusión virus-célula; 2) un inhibidor de la replicación del DNA viral, como los actualmente en uso, para el caso que el virus pueda haber escapado al primer bloqueo. El compuesto 1T<sub>1</sub> así como la optimización de la administración de 1C<sub>3</sub> representan un modelo promisorio para este ensayo. Asimismo, cabe agregar que estudios recientes indican que la adherencia a la superficie celular de diversos patógenos, además de HSV, como HIV, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, involucraría al heparan sulfato. Por lo tanto, polisacáridos sulfatados, como el carragenano 1T<sub>1</sub> acá estudiado, podrían interferir con la entrada microbiana y ser candidatos de elección como microbicidas para prevenir enfermedades de transmisión sexual.



Dra. ELSA R. DIAMONTE  
PROFESORA ASOCIADA  
DEPTO. DE MICROBIOLOGIA



Dra. Josefine Cordova

*"No te des por vencido, ni aún vencido,  
no te sientas esclavo, ni aún esclavo;  
trémulo de pavor, piénsate bravo,  
y acomete feroz, ya mal herido.*

*Ten el tesón del clavo enmohecido  
que ya viejo y ruin, vuelve a ser clavo;  
no la cobarde estupidez del pavo  
que amaina su plumaje al primer ruido..."*

**B**

Aguilar J. S, Rice M, Wagner E. K (1999). The Polysulfonated Compound Suramin Blocks Adsorption and Lateral Diffusion of Herpes Simplex Virus Type-1 in Vero Cells. *Virology* 258: 141-151.

Amoros M, Simoes C. M. O, Girre , Sauvager F, Cormier M (1992). 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 (12):1732-1740.

Baba M, Pauwels R, Balzarini J, Arnout J, Desmyter J, De Clercq E (1988). Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 85: 6132-6136.

Baba M, Snoeck R, Pauwels R, De Clercq E (1988). Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1742-1745.

Balfour H. H (1999). *Antiviral Drugs. Drug Therapy.* 340 (16): 1255-1268.

Banfield B, Leduc Y, Esford L, Visalli R, Brandt C, Tufaro F (1995). Evidence for an Interaction of Herpes Simplex Virus with Chondroitin Sulfate Proteoglycans during Infection. *Virology* 208: 531-539.

Barnard D. L, Huffman J. H, Meyerson L. R, Sidwell R. W (1993). Mode of Inhibition of Respiratory Syncytial Virus by a Plant Flavonoid, SP-303. *Chemotherapy* 39: 212-217.

Barnard D. L, Smee D. F, Huffman J. H, Meyerson, Sidwell R. W (1993). Antiherpesvirus Activity and Mode of Action of SP-303, a Novel Plant Flavonoid. *Chemotherapy* 39: 203-211.

Benbrik E, Chariot P, Bonavaud S, Ammisaid M, Frisdal E, Rey C, Gherardi R, Barlovatzmeimon G (1997). Cellular and mitochondrial toxicity of zidovudine (AZT),

didanosine (ddI) and zalcitabine (ddC) on cultured human muscle cells. *J. Neurol. Sci* 149 (1): 19-25.

Beutler J. A, McKee T. C, Fuller R. W, Tischler M, Cardellina II J. H, Snader K. M, McCloud T. G, Boyd M. R (1993). Frequent occurrence of HIV-inhibitory sulphated polysaccharides in marine invertebrates. *Antiviral Chem. Chemother.* 4 (3): 167-172.

Beress A, Wassermann O, Bruhn T, Beress L, Kraiselburd E.N, González L.V, De Motta G.E, Chavez P.I (1993). 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.

Bourgougnon N, Lahaye M, Chermann J.C, Kornprobst J.M (1993). Composition and antiviral activities of a sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, Gigartinales). *Bioorg. Med. Chem. Letters* 3: 1141-1146.

Bourne K. Z, Bourne N, Reising S. F, Stanberry L. R (1999). Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Res.* 42: 219-226.

Bourne N, Ireland J, Stanberry L. R, Bernstein D. I (1999). Effect of undecylenic acid as a topical microbicide against genital herpes infection in mice and guinea pigs. *Antiviral Res.* 40:139-144.

Callahan L. N, Phelan M, Mallinson M, Norcross M. A (1991). Dextran Sulfate Blocks Antibody Binding to the Principal Neutralizing Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 without Interfering with gp120-CD4 Interactions. *J. Virol* 65: 1543-1550.

Carlucci M. J, Pujol C. A, Ciancia M, Nosedá M, Matulewicz M. C, Damonte E. B, Cerezo A. S (1997). Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 20: 97-105.

Cases M. R, Stortz C. A, Cerezo A. S (1992). Methylated, sulphated xylogalactans from the red seaweed *Corallina Officinalis*. *Phytochemistry*. 31 (11): 3897-3900.

Crumpacker C. S (1989). Molecular Targets of Antiviral Therapy. *The New England J. Medicine*. 321 (3): 163-172.

Cohen Stuart J. W, Boucher C. A. B, Cooper D. A, Galasso G. J, Richman D. D, Thomas H. C, Whitley R. J (1998). Summary of the III International Consensus Symposium on Combined Antiviral Therapy. *Antiviral Res.* 38: 75, 93.

Damonte E. B, Matulewicz M. C, Cerezo A. S, Coto C. E (1996). Herpes simplex virus inhibitory sulphated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Chemother.* 42: 57-64.

Damonte E.B, Neyts J, Pujol C.A, Snoeck R, Andrei G, Ikeda S, Witvrouw M, Haines H, Matulewicz M.C, Cerezo A, Coto C.E, De Clercq E (1994). Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Biochem. Pharmacol.* 47: 2187-2192.

Darby G (1995). In search of the perfect antiviral. *Antiviral Chem. Chemother.* 6, Supplement 1: 54-63.

De Clercq E (1982). Comparative efficacy of antiherpes drugs in different cell lines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 661-663.

De Clercq E (1986). Chemotherapeutic approaches to the treatment of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J. Med. Chem.* 29: 1561-1569.

De Clercq E (1996). Therapeutic potential of Cidofovir (HPMPC, Vistide) for the treatment of DNA virus infections. *Uitverhandelingen van de Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van België*. 58: 19-49.

De Clercq E (1996). What can be Expected from Non-nucleoside Reverse transcriptase Inhibitors (NNRTIs) in the treatment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Infections?. *Medical Virol.* 6: 97-117.

De Vreese K, Reymen D, Griffin P, Steinkasserer A, Werner G, Bridger G. J, Esté J, Henson G. W, Desmyter J, Anné J, De Clercq E (1995). The bicyclams, a new class of potent human immunodeficiency virus inhibitors, block viral entry after binding. *Antiviral Res.* 29: 209-219.

Denizot F, Lang R (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Methods.* 89, 217-277.

Eddleston M, De la Torre J.C, Oldstone M. B. A, Loskutoff D. J, Edgington T. S, Mackman N (1993). Astrocytes Are the Primary Source of Tissue Factor in the Murine Central Nervous System. *J. Clin. Invest.* 92: 349-358.

Feldman S. C, Reynaldi S, Stortz C. A, Cerezo A. S, Damonte E. B (1999). Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis*. *Phytomedicine.* 6 (5): 335-340.

Fenical W (1997). New Pharmaceuticals from marine organisms. *Biotechnol.* 15: 339-341.

Fillet A, Dumont B, Caumes E, Visse B, Agut H, Bricaire F, Huraux J (1998). Acyclovir-Resistant Varicella-Zoster Virus: Phenotypic and Genetic Characterization. *J. Medical Virol.* 55: 250-254.

Flexner C, Barditch-Crovo P. A, Kornhauser D, M, Farzadegan H, Nerhood L. J, Chaisson R. E, Bell K. M, Lorentsen K. J, Hendrix C. W, Petty B. G, Lietman P. S (1991). Pharmacokinetics, Toxicity, and Activity of Intravenous Dextran Sulfate in Immunodeficiency Virus Infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 35 (12): 2544-2550.

Flynn S. J, Burgett B. L, Stein D.S, Wilkinson K. S, Ryan P (1993). The aminoterminal one-third of pseudorabies virus glycoprotein III contains a functional attachment domain but this domain is not required for the efficient penetration of Vero cells. *J. Virol.* 67: 2646-2654.

Franz G (1989). Polysaccharides in Pharmacy: Current Applications and Future Concepts. *Planta Medica.* 55: 493-497.

Fukuchi K, Sakagami H, Okuda T, Hatano T, Tanuma S, Kitajima K, Inoue Y, Inoue S, Ichikawa S, Nonoyama M, Konno K (1989). Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Res.* 11: 285-298.

Fuller A. O, Spear P. G (1985). 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 (2): 475-482.

Gage P. J , Levine M, Glorioso J. C (1993). Syncytium-Inducing Mutations Localize to two Discrete Regions within the Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoprotein B. *J. Virol.* 67 (4): 2191-2201.

Garcia G. H, Campos R, de Torres R. A, Broussalis A, Ferraro G, Martino V, Coussio J (1990). Antiherpetic activity of some Argentine Medical Plants. *J. Fitoterapia*, 61 (6): 542-546.

Garcia G. H, Cavallaro L, Broussalis A, Ferraro G, Martino V, de Torres R, Coussio J, Campos R (1995). *Phytotherapy Res.* 9: 251-254.

Girond S, Crance J. M, Van Cuyck-Gandre H, Renaudet J, Deloince R (1991). Antiviral activity of carrageenan on hepatitis A virus replication in cell culture. *Res Virol* 142: 261-270.

González M.E, Alarcón B, Carrasco L (1987). Polysaccharides as Antiviral Agents: Antiviral Activity of Carrageenan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 (9): 1388-1393.

Goodman J.L, Engel J. P (1990). Altered Pathogenesis in Herpes Simplex Virus Type 1 Infection due to a Syncytial Mutation Mapping to the Carboxy Terminus of Glycoprotein B. *J. Virol.* 65 (4): 1770-1778.

Gyotoku T, Aurelian L, Neurath A.R (1999). Cellulose acetate phthate (CAP): an "inactive" pharmaceutical excipient with antiviral activity in the mouse model of genital herpesvirus infection. *Antiviral Chem. Chemother.* 10: 327-332.

Hamasuna R, Eizuru Y, Shishime Y, Minamishima Y (1993). Protective effect of carragenans against murine cytomegalovirus infection in mice. *Antiviral Chem. Chemother.* 4: 353-360.

Hashimoto K, Kodama E, Mori S, Watanabe J, Baba M, Okutani K, Matsuda M, Shigeta S (1996). Antiviral activity of a sulphated polysaccharide extracted from the marine *Pseudomonas* and marine plant *Dinoflagellata* against human immunodeficiency viruses and other enveloped viruses. *Antiviral Chem. Chemother.* 7 (4): 189-196.

Hayashi K, Hayashi T, Morita N (1992). Mechanism of Action of the Antiherpesvirus Biflavone Ginkgetin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 (9): 1890-1893.

Hayashi K, Hayashi T, Arisawa M, Morita N (1993). Antiviral agents of plant origin. Antiherpetic activity of acacetin. *Antiviral Chem. Chemother.* 4 (1): 49-53.

Hayashi K, Kamiya M, Hayashi T (1994). Virucidal Effects of the Steam Distillate from *Houttuynia cordata* and its Components on HSV-1, Influenza Virus, and HIV. *Planta Med.* 61: 237-241.

Hayashi K, Hamada J, Hayashi T (1996). A Screening Strategy for Selection of Anti-HSV-1 and Anti-HIV Extracts from Algae. *Phytother. Res.* 10: 233-237.

Herold B. C, WuDunn D, Soltys N, Spear P. G (1991). 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.

Herold B. C, Visalli R. J, Susmarski N, Brandt C. R, Spear G (1994). Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* 75: 1211-1222.

Herold B. C, Gerber S. I, Belval B. J, Siston A. M, Shulman N (1996). Differences in the Susceptibility of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 to Modified Heparin Compounds Suggest Serotype Differences in Viral Entry. *J. Virol.* 70 (6): 3461-3469.

Herold B. C, Siston A, Bremer J, Kirkpatrick R, Wilbanks G, Fugedi P, Peto C, Cooper M (1997). Sulfated Carbohydrate Compounds Prevent Microbial Adherence by Sexually Transmitted Disease Pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41 (12): 2776-2780.

Highlander S. L, Sutherland S. L, Gage P.J, Johnson D. C, Levine M, Glorioso J. C (1987). Neutralizing Monoclonal Antibodies Specific for Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Inhibit Virus Penetration. *J. Virol.* 61 (11): 3356-3364.

Hirata A, Nagamatsu Y, Itoh W, Tabata K, Yamamoto J, Okada Y (1994). The Inhibitory Effect of Sulfated Schizophyllans and Related Oligosaccharides on Coagulation and Fibrinolysis. *Biol. Pharm. Bull.* 17 (5): 739-741.

Holland T. C, Marlin S. D, Levine M, Glorioso J. C (1983). Antigenic variants of herpes simplex virus selected with glycoprotein-specific monoclonal antibodies. *J. Virol.* 45: 672-682.

Hutchinson LL, Goldsmith K, Snoddy D, Ghosh H, Graham F. L, , Johnson D. C (1992). Identification and Characterization of a Novel Herpes Simplex Virus Glycoprotein, gK, Involved in Cell Fusion. *J. Virol.* 66 (9): 5603-5609.

Hutchinson LL, Roop-Beauchamp C, Johnson D. C (1995). Herpes Simplex Virus Glycoprotein K Is Known to Influence Fusion of Infected Cells, yet Is Not on the Cell Surface. *J.Virol.* 69 (7): 4556-4563.

Ito M, Baba M, Sato A, Pauwels R, De Clercq E, Shigeta S (1987). Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *Antiviral Res.* 7: 361-367.

Kaufman H. E (1962). Clinical cure of herpes simplex keratitis by 5-iodo-2'-deoxyuridine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109: 251-252.

Kennedy P. G. E, Major E. O, Williams R. K, Straus S.E (1994). Down-Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression during Acute Lytic Varicella-Zoster Virus Infection of Cultured Human Astrocytes. *Virology*. 205: 558-562.

Koizumi N, Sakagami H, Utsumi A, Fujinaga S, Takeda M, Asano K, Sugara I, Ichikawa S, Hondo H, Mori S, Miyano N, Nakano Y, Nakashima H, Murakami T, Miyano N, Yamamoto N (1993). Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon. *Antiviral Res.* 21: 1-14.

Kolender A, Pujol C. A, Damonte E. B, Matulewicz M. C, Cerezo A. S (1997). The system of sulfated  $\alpha$ -(1-3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structure, antiherpetic, and anticoagulant properties. *Carbohydr. Res.* 304: 53-60.

König G.M, Wright A. D ( 1995). Marine Natural Research: Current Directions and Future Potencial. *Planta Med.* 62: 193-211.

Klupp B. G, Karger A, Mettenleiter T. C (1997). Bovine Herpesvirus 1 Glycoprotein B Does Not Productively Interact with Cell Surface Heparan Sulfate in a Pseudorabies Virion Background. *J. Virol.* 71 (6): 4838-4814.

Laquerre S, Argnani R, Anderson D. B, Zucchini S, Manservigi R, Glorioso J. C (1998). Heparan Sulfate Proteoglycan Binding by Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoproteins B and C, Which Differ in Their Contributions to Virus Attachment, Penetration and Cell-to-Cell Spread. *J. Virol.* 72 (7): 6119-6130.

Liang X, Babiuk L. A, Zamb T. J (1993). Mapping of heparin-binding structures on bovine herpesvirus I and pseudorabies virus gIII glycoproteins. *Virol.* 194: 233.243.

Lüscher-Mattli M (2000). Polyanions-a lost chance in the fight against HIV and other virus diseases ?. *Antiviral Chem.Chemother.* 11: 249-259.

McClure M. O, Whitby D, Patience C, Gooderham N. J, Bradshaw A, Cheingsongpopov R, Weiss R. A (1991). Dextrin sulphate and fucoidan are potent inhibitors of HIV infection in vitro. *Antiviral Chem. Chemother.* 2: 149-156.

Maguire R. A, Zacharopoulos V. R, Phillips D. M ( 1998). Carrageenan-Based Nonoxynol-9 Spermicides for Prevention of Sexually transmitted Infections. *Sexually Transmitted Diseases*, 25 (9): 494 - 500.

Marchetti M, Pisani S, Pietropaolo V, Seganti L, Nicoletti R, Orsi N (1995). Inhibition of herpes simplex virus infection by negatively charged and neutral carbohydrate polymers. *J. Chemother*, 7: 90-96.

Mertz G. J (1997). Herpes Simplex Virus Infections. *Antiviral agents and Human Viral Diseases*. Fourth Edition, 305-341.

Mori H, Oishi I, Kurimura T (1999). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 resistant to modified cyclodextrin sulphate (mCDS71) in vitro. *Antiviral Chem. Chemother.* 10:15-21.

Murphy F. A (1996). *Virus Taxonomy. Fundamental Virology, Third Edition*, 2: 15-57.

Montanha J. A, Amoros M, Boustie J, Girre L (1995). Anti-herpes Virus Activity of *Aporphine Alkaloids*. *Planta med.* 61: 419-424.

Nakashima H, Kido Y, Kobayashi N, Motoki Y, Neushul M, Yamamoto N (1987). 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.

Neyts J, De Clercq E (1995). Effect of Polyanionic Compounds on Intracutaneous and Intravaginal Herpesvirus Infection in Mice: Impact on the Search for Vaginal Microbicides with Anti-HIV Activity. *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology.* 10: 8-12.

Neyts J, Snoeck R, Schols D, Balzarini J, Eska J D, Schepdael A V, De Clercq E (1992). Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate. *Viol.* 189: 48-58.

Norkin L (1995). Virus Receptors: Implications for Pathogenesis and the Design of Antiviral Agents. *Clinical Microbiology Rev.* 8: 293-315.

Painter T. J (1983). Algal polysaccharides. In: Aspinnall, G.O. (Ed.), *The Polysaccharides*. Academic Press, London, pp. 195-285.

Parra M, Parish M. L, Gwendolyn Noble A, Spear P. G (1985). Potent Neutralizing Activity Associated with Anti-Glycoprotein D Specificity Among Monoclonal Antibodies Selected for Binding to Herpes Simplex virions. *J. Virol.* 55 (2), 483-488.

Pelosi E, Rozenberg F, Cohen D, Tyler K (1998). A Herpes Simplex Virus DNA Polymerase Mutation That Specifically Attenuates Neurovirulence in Mice. *Viol.* 252: 364-372.

Pertel P.E, Spear P. G (1996). Modified Entry and Syncytium Formation by Herpes Simplex Virus Type 1 Mutants Selected for Resistance to Heparin Inhibition. *Viol.* 226: 22-23.

Piret J, Lamontagne J, Bestman-Smith J, Roy S, Gourde P, Désormeaux A, Omar R. F, Juhász J, Bergeron M (1999). In vitro and In vivo Evaluations of Sodium Lauryl Sulfate and Dextran Sulfate as Microbicides against Herpes Simplex and Human Immunodeficiency Viruses. *J. Clinical Microbiology*, 38 (1): 110-119.

Prusoff W. H (1959). Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analogue of thymidine. *Biochem. Biophys. Acta* 32: 295-296.

Pujol C.A, Errea M.I, Matulewicz M.C, Damonte E.B (1996). Antierpetic activity of S1, an Algal Derived Sulphated Galactan. *Phytother. Res.* 10: 410-413.

Renard-Nozaki J, Kim T, Imakura Y, Kihara M, Kobayashi S (1989). Effect of Alkaloids Isolated from *Amaryllidaceae* on herpes simplex virus. *Res. Virol.* 140: 115-128.

Roderiquez G, Oravec T, Yanagishita M, Bou-Hadid C, Mostowski H, Norcross M. A (1995). Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp 120-gp 41. *J. Virol.* 69: 2233-2239.

Sasadeusz J, Sacks S. L (1996). Spontaneous Reactivation of Thymidine Kinase-Deficient, Acyclovir-Resistant Type 2 Herpes Simplex Virus: Masked Heterogeneity or Reversion ?. *The J. of Inf. Diseases* 174: 476-482.

Sasadeusz J, Tufaro F, Safrin S, Schubert K, Hubinette M. M, Cheung P. K, Sacks S (1997). Homopolymer Mutational Hot Spots Mediate Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir. *J. Virol.* 71 (5): 3872-3878.

---

Scheuer P. J (1989). Marine Natural Products and Biomedicine. *Med. Res. Reviews.* 9 (4): 535-545.

Scheuer P. J (1995). Marine Natural Products Research: A look into the Dive Bag. *J of Nat. Prod.* 58 (3): 335-343.

Sekine H, Ohonuki N, Sadamasu K, Monma K, Kudoh Y, Nakamura H, Okada Y, Okuyama T (1995). The Inhibitory Effect of the Crude Extract from a Seaweed of *Dygenea simplex* C. Agardh on the in Vitro Cytopathic Activity of HIV-1 and It's Antigen Production. *Chem. Pharm. Bull.* 43 (9): 1580-1584.

Summerfield A, Keil. G. M, Mettenleiter T. C, Rziha H, Saalmüller A (1997). Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. *Antiviral Res.* 36: 55-62.

Spear P.G (1993). Entry of alphaherpesvirusses into cells. *Seminars in Virology.* 4: 167-180.

Tal-Singer R, Peng C, Ponce de León M, Abrams W. R, Banfield B. W, Tufaro F, Cohen G. H, Eisenberg R. J (1995). Interaction of herpes simplex virus glycoprotein gC with mammalian cell surface molecules. *J. Virol.* 69: 4471-4483.

Terry-Allison T, Montgomery R. I, Whitbeck C, Xu R, Cohen G. H, Eisenberg R. J, Spear P. G (1998). HveA ( Herpesvirus Entry Mediator A), a Coreceptor for Herpes Simplex Entry, also Participates in Virus-Induced Cell Fusion. *J. Virol.* 72 (7): 5802-5810.

Terry-Allison T, Montgomery R. I, Warner M. S, Geraghty R. J, Spear P. G (2001). Contributions of gD receptors and glycosaminoglycan sulfation to cell fusion mediated by herpes simplex virus 1. *Virus Res.* 74: 39-45.

Trybala E, Bergstrom T, Svennerholm B, Glorioso J. C, Olofsson S (1994). Localization of a functional site on herpes simplex virus type 1 glycoprotein C involved in binding to cell surface heparan sulfate. *J. gen. Virol.* 75: 743-752.

Tyrrell D. J, Kilfeather S, Page C (1995). Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. *Trends Pharmacol. Sciences* 16: 198-204.

Venkateswaran P.S, Millman I, Blumberg B.S (1989). Interaction of fucoidan from *Pelvetia fastigiata* with surface antigens of hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses. *Planta Med.* 55: 265-270.

Yamada T, Ogamo A, Saito T, Watanabe J, Uchiyama H, Nakagawa Y ( 1997). Preparation and anti-HIV activity of low-molecular-weight carrageenans and their sulfated derivatives. *Carbohydrate Pol.* 32: 51-55.

Walev K, Linger M, Lazzaro M, Weise K, Falke D (1994). Cyclosporin A resistance of herpes simplex virus induced fusion within as a phenotypical marker of mutations in the gB locus of the glycoprotein B gene. *Virus Genes* 8: 83-86.

Weizhong C, Baohua G, Stanley P (1988). Role of Glycoprotein B of Herpes Simplex Virus Type 1 in Virus Viral Entry and Cell Fusion. *J. Virol.* 62 (8): 2596-2604.

Whitbeck J. C, Peng C, Lou H, Xu R, Willis S. H, Ponce De Leon M, Peng T, Nicola A. V, Montgomery R. I, Warner M. S, Soulika A. M, Spruce L. A, Moore W. T, Lambris J. D, Spear P. G, Cohen G. H, Eisenberg R. J (1997). Glycoprotein D of Herpes Simplex Virus ( HSV ) Binds Directly to HVEM, a Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily and a Mediator of HSV Entry. *J. Virol.* 71 (8): 6083-6093.

Whitley R. J, Griffiths P. D (1997). Cytomegalovirus Infections in the Immunocompromised Host. *Antiviral Agents and Human Viral Diseases. Fourth Edition,* 257-278.

Wigg M. D, Al-Jabri A. A, Costa S. S, Race E, Bodo B, Oxford J. S (1996). In-vitro virucidal and virustatic anti HIV-1 effects of extracts from *Persea americana* Mill. (avocado) leaves. *Antiviral Chem. Chemother.* 7 (4): 179-183.

Witvrouw M, Desmyter, De Clercq E (1994a). Antiviral portrait series: 4. Polysulfates as inhibitors of HIV and other enveloped viruses. *Antiviral Chem. Chemother.* 5 (6), 345-359.

Witvrouw M, Este J.A, Quinones Mateu M.E, Reymen D, Andrei G, Snoeck R, Ikeda S, Pauwels R, Vittori Bianchini N, Desmyter J, De Clercq E (1994b). Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Antiviral Chem. Chemother.* 5: 297-303.

Witvrouw M, Schols D, Andrei G, Snoeck R, Hosoya M, Pauwels R, Balzarini J, De Clercq E (1991). Antiviral activity of low-MW dextran sulphate (derived from dextran MW 1000) compared to dextran sulphate samples of higher MW. *Antiviral Chem. Chemother.* 2: 171-179.

Wong C.K, Leung K.N, Fung K.P, Choy Y.M (1994). Immunomodulatory and Anti-tumour Polysaccharides from Medicinal Plants. *J. Inter. Med. Res.* 22: 299-312.

WuDunn D, Spear P.G (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 63: 52-58.

Zacharopoulos V. R, Phillips D. M (1997). Vaginal Formulations of Carrageenan Protect Mice from Herpes Simplex Virus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunol.* 4 (4): 465-468.



