



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Farmacia y Bioquímica



**ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE PLANTAS MEDICINALES
ARGENTINAS DE LA FAMILIA ASTERACEAE.
IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y
CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN**

M.Sc. Bioq. María Florencia Visintini Jaime

Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Virología

Directora: Dra. Lucía V. Cavallaro

Co-Directora: Liliana V. Muschietti

Lugar de Trabajo: Cátedra de Virología y Cátedra de Farmacognosia. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

Buenos Aires, 2014

M.Sc. Bioq. María. Florencia Visintini Jaime

Dra. Liliana V. Muschietti

Codirectora

Prof. Dra. Lucía V. Cavallaro

Directora

La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad.
Julio Verne

AGRADECIMIENTOS

A mi hermana y mis padres por su amor, cariño y apoyo constante a todo lo que quise dedicarme.

A mi directora, Dra. Lucía Cavallaro por iniciarme en la Virología, por guiarme y transmitirme todos sus conocimientos. Por su guía constante durante este doctorado.

A mi codirectora, Dra. Liliana Muschietti por iniciarme en la Farmacognosia, aún cuando las plantas eran un misterio para mí. Por su apoyo y guía durante todo este trabajo.

Al Dr. Rodolfo Campos y a la Dra. Virginia Martino por abrirme las puertas de sus laboratorios y permitirme realizar mi trabajo en las Cátedras de Virología y Farmacognosia; respectivamente. Por sus críticas y consejos constantes a mi trabajo.

A todos los compañeros actuales y pasados de ambas cátedras que me acompañaron durante este proceso. Por responder a todas mis preguntas, por aconsejarme o simplemente por acompañarme en estos años de trabajo.

A mis amigos de la vida y en especial a los amigos inesperados que encontré en estos cinco años. Por escucharme pacientemente siempre que necesité un oído y por los consejos que me dieron. Por acompañarme y aguantarme todos estos años.

A todos los que de una forma u otra hicieron posible este trabajo de tesis.

A la Universidad de Buenos Aires; por otorgarme la beca de doctorado que me permitió realizar mi trabajo durante todos estos años y por brindarme un espacio para mi desarrollo profesional.

A todos, muchas gracias

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis han sido publicados parcialmente y corresponden a las siguientes publicaciones:

María Florencia Visintini Jaime, Rodolfo H. Campos, Virginia S. Martino, Lucía V. Cavallaro, y Liliana V. Muschietti, “Antipoliavirus Activity of the Organic Extract of *Eupatorium buniifolium*: Isolation of Euparin as an Active Compound,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 402364, 8 páginas, 2013. doi:10.1155/2013/402364

María Florencia Visintini Jaime, Flavia Redko, Liliana V. Muschietti, Rodolfo H. Campos, Virginia S. Martino, y Lucía V. Cavallaro, “In vitro antiviral activity of plant extracts from the Asteraceae family,” *Virology Journal*, vol. 10:245, 10 páginas, 2013. doi: 10.1186/1743-422X-10-245

El presente trabajo se realizó con la financiación proveniente de:

- Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad de Buenos Aires (UBA)

Actividad antiviral de plantas medicinales argentinas de la familia Asteraceae. Identificación de compuestos bioactivos y caracterización del mecanismo de acción.

La búsqueda de nuevos antivirales es una necesidad actual y permanente. Una estrategia para la identificación de nuevos compuestos bioactivos es el estudio de los metabolitos secundarios presentes en la flora mundial.

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiviral en diferentes plantas medicinales argentinas frente a diversos virus de interés clínico, como ser poliovirus y herpes simplex virus.

Para ello, se realizó un *screening* de actividad antiviral en dos extractos diferentes, un extracto orgánico (EO) y un extracto acuoso (EA), de siete especies argentinas de la familia Asteraceae: *Baccharis gaudichaudiana*, *B. spicata*, *Bidens subalternans*, *Eupatorium buniifolium*, *Pluchea sagittalis*, *Tagetes minuta* y *Tessaria absinthioides*.

La concentración efectiva 50 (CE₅₀) del EO de *B. gaudichaudiana* y *E. buniifolium* frente a PV-2 fueron de $14,8 \pm 1,5 \mu\text{g/ml}$ y $9,5 \pm 3,5 \mu\text{g/ml}$; respectivamente, valores que justificaron su fraccionamiento bioguiado frente a PV para la identificación de el/los compuesto/s responsables de la actividad antiviral observada.

A partir del EO de *B. gaudichaudiana*, fue posible el aislamiento e identificación de un flavonoide, la apigenina, previamente reportado en esta especie. La actividad antiviral de este compuesto fue de CE₅₀= $12,2 \pm 3,3 \mu\text{M}$ para PV-2. A partir de *E. buniifolium* se aisló un benzofurano, la euparina, cuya CE₅₀ frente a PV-2 fue de $0,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

Del estudio del mecanismo de acción de la euparina, se pudo demostrar que interfería en la etapa de penetración y/o desnudamiento del virus y el blanco de acción era el sitio hidrofóbico, localizado por debajo de la región del *canyon*, conocido como *pocket* hidrofóbico en la cápside viral. La selección de mutantes resistentes y dependientes a la euparina, y su caracterización biológica permitió demostrar las mutaciones asociadas a cada fenotipo localizadas en las diferentes proteínas de la cápside viral.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, aportan al conocimiento de las especies medicinales estudiadas respecto a su potencial antiviral e identifica a la euparina como un inhibidor de cápside, altamente selectivo para los tres tipos de poliovirus humano.

Antiviral activity of Argentinean medicinal plants from the Asteraceae family. Identification of bioactive compounds and characterization of the mechanism of action.

Finding new antiviral drugs is a necessity that is always current. One strategy for the identification of new bioactive compounds is the study of the secondary metabolites that are present in higher plants.

The aim of this thesis was to study the antiviral properties on Argentinean medicinal plants against different viruses of clinical interest, such as poliovirus or herpes simplex virus.

A screening of the antiviral activity of two different extracts, organic extract (OE) and aqueous extract (AE) was performed, from seven species of the Asteraceae family: *Baccharis gaudichaudiana*, *B. spicata*, *Bidens subalternans*, *Eupatorium buniifolium*, *Pluchea sagittalis*, *Tagetes minuta* y *Tessaria absinthioides*.

The values of effective concentration 50 (EC₅₀) of the OE from *B. gaudichaudiana* and *E. buniifolium* against PV-2 were 14.8 ± 1.5 µg/ml and 9.5 ± 3.5 µg/ml; respectively. These values justified their further bioguided fractionation to identify the compound/s responsible for the antiviral activity.

From the OE of *B. gaudichaudiana* it was identified a known flavonoid, apigenin that has been previously reported from this plant. The EC₅₀ against PV-2 was 12.2 ± 3.3 µM. The euparin, a natural benzofuran, was identified from *E. buniifolium*, with a value of EC₅₀ of 0.6 ± 0.2 µM against PV-2.

The study of the mechanism of action of euparin demonstrated that the penetration and/or uncoating steps were inhibited by this compound, and the viral target was the hydrophobic site known as “hydrophobic pocket” in the viral capsid; localized under the canyon region. The interaction of the euparin did not affect the adsorption of the virus to the cells. The selection and the biological and molecular characterization of drug-resistant and –dependent viral variants showed mutations associated to each phenotype, located in the different proteins of the viral capsid.

The results obtained in this thesis, not only identified different Argentinean medicinal plants as potential source of new antiviral compounds, but also identified the euparin as a capsid inhibitor highly selective to the three human polioviruses.

INDICE

I - Introducción	1
1. Consideraciones generales	1
1.1. Impacto de las infecciones virales en la salud humana	1
2. Infecciones causadas por poliovirus	2
2.1. Generalidades	2
2.2. Estructura de la partícula viral	3
2.3. Estructura y organización genómica	3
2.4. Epidemiología	6
2.5. Compuestos descritos con actividad antipoliovirus	8
3. Infecciones causadas por herpesvirus	9
3.1. Generalidades	9
3.2. Estructura y organización genómica	10
3.3. Cuadro clínico de las infecciones	11
3.4. Compuestos antivirales y situación actual de las infecciones por HSV	12
4. Búsqueda de nuevos agentes antivirales	13
5. Estrategias para el desarrollo de nuevos compuestos antivirales: el uso de las plantas medicinales	13
6. Familia Asteraceae	14
6.1. Aspectos generales	14
6.2. Especies vegetales seleccionadas	15
6.3. Género <i>Baccharis</i>	19
6.3.1. Aspectos generales	19
6.3.2. Actividad antiviral en el género <i>Baccharis</i>	19
6.4. <i>Baccharis gaudichaudiana</i>	19
6.4.1. Aspectos generales	19
6.4.2. Composición química	20
6.4.3. Propiedades farmacológicas	20
6.5. Género <i>Eupatorium</i>	21
6.5.1. Aspectos generales	21

6.6.	<i>Eupatorium buniifolium</i>	21
6.6.1.	Aspectos generales.....	21
6.6.2.	Composición química	22
6.6.3.	Propiedades farmacológicas	22
II - Hipótesis	24
Objetivos	24
Objetivo general.....		24
Objetivos específicos		25
III - Materiales y Métodos		26
1.	Reactivos y equipamiento	26
2.	Líneas celulares.....	27
3.	Virus.....	28
4.	Material Vegetal. Recolección e identificación	29
5.	Obtención de los extractos orgánicos y acuosos.....	30
6.	Análisis por cromatografía en capa delgada de los extractos orgánicos y acuosos	30
7.	Obtención de los extractos activos en escala preparativa	31
8.	Fraccionamiento del EA de <i>B. gaudichaudiana</i> : Extracción líquido-líquido.....	31
9.	Fraccionamiento bioguiado del EO de <i>B. gaudichaudiana</i>	31
9.1.	Análisis de las fracciones F _C , F _D y F _H de <i>B. gaudichaudiana</i> por cromatografía líquida de alta presión	32
9.2.	Análisis de la fracción F _C por HPLC	32
9.3.	Análisis de las fracciones F _{C2} y F _{C3} por HPLC	33
9.4.	Fraccionamiento bioguiado de la fracción F _C por columna cromatográfica....	33
9.5.	Purificación del precipitado P _{XI}	33
10.	Identificación del compuesto A	33
11.	Fraccionamiento del extracto orgánico de <i>E. buniifolium</i>	34
11.1.	Fraccionamiento bioguiado de la fracción F ₂	34
11.2.	Purificación del compuesto B de las fracciones F _{2.V} y F _{2.VII}	34
11.3.	Identificación del compuesto B.....	34
12.	<i>Screening</i> de la actividad antiviral de los extractos acuosos y orgánicos de las especies seleccionadas	35
13.	Ensayos de citotoxicidad. Determinación de la CC ₅₀	36

14. Ensayos de actividad antiviral por el método de reducción de placas virales. Determinación de la CE ₅₀	36
15. Determinación de la actividad antiviral y citotoxicidad de los patrones de referencia de apigenina y euparina	37
16. Evaluación de la actividad antiviral mediante reducción del efecto citopático	38
17. Estudio del mecanismo de acción	38
17.1. Efecto del pretratamiento de las células	38
17.2. Ensayo de actividad virucida	39
17.3. Efecto en la adsorción y post-adsorción.....	39
17.4. Curva de crecimiento en un paso de PV-2	40
17.4.1. Cinética de producción de PV-2	40
17.4.2. Efecto del agregado de la fracción F _C de <i>B. gaudichaudiana</i> a diferentes tiempos de un ciclo viral sobre la producción viral	40
17.4.3. Efecto del agregado de euparina a diferentes tiempos de un ciclo viral sobre la producción viral	40
17.5. Ensayos de centros infecciosos de PV-2.....	41
17.6. Evaluación del efecto antiviral sobre la etapa de penetración de PV-2	42
17.6.1. Producción de un stock de PV-2 fotosensible	42
17.6.2. Evaluación del efecto de la euparina en una infección de PV-2 en múltiples ciclos	42
17.7. Determinación de la frecuencia natural de mutantes resistentes.....	43
17.8. Selección y purificación de mutantes resistentes a euparina	43
17.9. Caracterización biológica de los clones obtenidos.....	44
17.9.1. Titulación de los clones en presencia y ausencia de euparina	44
17.9.2. Efecto de las diferentes concentraciones de euparina en la replicación de un clon dependiente	44
17.9.3. Evaluación de la termoestabilidad del clon dependiente a la euparina.....	45
18. Caracterización molecular de los clones obtenidos	45
18.1. Secuenciación de las proteínas de la cápside.....	45
18.1.1. Extracción de ARN y retrotranscripción	45
18.1.2. Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	45
18.1.3. Purificación de los productos de PCR	46
18.1.4. Secuenciación de las proteínas de la cápside.....	46

19.	Estudios de la reversión de la dependencia y la resistencia a euparina	47
20.	Análisis estadístico	47
IV - RESULTADOS.....		48
Capítulo 1: Estudio de la actividad antiviral de plantas medicinales argentinas ...		48
1.	<i>Screening</i> de actividad antiviral frente a PV-2, HSV-1, BVDV, DENV y VSV ...	48
2.	Cuantificación de la actividad antiviral	49
3.	Análisis de los extractos activos por TLC.....	50
4.	Conclusiones parciales.....	51
Capítulo 2: Análisis de la actividad antiviral del extracto acuoso de <i>Baccharis gaudichaudiana</i> sobre HSV-1.....		53
1.	Estudio del mecanismo de acción del EA de <i>B. gaudichaudiana</i>	53
1.1.	Efecto del pretratamiento de las células con el EA.....	53
1.2.	Actividad virucida del EA de <i>B. gaudichaudiana</i> a diferentes temperaturas ..	54
1.3.	Efecto en la adsorción y en la post-adsorción del EA de <i>B. gaudichaudiana</i> .	54
2.	Actividad antiviral del EA en cepas de HSV-1 Resistentes a aciclovir.....	55
3.	Fraccionamiento bioguiado del EA de <i>B. gaudichaudiana</i>	56
3.1.	Extracción liquido-liquido del EA de <i>B. gaudichaudiana</i>	56
3.2.	Actividad antiviral de las fracciones obtenidas.....	57
4.	Conclusiones parciales.....	58
Capítulo 3. Extracto orgánico de <i>Baccharis gaudichaudiana</i>: Estudio preliminar del mecanismo de acción anti-PV-2 y fraccionamiento bioguiado.		59
1.	Estudio del mecanismo de acción del extracto orgánico de <i>B. gaudichaudiana</i>	59
1.1.	Efecto del pretratamiento de las células con el EO.....	59
1.2.	Actividad virucida del EO de <i>B. gaudichaudiana</i> a diferentes temperaturas ..	59
1.3.	Efecto en la adsorción y en la post-adsorción del EO de <i>B. gaudichaudiana</i> .	60
2.	Fraccionamiento bioguiado del EO de <i>B. gaudichaudiana</i>	61
2.1.	Fraccionamiento del EO por cromatografía en columna. Perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas.	61
2.2.	Actividad antiviral de F _A -F _H por reducción del efecto citopático.....	62
2.3.	Análisis por HPLC de las fracciones F _C , F _D y F _H	63
2.4.	Estudio del mecanismo de acción de la fracción F _C . Curva de crecimiento en un paso	65

3.	Análisis de la fracción F _C por HPLC	66
3.1.	Fraccionamiento de F _C por HPLC.....	66
3.2.	Actividad antiviral de F _{C1} -F _{C4} frente a PV-2	67
3.3.	Análisis de la fracción F _{C3} por HPLC	68
4.	Fraccionamiento de F _C de <i>B. gaudichaudiana</i> a escala preparativa.....	68
4.1.	Fraccionamiento de F _C de <i>B. gaudichaudiana</i>	68
4.2.	Análisis del precipitado obtenido de la fracción F _{CXI} (P _{XI})	69
4.3.	Identificación del compuesto A	71
4.4.	Actividad antiviral de la apigenina	73
5.	Conclusiones parciales	73
Capítulo 4: Actividad antiviral de ocho especies del género <i>Baccharis</i> frente a poliovirus y herpesvirus		75
1.	Análisis de los extractos orgánicos y extractos acuosos de diferentes especies del género <i>Baccharis</i>	75
2.	Actividad anti PV de los EO y anti HSV de los EA.....	77
3.	Estudio del mecanismo de acción del EO de <i>B. trimera</i> frente a PV-2.....	79
4.	Conclusiones parciales	81
Capítulo 5: Estudio de la actividad antiviral del extracto orgánico de <i>Eupatorium. buniifolium</i> frente a poliovirus.....		82
1.	Mecanismo de acción del extracto orgánico de <i>E. buniifolium</i>	82
2.	Fraccionamiento bioguiado del EO de <i>E. buniifolium</i>	84
2.1.	Determinación de la actividad antiviral de las fracciones F ₁ -F ₅ frente a PV ...	84
3.	Fraccionamiento y purificación de la fracción F ₂	85
3.1.	Fraccionamiento bioguiado de F ₂	85
3.2.	Actividad antiviral de las fracciones de F _{2.I} – F _{2.XVII}	85
3.3.	Aislamiento y purificación del compuesto B de las fracciones F _{2.V} y F _{2.VII}	86
3.4.	Determinación de la pureza e identificación del compuesto B	86
4.	Euparina.....	88
4.1.	Actividad antiviral de la euparina frente a PV-1, PV-2 y PV-3.....	88
4.2.	Actividad antiviral de la euparina aislada del EO de <i>E. buniifolium</i> vs la euparina comercial.....	89
4.3.	Mecanismo de acción de la euparina	89

4.3.1. La euparina como un antiviral verdadero	89
4.3.2. Estudio del mecanismo de acción de la euparina. Curva de crecimiento en un paso	91
4.3.3. Estudio de la acción de la euparina en la etapa de adsorción viral	92
4.3.4. Ensayo de penetración	93
4.3.4.1. Obtención del stock de PV-2 fotosensible	93
4.3.4.2. Evaluación del agregado de euparina en una infección de PV-2 en múltiples ciclos	94
4.4. Obtención de mutantes de PV-2 resistentes a euparina	95
4.4.1. Frecuencia natural de resistentes a euparina en un stock de PV-2 wt.	96
4.4.2. Selección de clones PV-2 resistentes a euparina. Caracterización fenotípica de susceptibilidad a la euparina	97
4.4.3. Clonado biológico de clones de PV-2 resistentes y dependientes a euparina.....	99
4.4.4. Caracterización de la variante dependiente a euparina PV-2-D19	101
4.4.4.1. Relación de la capacidad replicativa de PV-2-D19 con la concentración de euparina	101
4.4.4.2. Termoestabilidad de la variante dependiente.....	102
4.4.5. Caracterización molecular de las variantes dependientes y resistentes de PV-2 a la euparina	103
4.4.5.1. Secuenciación de las proteínas de la cápside de PV-2 wt, PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 y PV-2-R21	103
4.5. Obtención de revertantes	105
4.6. Espectro de acción antiviral de la euparina	107
5. Conclusiones parciales.....	107
V - DISCUSION Y CONCLUSIONES	108
Discusión	108
Conclusión	122
VI – Apéndice	124
Apéndice 1	124
Apéndice 2	125
Apéndice 3	126
Apéndice 5	128
Apéndice 6	129

Apéndice 7	130
Apéndice 8	131
Apéndice 9	140
VII - BIBLIOGRAFÍA	144

ABREVIATURAS Y FÓRMULAS

μM = micromolar

AANES = aminoácidos no esenciales

Abs = Absorbancia

AcEt = Acetato de etilo

AcH = Ácido acético

ACV = Aciclovir

ADN = ácido desoxirribonucleico

ADNc = ADN complementario

Ads = adsorción

AniS = anisaldehído sulfúrico

ARN = ácido ribonucleico

ARNm = ARN mensajero

ARNpol/ARNdep = ARN polimerasa dependiente de ARN

B. = *Baccharis*

BA = *B. articulata*

BC = *B. crispa*

BG = *B. gaudichaudiana*

BPe = *B. penningtonii*

BPh = *B. phyteumoides*

BS = *B. spicata*

BTr = *B. trimera*

BTu = *B. tucumanensis*

BVDV = virus de la diarrea viral bovina

CC = control células

CC₅₀ = concentración citotóxica 50

CE₅₀ = concentración efectiva 50

CE₉₀ = concentración efectiva 90

CH₂Cl₂ = diclorometano

CI = centros infecciosos

CV = control virus

CVB1 = virus coxsackie B tipo 1

DENV= virus del Dengue

EA = extracto acuoso
ECP = efecto citopático
EO = extracto orgánico
EtOH = etanol
EV71 = enterovirus 71
FA = fase acuosa residual
FE = fase estacionaria
FM = fase móvil
FNR = frecuencia natural de resistentes
FO = fase orgánica
H₂O = agua destilada
HBV = virus de la hepatitis B
HCV = virus de la hepatitis C
HIV = virus de la inmunodeficiencia humana
HPLC = Cromatografía líquida de alta presión, del inglés: *High-Performance Liquid Chromatography*
HSV = Herpes simplex virus
 HSV-1 = herpes simplex tipo 1
 HSV-2 = herpes simplex tipo 2
Hx = hexano
IPV = vacuna inactivada contra PV
IR = espectroscopía infrarroja
IS = índice de selectividad
KCl = cloruro de potasio
MC = medio de crecimiento
MCNC = máxima concentración no citotóxica
MeOH = metanol
MI = medio de infección
mM = milimolar
moi = multiplicidad de infección, del inglés: *multiplicity of infection*
MP = medio de placa
NaCl = cloruro de sodio
NaHCO₃ = bicarbonato de sodio
nm = nanómetros

NPR = reactivo de productos naturales, del inglés: *Natural Product Reagent*
OPV = vacuna Sabin atenuada contra PV, del inglés: *oral poliovirus vaccine*
p.a. = post adsorción
PBS = solución tamponada de fosfatos, del inglés: *phosphate buffer saline*
PCR = reacción en cadena de la polimerasa, del inglés: *polymerase chain reaction*
pmol = picomoles
PV = poliovirus
 PV-1 = poliovirus tipo 1
 PV-2 = poliovirus tipo 2
 PV-3 = poliovirus tipo 3
PV-2_{fs} = poliovirus tipo 2 fotosensible
PVDV = poliovirus derivado de vacuna
PVR = receptor para PV o CD155, del inglés *poliovirus receptor*
RMN = resonancia magnética nuclear
 ¹³C-RMN = resonancia magnética nuclear de ¹³C
 ¹H-RMN = resonancia magnética nuclear de ¹H
RT = retrotranscripción
SFB = suero fetal bovino
SNC = sistema nervioso central
t.a. = temperatura ambiente
Tk = tirosina quinasa
TLC = Cromatografía en capa delgada, del inglés: *thin layer chromatography*
Tol = tolueno
Tr = tiempo de retención
TT = todo el tiempo
UFP = unidades formadoras de placa
UTR = región no codificante, del inglés *untranslated region*
UV = ultravioleta
VSV = virus de la estomatitis vesicular
VZV = virus de la varicela Zoster
wt = cepa salvaje, del inglés: *wild type*

I - INTRODUCCIÓN

I - Introducción

1. Consideraciones generales

1.1. Impacto de las infecciones virales en la salud humana

Los virus son partículas submicroscópicas, acelulares y metabólicamente inertes que contienen un genoma de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), pudiendo estar o no rodeado de una membrana lipídica. A diferencia de las bacterias, los virus son parásitos intracelulares obligados, que utilizan la maquinaria de la célula huésped para replicarse y propagarse en la naturaleza. Las infecciones virales pueden causar enfermedades benignas como las verrugas, afecciones moderadas como la gripe; o causar enfermedades más severas como las fiebres hemorrágicas. Como consecuencia de la gran variedad génica, los mecanismos de transmisión, la eficiencia de replicación y la habilidad de persistencia; los virus se han adaptado a todas las formas de vida, ocupando numerosos nichos ecológicos que resultan en enfermedades infecciosas mundialmente diseminadas tanto en humanos, plantas y animales (Chattopadhyay et al. 2009).

En 1990, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó un total de 16 millones de muertes debido a enfermedades infecciosas. Para el 2010, ese valor fue de 15 millones de muertes; que corresponden a alrededor del 25 % de las muertes totales en el mundo (Morens et al. 2004; Khabbaz et al. 2014). En la actualidad se conocen alrededor de 1400 patógenos humanos, de los cuales solamente 20 (especialmente virus y bacterias) son responsables de 2/3 de las muertes reportadas en 2010 (Dye 2014). Por lo tanto, las infecciones virales representan un grave problema de salud a nivel mundial.

Una de las causas por las cuales las infecciones continúan causando gran cantidad de muertes es por la falta de medidas eficientes de control, prevención y/o tratamiento de las mismas. En el caso de las infecciones virales, solamente se aprobaron para el uso humano alrededor de 50 antivirales; de los cuales la mayoría son drogas para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Antonelli and Turriziani 2012). Al bajo número de antivirales disponibles, hay que sumarle la aparición de cepas resistentes a estas drogas, que representan una seria preocupación, especialmente en pacientes inmunosuprimidos. Además, muchos virus causan infecciones crónicas como el HIV para los cuales no existen hasta el momento ni vacunas ni tratamientos efectivos capaces de eliminar el virus del individuo.

Por lo tanto, la búsqueda de nuevos antivirales es una necesidad constante y actual, la cual requiere permanentes esfuerzos.

En este trabajo de tesis, se seleccionaron diferentes virus de importancia clínica, como representativos de diferentes estructuras y naturaleza genómica:

- Poliovirus (PV): perteneciente al género Enterovirus de la familia *Picornaviridae*. Es un virus desnudo, con una cadena simple de ARN de polaridad positiva como genoma. Existen tres serotipos de PV: PV-1, PV-2 y PV-3 que se diferencian entre ellos a nivel de las proteínas de la cápside. Enterovirus 71 (EV71) y coxsackievirus B1 (CxB1) son dos virus pertenecientes a la misma familia y de gran interés clínico por los cuadros neurológicos que pueden causar en las personas infectadas.
- Herpes simplex virus (HSV): perteneciente al género Simplexvirus de la familia *Herpesviridae*. Es un virus envuelto, con una sola molécula de ADN de doble cadena lineal como genoma. De este virus existen dos serotipos, HSV-1 y HSV-2.
- Virus de la diarrea viral bovina (BVDV): perteneciente al género Pestivirus de la familia *Flaviviridae*. Es un virus envuelto, con una sola cadena de ARN de polaridad positiva como genoma. BVDV se incluyó en este estudio como modelo subrogante de HCV, único miembro del género Hepacivirus, con el que se encuentra altamente relacionado filogenéticamente (Buckwold, Beer, and Donis 2003).
- Virus del dengue (DENV): perteneciente al género Flavivirus, tercer género de la familia *Flaviviridae*. Al igual que BVDV y HCV, es un virus envuelto, con una sola cadena de ARN de polaridad positiva como genoma.
- Virus de la estomatitis vesicular (VSV): perteneciente al género Vesiculovirus de la familia *Rhabdoviridae*. Es un virus envuelto, con una sola cadena de ARN de polaridad negativa como genoma.

2. Infecciones causadas por poliovirus

2.1. Generalidades

Poliovirus (PV) es un virus del género de los Enterovirus y es el agente etiológico de la poliomielitis. Las primeras descripciones clínicas de esta enfermedad datan del siglo XIX aunque el agente etiológico, PV, no fue identificado hasta 1908 (De Jesus 2007).

La tasa de mutación del genoma es relativamente alta con una tasa de sustitución de $1,0 \times 10^{-2}$ sustituciones/sitio/año y con tasas de sustituciones no sinónimas de $3,0 \times 10^{-4}$ sustituciones/sitio/año. Por lo tanto, existe como una población de cuasiespecies.

2.2. Estructura de la partícula viral

La partícula viral (Figura 1A) se compone de una cápside de simetría icosaédrica que protege al genoma viral. La cápside comprende 60 copias de cada una de las proteínas VP1-VP4. Las proteínas VP1-VP3 tienen una estructura común de barril con 8 láminas β antiparalelas. VP4 y el extremo N-terminal de VP1 y VP3 están localizadas en la cara interna de la cápside. Las proteínas de la cápside forman una estructura de *canyon* que conforma el lugar de reconocimiento del receptor celular (PVR, del inglés *Poliovirus Receptor*). Una vez reconocido el PVR, se producen cambios irreversibles en el virus, con la eliminación de VP4 de la partícula viral y la extrusión del extremo terminal de VP1; formando así la partícula A (145S) (Curry et al. 1996). Por debajo de la pared del *canyon*, en el centro de la VP1, existe una cavidad denominada bolsillo hidrofóbico, ocupado principalmente por un esfingolípido o palmitato (Figura 1B) (Bergelson & Coyne 2013).

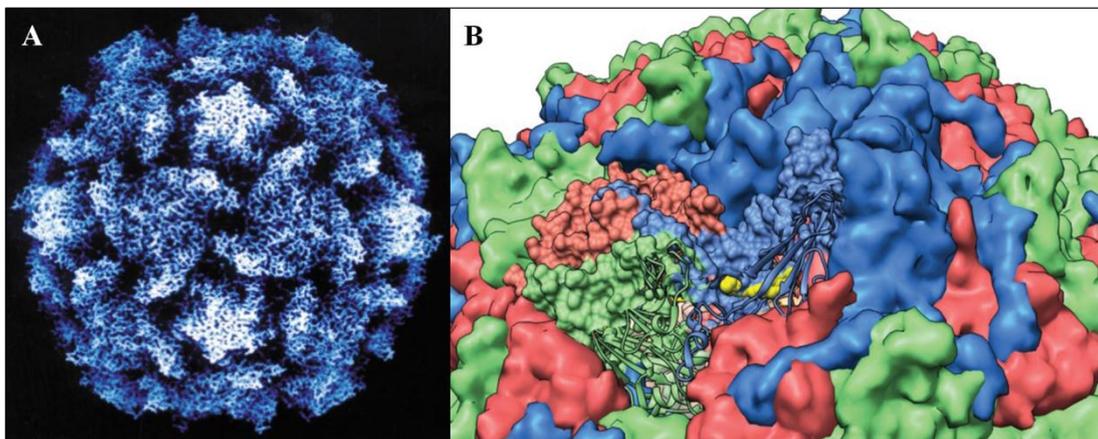


Figura 1: Estructura de la partícula de poliovirus. A.- Estructura por cristalografía de rayos X de alta resolución de la partícula viral. B.- Representación aumentada de las proteínas de la cápside: VP1 (azul), VP-2 (rojo) y VP3 (verde). En amarillo se encuentra representado el esfingolípido (“*pocket factor*”) localizado en el bolsillo hidrofóbico de la VP1. Extraído de Hogle 2002; McKinlay et al. 2014.

2.3. Estructura y organización genómica

El genoma de PV está compuesto de una sola molécula de ARN de simple cadena de polaridad positiva, de alrededor de 7500 nucleótidos. La estructura del genoma viral

consiste en un único frente de lectura abierto que codifica para todas las proteínas virales y flaqueado en dos extremos por secuencias no traducibles (UTR: del inglés *untranslated region*). El extremo 5' UTR tiene covalentemente unida una proteína pequeña, denominada VPg, y el extremo 3' UTR tiene una cola de poliadenilación. Siendo el genoma viral una molécula de ARN polaridad positiva, éste puede ser usado directamente por los ribosomas celulares como ARN mensajero (ARNm), que es inmediatamente traducido a una poliproteína que luego será clivada en los precursores de las diferentes proteínas virales tanto estructurales como no estructurales (P1-P3) (Figura 2).

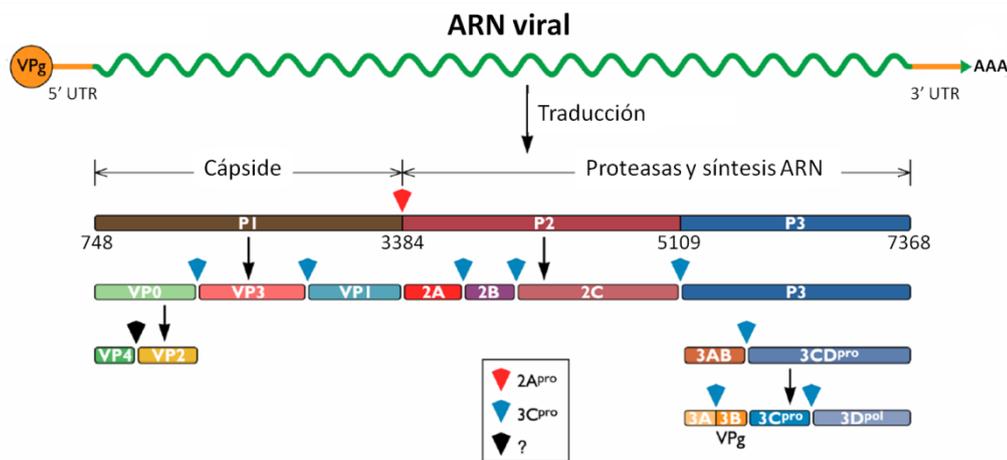


Figura 2: Estructura genómica de poliovirus. La numeración corresponde a los sitios de clivado de la poliproteína y los correspondientes a las proteínas que conforman las cápsides virales, teniendo en cuenta la secuencia de PV-2 Sabin secuenciada por Toyoda (Toyoda et al. 1984). UTR: región no traducible. Figura extraída de http://www.virology.ws/w3310/006_W3310_14.pdf

La región de P1 codifica para las proteínas estructurales o de cápside que son cuatro: VP1, VP2, VP3 y VP4. Las regiones P2 y P3 codifican para siete proteínas no estructurales, P2 codifica las proteasas virales necesarias para el clivaje de los precursores y demás proteínas requeridas para el ciclo de replicación viral; mientras que la región P3 codifica para la ARN polimerasa ARN dependiente (ARN pol/ARN dep) (De Palma, Vliegen, et al. 2008).

El ciclo de replicación viral (Figura 3) de PV ocurre íntegramente en el citoplasma celular. El virus interactúa con su receptor en las superficies de las células del tracto gastrointestinal, el CD155 o PVR. La unión con el PVR induce un cambio de conformación en la cápside de la partícula madura (160S) a una partícula A (145S). Este

cambio de conformación permite que la partícula viral sea capaz de liberar el genoma viral al citoplasma celular. Una vez que el genoma se encuentra en el interior celular, al igual que otros ARN virus, se induce la formación de vesículas membranosas denominadas complejos de replicación, lugar donde se efectuará la síntesis de nuevos genomas y proteínas. Para ello, el ARN viral se transcribe a una molécula de ARN de polaridad negativa formando un intermediario replicativo (ARN de doble cadena). La cadena de ARN negativa será el molde para la síntesis de numerosas cadenas de ARN de polaridad positiva que serán el templado para la síntesis y traducción de proteínas virales y/o serán utilizados como genomas virales, en las partículas virales progenie. Para el armado de las nuevas partículas se requiere del clivado específico del precursor P1 en tres proteínas VP0, VP1 y VP3; que darán lugar a la estructura conocida como cápside viral (80S). Una vez incorporado, la proteína VP0 sufrirá un clivaje adicional que dará lugar a VP2 y VP4 y así generar los viriones maduros (partícula 160S) de la progenie que serán liberados de las células hospedadoras en las que se multiplica por lisis. El tiempo que PV tarda en realizar un ciclo viral completo es de 6 a 10 h, dependiendo del tipo celular que se trate.

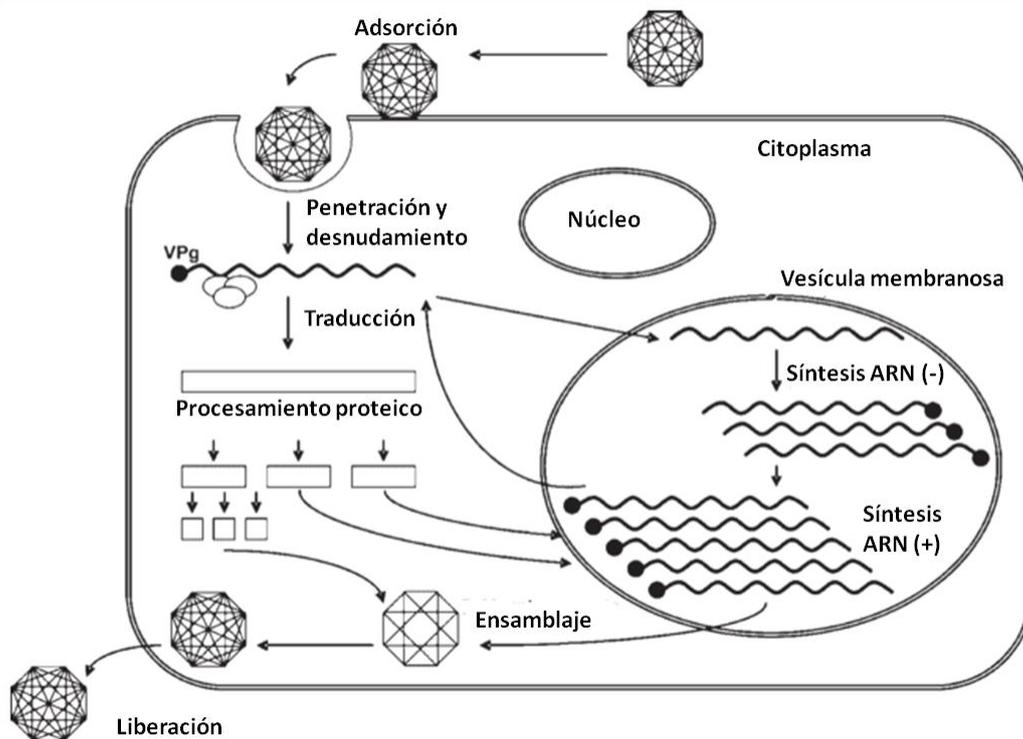


Figura 3: Ciclo de replicación de poliovirus. Las partículas virales se unen al receptor celular y el genoma es liberado al interior de la célula. La proteína VPg es removida del genoma viral para poder ser traducido por los ribosomas celulares y luego clivada por procesamiento proteolítico. Luego, la replicación de los genomas virales continúa en las vesículas membranosas donde la molécula de ARN es copiada por la ARNpol/ARNdep en un intermediario de polaridad negativa [ARN (-)]; que será el templado para la síntesis de los genomas virales de polaridad positiva, ARN (+) y las proteínas de la cápside. Las partículas virales se empaquetan en el citoplasma celular y se liberan de la célula por lisis. Adaptado de De Palma, Vliegen, et al. 2008.

2.4. Epidemiología

La edad es uno de los determinantes más importantes en el resultado de la infección por PV. Los diferentes grupos etarios tienen diferentes susceptibilidades a la infección, severidad de la enfermedad, manifestaciones clínicas y pronosis.

En la actualidad, hay disponibles dos vacunas para la prevención de la infección por PV: una vacuna inactivada o Salk (IPV) y una vacuna atenuada o Sabin (OPV). Una de las mayores desventajas de la vacuna OPV es la posibilidad de reversión de la cepa atenuada con su posterior diseminación. Estas cepas derivadas de la vacuna se denominan cepas de poliovirus derivada de vacuna (PVDV) y el cuadro clínico es indistinguible del cuadro causado por PV salvaje. Si bien se cree que la aparición de

PVDV es un evento raro y varía de acuerdo a las diferentes regiones, se calcula que la tasa de poliomielitis asociada a la cepa vacunal es de 1:750000. PVDV puede circular entre las personas no inmunes o pobremente vacunadas durante años, con la potencialidad de revertir a la cepa neurovirulenta y causar enfermedad paralítica (Collett et al. 2008).

En el año 1988, se lanzó la Iniciativa Global para la erradicación de Polio con gran éxito. Antes de esta iniciativa, la transmisión de PV salvaje era endémica en más de 125 países con alrededor de 350000 personas que se estimaba que por año, desarrollarían enfermedad paralítica (Collett et al. 2008; De Palma, Pürstinger, et al. 2008). Como consecuencia de este plan, desde 1979 no se detectan casos de poliomielitis por PV salvaje en Estados Unidos y desde 1991 en toda la región de América. En la actualidad hay tres regiones catalogadas como libres de PV: América, Europa y la región oeste del Pacífico. Sin embargo, en 2014, PV continua siendo endémico en Nigeria, Pakistán y Afganistán. En Camerún, Guinea ecuatorial, Etiopía, Somalia, Siria e Iraq todavía se reportan casos de parálisis por PVDV (Figura 4).

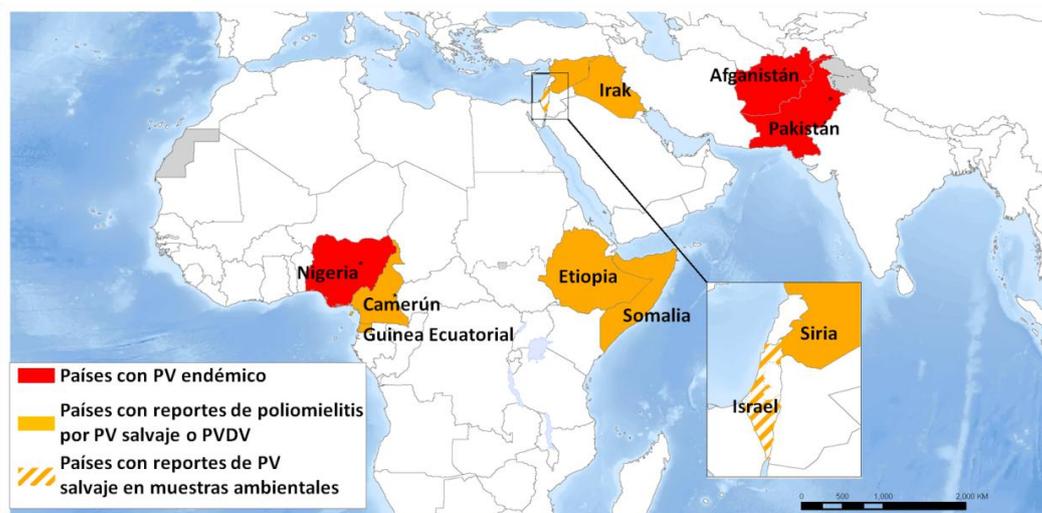


Figura 4: Epidemiología de poliovirus en 2014. En rojo se muestran los países con circulación endémica de PV salvaje; en amarillo los países que reportaron en los últimos 6 meses casos de parálisis por PV salvaje o por PVDV; y en blanco con rayas amarillas países que reportaron en los últimos 6 meses aislamientos en muestras ambientales de PV salvaje. *países donde se reportaron en los últimos seis meses aislamientos de PV salvaje y PVDV. http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_PolioRisk_ITHRiskMap.png?ua=1

En 2014, la OMS declaró la emergencia sanitaria debido a la propagación de PV salvaje en diez países de África y Asia (WHO statement, 2014).

La necesidad de controlar PV en los países donde la transmisión continúa siendo endémica, sumado a la aparición de brotes por PVDV, pone en evidencia la necesidad de contar con, al menos, una droga antiviral capaz de controlar la infección por este virus (De Palma, Pürstinger, et al. 2008). Además, la disponibilidad de una droga anti-PV sería de utilidad para el tratamiento de personas inmunosuprimidas persistentemente infectadas con PVDV, para el tratamiento de la infección y/o enfermedad y para contener futuros brotes en la era post-erradicación (Collett et al. 2008). Hasta el momento, la Administración de alimentos y medicamentos de EEUU (FDA, del inglés: *Food and Drug Administration*) no ha aprobado ninguna droga para su uso en humanos frente a infecciones por este virus o virus relacionados de la misma familia. Sin embargo, diferentes compuestos han sido evaluados como inhibidores de la replicación viral.

2.5. Compuestos descritos con actividad antipoliiovirus

Numerosos compuestos han sido descritos como activos frente a poliovirus y otros enterovirus.

Dependiendo del mecanismo de acción, estos compuestos se pueden clasificar en:

- Inhibidores de cápside: Tienen como blanco el bolsillo hidrofóbico de la cápside, aumenta la rigidez del virión e inhibe la adsorción o la penetración/desnudamiento. Ejemplos: pleconaril, pridodavir, disoxaril, procapavir (V-073).
- Inhibidores de proteasas: tienen como blanco viral las proteasas virales impidiendo el procesamiento de la poliproteína viral en los diferentes componentes no estructurales necesarios para la progresión del ciclo viral. Ejemplo: rupintrivir o sus análogos como el AG7404.
- Inhibidores de la síntesis de ARN viral: ya sea por inhibición de la polimerasa *per se* o como análogos de nucleós(t)idos. Estos compuestos impiden la replicación del genoma viral necesario para la formación de la progenie infectiva. Ejemplos: rivabirina, enviroxima.

El CDC ha evaluado muchos de estos compuestos y la mayoría han sido desechados debido a la potencia insuficiente o selectividad limitada entre la citotoxicidad y actividad antiviral. Los resultados obtenidos hasta la fecha han identificado dos compuestos que cumplen con los criterios de aceptación para un candidato para

desarrollo de un antiviral de poliovirus: el inhibidor de cápside V-073, descubierto por Schering-Plough y actualmente licenciado por ViroDefense Inc; y el inhibidor de la proteasa 3C, AG7404, también actualmente desarrollado por ViroDefence Inc.

Por lo tanto, contar con una droga para el tratamiento de PV será una herramienta importante para el control de la infección y en futuros brotes en la era de post-erradicación. Además, será de utilidad en la administración simultánea con una vacuna para reducir la transmisión y prevenir el desarrollo de parálisis durante algún posible brote mientras se desarrolla la respuesta inmune.

3. Infecciones causadas por herpesvirus

3.1. Generalidades

Herpes simplex virus tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) son miembros de la familia Herpesviridae que infectan humanos. Si bien HSV fue reconocido como un agente infeccioso en el último cuarto del siglo XIX, se han encontrado descripciones de lesiones que se asemejan a las producidas por HSV tablas del siglo III a.C. y en el papiro de Ebers (1500 a.C.).

HSV es un virus altamente contagioso y ubicuo que establece una infección para toda la vida en el organismo de los individuos infectados, al igual que todos los miembros de esta familia. Normalmente entra al hospedador a través del epitelio de la mucosa y causa una infección lítica productiva en muchos tipos celulares, incluyendo fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, durante la cual se expresan más de 80 genes a partir del genoma viral. Después de la infección primaria, HSV-1 se propaga a las células neuronales en los ganglios del trigémino donde se establece la infección latente. Periódicamente, la latencia de HSV es reactivada y causa recurrente infección lítica en el sitio de la infección primaria (Knipe & Howley 2006). Ambos tipos de HSV son ubicuos e infecciosos y causan lesiones en las mucosas orales, periorales, genitales y otras mucosas del organismo pero puede causar patologías mucho más severas, incluyendo ceguera y encefalitis fatal, debido a su infección de células córneas y el sistema nervioso central (Whitley et al. 1982; Streilein et al. 1997; Whitley & Gnann 2002).

3.2. Estructura y organización genómica

Todos los Herpesvirus son virus grandes envueltos con genoma de ADN bicatenario de aproximadamente 200 nm de diámetro. El genoma viral está formado por una cadena lineal de 125 – 290 kbp y contiene ~70 – 200 genes que codifican proteínas, dependiendo del virus específico. Los viriones tienen tres componentes principales (Figura 5): la nucleocápside, el tegumento y la envoltura. La nucleocápside es icosaédrica (T = 16) y está compuesta por 162 capsómeros y reside el genoma viral. Una matriz de proteínas virales llamado el tegumento que se ubica entre la envoltura de bicapa lipídica y la nucleocápside que contiene al menos 20 proteínas distintas. La envoltura contiene glicoproteínas críticas a la entrada, responsables del reconocimiento específico de los receptores celulares; y accesorio de la célula.

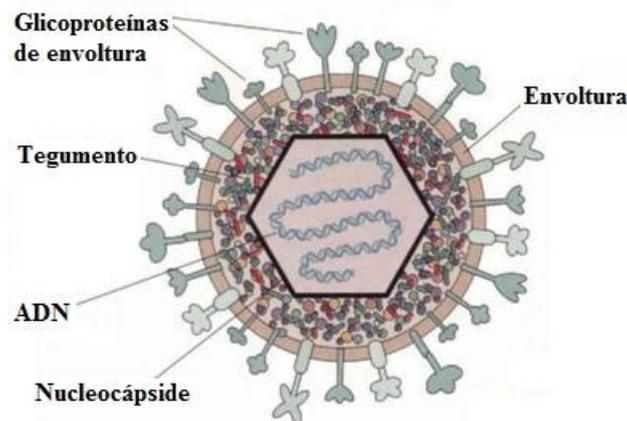


Figura 5: Estructura de HSV-1.

El ciclo viral productivo de HSV (Figura 6) comienza con el reconocimiento específico entre las proteínas de la envoltura viral, gC y gB; con los glicosaminoglicanos presentes en las membranas celulares. Luego, la proteína viral gD puede interactuar con tres receptores específicos celulares (nectinas, los mediadores de entrada de herpes virus y el heparán sulfato). Esta interacción permite la fusión de las membranas lipídicas virales y celulares y la penetración por endocitosis de la cápside viral. La cápside es transportada al núcleo por el citoesqueleto celular donde el ADN es liberado al interior del núcleo a través de los poros nucleares. La transcripción y la replicación del genoma viral, y el ensamblaje de las partículas progenie ocurre en el núcleo.

Luego del empaquetado del genoma viral en las cápsides, la partícula es transportada por las diferentes organelas de la célula. En el sistema del Golgi adquiere la envoltura

final y continúa hasta la membrana plasmática donde es liberada al medio extracelular por exocitosis.

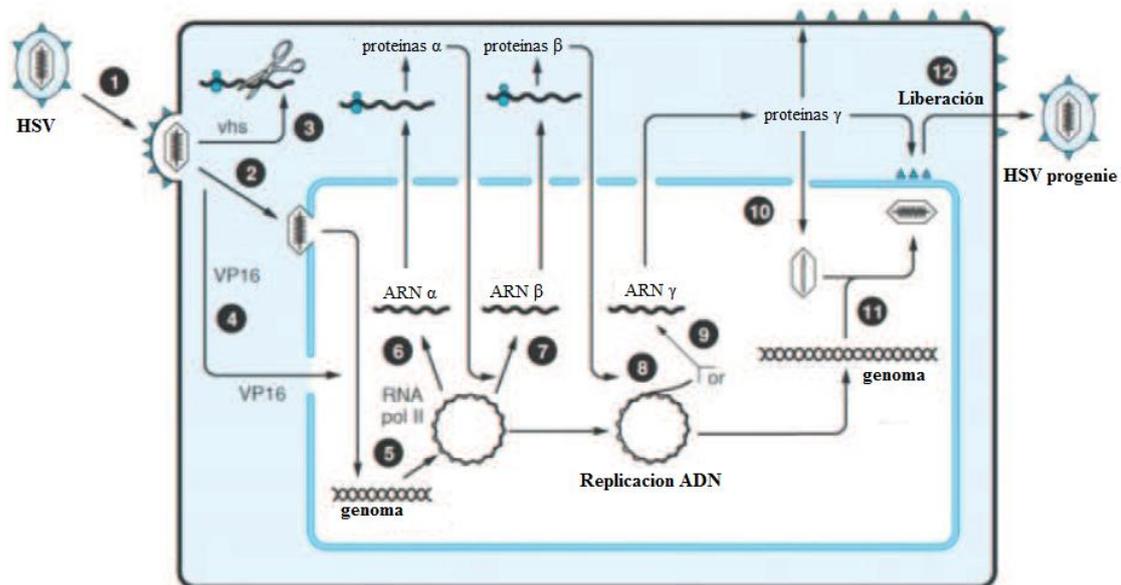


Figura 6: Ciclo de replicación de herpes simplex virus. Las partículas virales se unen a los receptores celulares y mediante fusión de membranas se libera la cápside viral al citoplasma celular (1). La cápside liberada es transportada al núcleo donde solamente el genoma es liberado al interior del núcleo (2). Se inhibe la síntesis de proteínas celulares (3). Luego, la proteína VP-16 transloca al núcleo, que será necesaria para la replicación viral (4). El genoma viral se transcribe en el ARN de las proteínas inmediatamente tempranas (α), tempranas (β) y tardías (γ) y se traducen en el citoplasma (5 a 7). Simultáneamente, el genoma viral también se replica por el modelo de círculo rodante (8 y 9). Las proteínas estructurales y las proteínas tardías se encuentran involucradas en el ensamblaje de las nuevas partículas virales (10). Los genomas son empaquetados (11) y los viriones progenie se liberan de las células (12). Adaptado de Fields Virology.

3.3. Cuadro clínico de las infecciones

La transmisión de HSV depende del contacto de las mucosas entre una persona susceptible y una persona excretando HSV. La primoinfección de HSV-1 depende del contagio a través de la mucosa orofaríngea mientras que HSV-2 es consecuencia de transmisión sexual.

Los cambios patológicos de la infección son consecuencia de las lesiones citológicas de las células infectadas donde replica el virus. Los cambios histopatológicos son compatibles con muerte celular asociado con inflamación. La apariencia de las células infectadas comienza con la condensación de la cromatina en las células epiteliales,

seguidas de las parabasales y las intermedias; formándose células gigantes multinucleadas. Con la lisis celular se libera un fluido claro que contiene restos celulares, partículas infecciosas e intermediarios de la inflamación formando las úlceras pustulares características de esta infección.

3.4. Compuestos antivirales y situación actual de las infecciones por HSV

A partir del desarrollo de la vidarabina, se realizaron grandes avances en el tratamiento de las infecciones por HSV. La vidarabina fue la primera droga terapéutica aprobada para el tratamiento de la encefalitis y la infección neonatal por HSV y por el virus de la varicela Zoster (VZV). Esta droga es un análogo de nucleósido de la adenina que se activa por enzimas celulares en su forma de trifosfato, el cual es capaz de inhibir a la polimerasa de HSV.

En 1982, el aciclovir (ACV) fue aprobado por la FDA y se convirtió en el tratamiento de elección para estas infecciones. El aciclovir trifosforilado (ACV-TP) es un análogo de la guanósina trifosforilada. El ACV ingresa a la célula infectada donde la tirosina quinasa (Tk) viral es la responsable de la primera fosforilación. Las dos fosforilaciones restantes son realizadas por quinasas celulares. La baja toxicidad para las células no infectadas reside en este hecho, es decir la primera fosforilación, ocurre solamente en células infectadas. ACV es un inhibidor específico de HSV-1, HSV-2 y VZV. Luego del ACV, la FDA aprobó otras prodrogas del ACV, como el famciclovir y valaciclovir que mejoran su biodisponibilidad oral.

El uso masivo e indiscriminado de estas drogas, especialmente del ACV, contribuyó a la aparición de cepas resistentes a este antiviral, especialmente cepas de HSV con mutaciones en la Tk, blanco viral de esta droga y; en menor medida, en la ADN polimerasa viral. La prevalencia de estas cepas resistentes en pacientes inmunocomprometidos (recién nacidos, pacientes HIV positivos, pacientes con tratamiento inmunosupresor) es de 4 a 7 % (Astani et al. 2011). Por lo tanto, es importante el desarrollo de nuevos agentes antiherpéticos, preferentemente con un mecanismo de acción diferente al ACV que pudieran ser útiles para el tratamiento de dichos pacientes. Más aún, ningún antiviral aprobado hasta la actualidad es capaz de eliminar la infección por herpesvirus una vez establecida la latencia del virus.

4. Búsqueda de nuevos agentes antivirales

Teniendo en cuenta la situación actual de las infecciones por PV y HSV, la importancia del control de estas infecciones mantiene vigente la necesidad de la búsqueda de nuevas drogas con actividad antiviral capaces de inhibir la replicación de estos virus. Una estrategia exitosa es la búsqueda de nuevas moléculas activas a partir de fuentes naturales como las plantas.

5. Estrategias para el desarrollo de nuevos compuestos antivirales: el uso de las plantas medicinales

La utilización de productos naturales con fines terapéuticos data desde los inicios de la humanidad. El reino vegetal, en particular, constituyó una fuente muy importante en la obtención de remedios, cuya aplicación en forma empírica se relacionaba con las creencias y tradiciones de los diversos pueblos. En el papiro de Ebers (1500 a.C.) se encuentran documentados unos 700 medicamentos, la mayoría a base de las plantas, y diversas formulaciones como infusiones, píldoras y pomadas (Cragg & Newman 2009). Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), una planta medicinal es (a) cualquier planta usada para la prevención, cura o alivio de una patología o que sea capaz de alterar un proceso patológico; o (b) cualquier planta usada como fuente de una droga o de sus precursores. Un preparado fitofarmacéutico o hierba medicinal es cualquier medicina obtenida exclusivamente a partir de una planta, ya sea en estado crudo o como un preparado farmacéutico (Rates 2001).

De acuerdo a estimaciones de la OMS, cerca del 80 % de la población de los países en vías de desarrollo utiliza la medicina tradicional en el cuidado primario de la salud, principalmente las plantas medicinales (Gilani 2005).

Según Newman y Cragg los productos naturales juegan un rol muy importante en los procesos de descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas ya que constituyen una alternativa interesante para la obtención de nuevas moléculas bioactivas por su gran diversidad estructural comparada con la de las moléculas de síntesis (Newman & Cragg 2012). A comienzos del siglo XIX, el desarrollo de la química orgánica impulsó la investigación para identificar cuáles eran los compuestos responsables de las actividades farmacológicas atribuidas a las plantas. Es así como el reino vegetal se convirtió en la primera fuente de sustancias para producir fármacos como la morfina, digoxina, quinina, quinidina, salicina, emetina y atropina, entre otros, los cuales fueron

descubiertos sobre la base de los usos tradicionales de sus fuentes de obtención. Muchos compuestos aislados de plantas han dado lugar a importantes citotóxicos que están disponibles en el mercado en la actualidad como el paclitaxel, camptotecina, artemisinina, podofilotoxina, vincristina y vinblastina, entre otros, así como sus derivados semisintéticos.

Entre los antivirales derivados de plantas, se encuentra el ácido shikímico que se extrae de la planta *Illicium verum* conocida como anís estrellado de la China. Este compuesto es el precursor del oseltamivir (Tamiflu®) inhibidor específico del virus de la Influenza. El ácido shikímico no ha podido ser sintetizado de forma económica, por lo que aún hoy, este precursor se extrae a partir de su fuente natural (Escalante et al. 2010).

Con la aparición de la pandemia del SIDA en la década del 80, el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, junto a otras organizaciones, iniciaron un proyecto de investigación con el fin de identificar potenciales agentes de origen natural para el tratamiento de esta enfermedad y de otras infecciones oportunistas asociadas. Más de 60000 extractos obtenidos a partir de plantas y de organismos marinos fueron ensayados *in vitro* contra células linfoblásticas infectadas con HIV-1. Varios extractos de plantas demostraron una actividad significativa y se aislaron e identificaron los compuestos activos: los calanólidos, aislados de especies de *Calophyllum* (Kashman et al. 1992) y la prostratina, aislada de *Homolanthus nutans* (Johnson et al. 2008). La prostatina y otros compuestos relacionados han sido también evaluados frente al virus Chikungunya con excelentes IS (Sanchez-Duffhues et al. 2011; Bourjot et al. 2012).

6. Familia Asteraceae

6.1. Aspectos generales

La familia Asteraceae (del griego Aster = astro o estrella) es la más numerosa de las fanerógamas, con aproximadamente 23500 especies repartidas en unos 1600 géneros. Inicialmente, se la denominó Compositae aludiendo a la inflorescencia tan característica de este gran conjunto de plantas, conocida también como la familia de las “flores compuestas”. Se encuentra ampliamente distribuida en todos los continentes excepto la Antártida (Da Costa et al. 2005), siendo especialmente abundante en zonas tropicales y subtropicales. En muchas regiones del mundo las Asteraceae llegan a integrar hasta el 10 % de la flora de la zona. En Argentina es la familia mejor representada con unos 200 géneros y unas 1460 especies espontáneas. Alrededor de 300 de estas especies habitan

en la provincia de Buenos Aires (Barboza et al. 2009). La mayoría de las plantas pertenecientes a esta familia son plantas herbáceas, pero también es posible encontrar árboles, arbustos o enredaderas. Se caracterizan por presentar una inflorescencia denominada capítulo, que está formado por flores sésiles sobre un receptáculo común rodeado por un involucre de brácteas. Los frutos se conocen como aquenios, y se encuentran coronados por estructuras escamosas llamadas papus que ayudan a la dispersión de las semillas (Cabrera et al. 2000). Las Asteraceae comprenden más de 40 especies de importancia económica, las cuales incluyen plantas alimenticias (lechuga, achicoria), oleaginosas (girasol, cártamo), medicinales (manzanilla, alcachofa, artemisia, cardo mariano) y ornamentales (dalia, crisantemo). En cuanto a su composición química, se ha descrito la presencia de diferentes metabolitos secundarios como terpenoides (diterpenos, triterpenos, lactonas sesquiterpénicas), flavonoides, alcaloides, cumarinas, poliacetilenos, benzofuranos, glucósidos cianógenéticos y aceites esenciales, entre otros. Sin embargo, menos del 40 % de las especies de Asteraceae han sido evaluadas en cuanto a su composición química y actividades biológicas.

6.2. Especies vegetales seleccionadas

Todas las plantas estudiadas en este trabajo de tesis pertenecen a la familia Asteraceae. En la tabla 1 se describen todas las especies estudiadas, con los usos tradicionales y actividades biológicas descritas para cada una de ellas.

Tabla 1: Especies vegetales seleccionadas

Especie	Nombre común	Uso popular *	Actividades biológicas *
<i>Baccharis articulata</i>	Carquejilla, carqueja blanca	Hepática, digestiva, antiséptica, colagoga, hepatotónica, antidiabética, febrífuga, antihelmíntica, antidiarreica, diurética, tratamiento externo de heridas, estimulante sexual, infecciones del tracto respiratorio y urinario.	Actividad antiviral, antiinflamatoria y antioxidante.
<i>B. crispa</i>	Carqueja	Diurética, hepatoprotectora, digestiva, colagoga, tónico, tratamiento de úlceras, antiséptica, antihelmíntica, febrífuga, afrodisíaca, tratamiento externo de heridas, y de la seborrea.	Antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana, antifúngica.
<i>B. gaudichaudiana</i>	Carqueja, carqueja doce, chilca melosa	Digestiva, hepatoprotectora, antidiabética, antidiarreica, tratamiento de infecciones del tracto urinario y respiratorio.	Actividad antioxidante, antileishmaniasis, actividad citotóxica.
<i>B. penningtonii</i>		Sin reportes sobre usos medicinales.	Sin reportes sobre actividades biológicas.
<i>B. phyteumoides</i>		Sin reportes sobre usos medicinales.	Sin reportes sobre actividades biológicas.

<i>B. spicata</i>	Carqueja, chilca blanca	Sin reportes sobre usos medicinales.	Actividad tripanocida.
<i>B. trimera</i>	Carqueja, carqueja crespa, amargosa	Desórdenes gastrointestinales, digestiva, colagoga, analgésica, hepatoprotectora, antiséptica, antirreumática, tónica, febrífuga, antidiabética, diurética, contra la impotencia masculina y la infertilidad femenina, antiinflamatoria, cuidado neonatal y pediátrico y dolores y enfermedades de posparto.	Actividad antimicrobiana, antiviral, analgésica, bactericida, antileishmaniasis, diurética, antioxidante, antimutagénica, hipoglucémante, antirreumática, relajante, antiinflamatoria, protector gástrico.
<i>B. tucumanensis</i>	Suncho blanco, chilca	Abortiva.	Sin reportes sobre actividades biológicas.
<i>Bidens subalternans</i>	Amor seco, saetilla	Oftálmica, digestiva.	Actividad antiinflamatoria y antibacteriana.
<i>Eupatorium buniifolium</i>	Chilca, romerillo, romero	Tónico amargo, desinfectante, hepatoprotectora.	Actividad antiviral, tripanocida, leishmanicida, antiinflamatoria, antioxidante, propiedades inmunomoduladoras, inhibición de la ADN polimerasa y la proliferación celular.

<i>Pluchea sagittalis</i>	Lucero, hierba lucera, quitoc quitoco, lusera, cuatro cantos	Tónico amargo, hepatoprotectora, colerética, antiespasmódica, digestiva, colagoga, carminativa, antipirética, antidisentérica, antitusiva, antiséptica, febrífuga, antidiarreica.	Actividad antioxidante, inhibición de la síntesis de proteínas y de las especies reactivas del oxígeno.
<i>Tagetes minuta</i>	Chinchilla, suico, sui que, chilchil, margarita, floramar	Carminativa, digestiva, diurética, antiespasmódica, antimicrobiana, antifúngica, antitusiva, control de la pediculosis y alopecia, detergente, antihelmíntica, desinfectante y para las infecciones y dolores posparto.	Actividad antitumoral, antiviral y antimicrobiana, hipotensiva, broncodilatadora, espasmolítica, antiinflamatoria, antidepresiva.
<i>Tessaria absinthioides</i>	Pájaro bobo, chilca, suncho rosado, brea, suncho negro	Balsámica, expectorante, hipocolesterolemia nte.	Actividad antiinflamatoria y virucida.

* Datos extraídos de Barboza, Cantero, Núñez, Pacciaroni, & Espinar, 2009.

6.3. Género *Baccharis*

6.3.1. Aspectos generales

El género *Baccharis* es el más abundante de la familia Asteraceae con más de 500 especies distribuidas principalmente en las regiones templadas y tropicales de Brasil, Argentina, Colombia, Chile y México. Especies pertenecientes a este género son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de heridas y úlceras, fiebre, enfermedades gastrointestinales, como diuréticas y analgésicos, y en el tratamiento de la diabetes e infecciones bacterianas y fúngicas, entre otras (Gupta 1995; Gomes Rofrigues & de Carvalho 2001). La fitoquímica del género *Baccharis* se ha estudiado desde comienzos del 1900. En la actualidad se han identificado más de 150 compuestos principalmente pertenecientes al grupo de los terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos del tipo neo-clerodanos y labdanos) y compuestos fenólicos (flavonoides, cumarinas y ácidos cafeoilquínicos) (Abad & Bermejo 2007).

6.3.2. Actividad antiviral en el género *Baccharis*

En la literatura se encuentra descritos algunos extractos y compuestos aislados de diferentes especies de *Baccharis* con actividad antiviral como: tricotecenos macrocíclicos aislados de *B. coridifolia* con actividad contra el Virus Junín (García et al. 2002); extractos de *B. crispa* y *B. notoserquilla* capaces de inhibir la replicación de VSV y PV (Jose et al. 2005); ácidos dicafeoilquínicos aislados de *B. genistelloides* como inhibidores de la integrasa de HIV (Robinson et al. 1996); diferentes extractos de *B. trinervis*, *B. erioclada*, *B. megapotamica* y *B. uncinella* con actividad anti-HSV (Abad, Bermejo, Palomino, et al. 1999; Montanha et al. 2004). Extractos de *B. genistelloides* presentaron actividad antiviral frente a HSV-1 y VSV (Abad, Bermejo, Gonzales, et al. 1999), *B. trinervis* inhibió a HSV-1 y HIV (Sanchez Palomino et al. 2002) y *B. dracunculifolia* presentó actividad frente a PV (Búfalo et al. 2009).

6.4. *Baccharis gaudichaudiana*

6.4.1. Aspectos generales

B. gaudichaudiana (Figura 7A) es un arbusto que crece en la región de Argentina, Brasil y Paraguay y que mide 50-100 cm de alto, ramosos y con los tallos delgados. Sus flores (Figura 7B) se encuentran reunidas en capítulos solitarios o agrupados. En

nuestro país se encuentra distribuido en la región noreste, especialmente en las provincias de Misiones, Corrientes, Santa Fe y Chaco. Tradicionalmente es utilizada como digestiva, antidiarreica, para el tratamiento de infecciones respiratorias y urinarias y para tratar problemas hepáticos (Barboza et al. 2009). En Paraguay, además, es usada para tratar la diabetes y problemas gastrointestinales (Akaike et al. 2003).



Figura 7: Especie vegetal *Baccharis gaudichaudiana* (Asteraceae)

6.4.2. Composición química

De *B. gaudichaudiana* se han aislado e identificado diferentes compuestos pertenecientes principalmente al grupo de los flavonoides y terpenoides como lactonas sesquiterpénicas y diterpenos. Un tipo particular de diterpenos, los gaudichaudiósidos, son responsables de su sabor, que puede ir de dulce a amargo o neutro (Fullas et al. 1994). Entre los compuestos identificados se encuentran: apigenina, hispidulina, espatulenol, ácido ursólico, bacchariol, jaceosidina, desmetoxicentauridina, quercetina-3-*O*-L- α -ramnósido, eupafolina, eupatilina, ácido 3,5-dicafeoilquínico, isoschaftósido, gaudichaudiósidos A - F, gaudichaudol A - C, gaudichaudona, acetato de articulina, kobusona, defucsina y rutina (Akaike et al. 2003; Fullas et al. 1994; Hayashi et al. 2005).

6.4.3. Propiedades farmacológicas

Diversas propiedades farmacológicas se han estudiado sobre diversos extractos de *B. gaudichaudiana* o sobre los compuestos purificados de la misma.

Quercetina-3-*O*-L- α -ramnósido, eupafolina, rutina, ácido 3,5-dicafeoilquínico e isoschaftósido mostraron moderada actividad antioxidante (Akaike et al. 2003).

Gaudichaudol C es capaz de inhibir la replicación in vitro de la línea celular P-388, derivada de células leucémicas; y de la línea KB-V1, línea celular derivada de

carcinoma epidérmico multirresistente. El acetato de articulina fue capaz de inhibir solamente la replicación de la línea P-388.

Los flavonoides apigenina e hispidulina demostraron poseer moderada actividad antitumoral (Fullas et al. 1994).

6.5. Género *Eupatorium*

6.5.1. Aspectos generales

El género *Eupatorium* pertenece a la tribu Eupatorieae y comprende alrededor de 600 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales de las Américas, Europa, Asia y África (Zhang et al. 2008).

En nuestro país existen 82 especies de *Eupatorium*, 35 de las cuales crecen en la provincia de Jujuy (Cabrera 1978) y 19 llegan a la provincia de Buenos Aires (Cabrera & Zardini 1978). Quince de estas especies son medicinales. Sus infusiones o decocciones se utilizan como febrífugas, digestivas, estomacales o antidiarreicas.

Químicamente este género se caracteriza por la presencia de terpenoides (lactonas sesquiterpénicas, mono y sesqui terpenos y triterpenos), flavonoides y otros compuestos de naturaleza fenólica y alcaloides pirrolizidínicos.

6.6. *Eupatorium buniifolium*

6.6.1. Aspectos generales

Eupatorium buniifolium Hook & Arn. var. *buniifolium* (Asteraceae) es un arbusto de 0,8 a 2 m de altura, compuesto de ramas delgadas, glabras, con gran cantidad de hojas (Figura 8A). Las flores (Figura 8B) se distribuyen de 5-6 por capítulo. Presenta cáliz, corola de color violáceo, gineceo con único estilo y estigma alargado, formando dos filamentos, posiblemente, papilas. Las anteras son apendiculadas en el ápice y obtusas en la base. La disposición es en capítulos, pequeños y dispuestos en panojas más o menos péndulas.

Tradicionalmente se lo conoce con los nombres de “chilca”, “chirca”, “romerillo”, “romerillo colorado”, “romerito” y “romero” (Cabrera et al. 2000). Esta especie crece en Uruguay, Paraguay, Bolivia y el sur de Brasil. En nuestro país se encuentra distribuida en el norte y centro en las provincias de Catamarca, Córdoba, Entre Ríos, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Salta, San Luis y Tucumán (Cabrera & Zardini 1978).

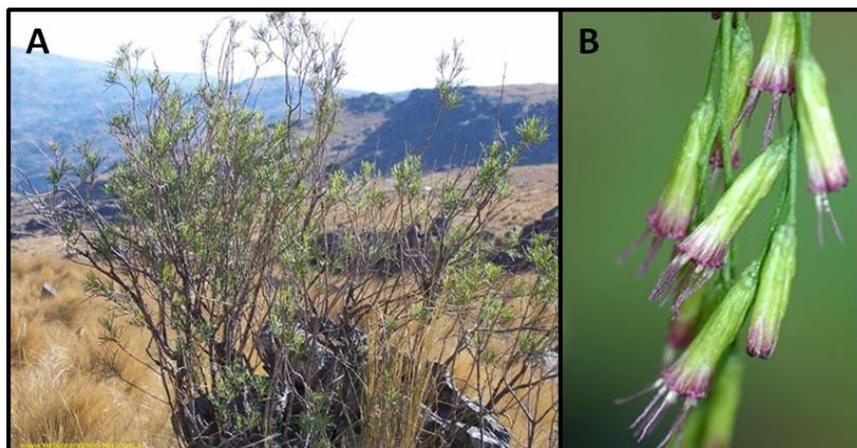


Figura 8: Especie vegetal *Eupatorium buniifolium* (Asteraceae)

En la literatura se encuentran diversos usos medicinales de esta planta: desinfectante, para el tratamiento de enfermedades del hígado y riñones. También se describe su uso contra los temblores y frente a enfermedades nerviosas o como fortificador del cerebro; como cura del reumatismo, para desinflamar articulaciones inflamadas y contra las inflamaciones estomacales (Rojas Acosta 1905; Sagesse 1959; Villafuerte 1984; Rios et al. 1993; Burgstaller Chiriani 1999). Además se la describe con propiedades tintóreas (Zardini 1984)

6.6.2. Composición química

La composición química de *E. buniifolium* está ampliamente estudiada y diferentes compuestos han sido aislados e identificados, pertenecientes al grupo de los flavonoides, terpenoides, diterpenos del tipo ent-labdanos o cumarinas. Entre los compuestos identificados se encuentran: salvigenina, acetina, centaureidina, jaceidina, escopoletina, 1-O-p-cumaroil- β -D-glucopiranososa, los ácidos poliáltico y nivenólido, santina, eriodictiol, quercetina, rutina, hiperósido, brickellina, la 5, 7, 5'-trihidroxil-3,6,2', 4'-tetrametoxiflavona, 7-(3'-CH₃-2'-buteniloxi)-6-OCH₃ cumarina y los ácidos cafeico, clorogénico y el éster 4-OH-3-metilbutílico del ácido 3-(4-OH-3-metoxifenil)-2-propenoico (Caula et al. 1991; Muschiatti et al. 1994; Carreras et al. 1998; Muschiatti 2002).

6.6.3. Propiedades farmacológicas

E. buniifolium es una planta cuyas actividades farmacológicas ha sido ampliamente estudiadas, ya sea sobre diversos extractos o sobre los compuestos aislados de la misma.

El extracto etanólico de las partes aéreas fue capaz de inhibir la replicación de HSV-1 (García et al. 1990) y del virus de pseudorrabia porcina (Zanon et al. 1999). Los extractos diclorometánico, metanólico y acuoso poseían alta citotoxicidad con la capacidad de inhibir el crecimiento de tumores (Fernández et al. 2002). Los extractos acuosos y orgánicos de esta planta fueron capaces de inhibir el crecimiento de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. A partir del extracto orgánico con actividad tripanocida fue aislado un flavonoide, santina, responsable de dicha actividad (Sülsen et al. 2006). En el extracto metanólico se detectó actividad antifúngica contra *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (Muschiatti et al. 2005).

Se ha descrito la actividad nociceptiva del extracto acuoso demostrada por la capacidad para inhibir las contracciones abdominales producidas por el ácido acético, en modelos de nocicepción en ratones (Miño et al. 2005). Este extracto resultó un depresor del sistema nervioso central, provocando una inducción del sueño en forma dosis dependiente y una potenciación de las dosis sub-hipnóticas e hipnóticas del pentobarbital, sin inhibir la actividad motora y sin producir un efecto miorrelajante. (Miño et al. 2007).

Compuestos aislados del extracto diclorometanólico (centaureidina, escopoletina y 5,7,5'-trihydroxy-3,6,2',4'-tetramethoxyflavona), presentaron una significativa actividad antiinflamatoria en el modelo del edema en oreja de ratón (Muschiatti et al. 2001).

Otras actividades biológicas evaluadas con el extracto acuoso, como la actividad colerética mostraron un efecto colerético significativo, con baja toxicidad.

Este extracto presentó actividad antioxidante, debido a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides que actuarían como inhibidores de los radicales libres (Gorzalczany et al. 2008).

Otro estudio demostró que el extracto diclorometánico y la infusión de *E. buniifolium* inhibían la liberación de elastasa por los neutrófilos, demostrando su acción antioxidante (Payá et al. 1996).

Debido a la importancia de la familia Asteraceae en la medicina tradicional, resultó de interés evaluar las propiedades antivirales de plantas medicinales argentinas y la búsqueda de compuestos activos a partir de las mismas.

II – HIPÓTESIS y OBJETIVOS

II – Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Las plantas de la familia Asteraceae son ricas en compuestos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos o ácidos hidroxycumarínicos; y terpenoides como diterpenos y lactonas sesquiterpénicas. Muchas especies de esta familia son usadas tradicionalmente en nuestro país para prevenir o aliviar síntomas relacionados con posibles infecciones virales.

Entonces, si las plantas son fuente de diversos compuestos químicos con diversas acciones farmacológicas, será posible encontrar en los extractos de estas plantas actividad antiviral y, probablemente luego del fraccionamiento bioquímico, compuestos activos que puedan potencialmente dar lugar al desarrollo de antivirales útiles en salud humana. Si se dispone de los compuestos puros se podrá estudiar el mecanismo de acción antiviral a nivel molecular así como definir el blanco de acción.

La identificación del principio activo permitirá demostrar si se trata de una estructura novedosa o si es un compuesto ya descrito pero cuya actividad antiviral nunca ha sido estudiada. Esto permitirá dar valor agregado a las plantas medicinales de la flora argentina y en un futuro diseñar derivados más activos que puedan ser obtenidos por semi-síntesis (modificación química) o síntesis (síntesis del compuesto) y ser la base de un antiviral que pudiera ser utilizado para el tratamiento de las infecciones con los virus que resulten susceptibles al compuesto.

La información obtenida a partir de este trabajo de tesis doctoral, contribuirá además, al conocimiento de la potencialidad de las plantas medicinales argentinas.

Objetivos

Objetivo general

Sobre la base de los antecedentes planteados el **objetivo general** de este trabajo de tesis doctoral es evaluar la potencialidad de siete plantas medicinales Argentinas de la familia Asteraceae: *Baccharis gaudichaudiana*, *B. spicata*, *Bidens subalternans*, *Eupatorium buniifolium*, *Pluchea sagittalis*, *Tagetes minuta* y *Tessaria absinthioides* como fuente de compuestos con actividad antiviral frente a varios virus seleccionados: BVDV, virus del dengue, HSV, PV y VSV.

Objetivos específicos

Para el alcance del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad antiviral *in vitro* de los extractos orgánicos y acuosos de las plantas seleccionadas frente a BVDV, virus del dengue, HSV, PV y VSV.
2. Caracterizar el mecanismo de acción de los extractos con mayor índice de selectividad.
3. Aislar, purificar e identificar el/los compuestos responsables de la actividad antiviral a partir de los extractos activos detectados.
4. Estudiar la actividad antiviral de los compuestos activos puros:
 - 4.1. Caracterizar el mecanismo de acción antiviral e identificar el blanco molecular de inhibición.
 - 4.2. Estudiar el espectro de acción antiviral.
5. Estudiar de la actividad antiviral en otras plantas del mismo género al que perteneciera aquella planta que resultara activa.

III – MATERIALES y MÉTODOS

III - Materiales y Métodos

1. Reactivos y equipamiento

Los solventes utilizados diclorometano (CH_2Cl_2), n-hexano (Hx), acetato de etilo (AcEt), etanol (EtOH), metanol (MeOH), ácido acético (AcH) fueron de calidad Pro Analisis A.C.S. (Sintorgan, Argentina).

Los reactivos fueron de calidad analítica (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania): cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl), fosfato dibásico de sodio dihidratado; fosfato monobásico de potasio.

El agua destilada se obtuvo en un destilador F.M.4, Figmay, Argentina.

El agua calidad HPLC se obtuvo con un purificador de agua Labconco ®-Water Pro TM OS.

Los solventes se concentraron en un evaporador rotatorio R-215 (Büchi Labortechnik AG, Suiza). Los extractos acuosos se liofilizaron en un liofilizador FTS System.

El material vegetal se secó a temperatura ambiente (t.a.) y se redujo a polvo utilizando un molino a cuchillas (Arthur H. Thomas Co).

Las cromatografías en placa delgada (TLC, del inglés: *Thin Layer Chromatography*) se realizaron en placas de silicagel 60 F₂₅₄ (Merck KGaA) y/o cromatofolios de celulosa Polygram ® CEL 300 UV 254 (Macherey-Nagel, Alemania). Las cromatografías a escala preparativa se realizaron en placas de silicagel 60 F₂₅₄, 2 mm (Merck KGaA). La observación de los cromatogramas se realizó con luz ultravioleta (UV) ($\lambda = 254 \text{ nm}$ y $\lambda = 366 \text{ nm}$) con una lámpara UV (Desaga, Heidelberg, Alemania) o bajo la luz natural y mediante el revelado de diferentes reactivos.

El reactivo revelador Anisaldehído Sulfúrico (AniS) se preparó mezclando 0,5 ml de p-anisaldehído de grado analítico (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) con 10 ml de AcH glacial y 85 ml de MeOH. Finalmente, se agregaron 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (Merck KGaA, Alemania). El reactivo se guardó a 4° C hasta su uso. Para el revelado, se rociaron las placas de TLC y se calentaron por 10 min a 100 °C en una estufa de secado (Ionomex, Argentina).

El reactivo revelador de productos naturales (NPR, del inglés: *Natural Product Reagent*) se preparó disolviendo 1 g de ácido 2-aminoetildifenilbórico (Sigma, St. Louis, EEUU) en 100 ml de MeOH. Luego del revelado, las placas se observaron a la luz natural y a luz UV de 366 nm.

La fase estacionaria (FE) utilizada para las cromatografías en columna fue silicagel 60 (70-230 mesh - Macherey-Nagel – MN –, Alemania).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) protónica (^1H -RMN) y de carbono (^{13}C -RMN) se midieron a 300 MHz en un equipo Bruker MSL300. El solvente utilizado fue cloroformo deuterado y los desplazamientos químicos se registraron en ppm relativos al tetrametilsilano.

Los espectros de masa se midieron con un espectrómetro de masa de impacto electrónico (70 eV) en un equipo Shinadzu OP 5000-GC17A.

Los espectros infrarrojos (IR) se realizaron en un equipo Nicolet 380 (Thermo Scientific, Florida, EEUU), en fase sólida (pastillas de KBr) (KBr UVASOL® - Merk).

Los espectros de ultravioleta (UV) se realizaron con un espectrofotómetro Jasco V-630.

Los espectros se realizaron en MeOH y se utilizaron los siguientes reactivos de desplazamiento químico: metóxido de sodio, cloruro de aluminio, cloruro de aluminio + ácido clorhídrico concentrado, acetato de sodio y acetato de sodio + ácido bórico (Mabry et al. 1970).

Las centrifugaciones se realizaron en un centrífuga refrigerada LC-25DR (Luiguimac, Buenos Aires, Argentina).

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC, del inglés: *high-performance liquid chromatography*) se realizó en un cromatógrafo Waters® 600, equipado con una bomba Waters Delta 600 y un detector de fotodiodos y analizados con el software Empower®. Se utilizaron solventes grado HPLC (Merck). Se usó una columna LichroCART® Lichrospher® 100 RP-18 (125 x 4 mm; 5 µm, Merck, Alemania).

2. Líneas celulares

Células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde – ATCC-CLL81) se obtuvieron de la Asociación Banco Argentino de Células. Se cultivaron en medio de crecimiento (MC) con medio mínimo esencial de Eagle en solución salina de Earle (E-MEM, GIBCO, n° catálogo 11700-077) suplementado con 2,25 g/L de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 10 µg/ml estreptomina, 100 UI/ml penicilina, 100 µM aminoácidos no esenciales (AANES, GIBCO, n° catálogo 11140), 2 mM L-Glutamina y 10 % de suero fetal bovino (SFB - PAA) a 37°C con 5 % CO_2 . Se utilizó como medio de infección (MI) el mismo medio, pero suplementado con 2 % SFB. El medio de placa (MP) consistió en MI con 1 % metilcelulosa (Sigma, n° catálogo M0512-100G).

La línea celular **MDBK** (*Mardin-Darby Bovine Kidney cell* – ATCC-CLL22) se cultivó en el mismo MC que las células Vero pero suplementado con 10 % de SFB γ -irradiado (PAA). El MI para las células MDBK, fue suplementado con 2,5 % de suero de caballo (GIBCO, n° catálogo 16050-122).

La línea celular **Rd** (Células de rhabdomyosarcoma de músculo humano – ATCC-CLL136) fue propagada en MC con D-MEM suplementado con 2,25 g/L NaHCO₃, 10 μ g/ml estreptomicina, 100 UI/ml penicilina, 100 μ M AANES, 2 mM L-Glutamina, 100 μ M piruvato de sodio (GIBCO, n° catálogo 11360070) y 10 % de SFB a 37°C con 5 % CO₂. Se utilizó como MI al mismo medio, pero suplementado con 2 % SFB y el MP se preparó con MI más 1% metilcelulosa.

3. Virus

Herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1) cepa F y herpes simplex virus tipo 2 (HSV-2) cepa G fueron cedidos por el Dr. Albert Epstein. La cepa de HSV-1 cepa 2006 resistente al ACV fue cedida por la Dra Laura Alché, de la Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Los virus de poliovirus tipo 1 (PV-1), tipo 2 (PV-2) y tipo 3 (PV-3), todos cepa Sabin, fueron cedidos gentilmente por la Dra. María Cecilia Freire del Instituto ANLIS-Dr. Carlos G. Malbrán, Argentina. El virus de la diarrea viral bovina (BVDV) tipo 1 cepa NADL, biotipo cp (BVDV-1, ATCC VR 534) fue cedido por la Dra. Laura Weber, INTA Castelar, Argentina. El virus de la estomatitis vesicular (VSV) fue adquirido al ATCC. Enterovirus 71 cepa BrCr (EV71) y Coxsackie B virus tipo 1 cepa Conn-5 (CVB-1) fueron cedidos por el Dr. Daniel Cisterna del servicio de Neurovirología, ANLIS-Instituto Dr. Carlos G. Malbrán, Argentina. El virus de Dengue tipo 2 (DENV) cepa 16681 fue cedido por la Dra. Andrea Gamarnik de la Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires.

Los stocks virales de DENV, PV, HSV y VSV fueron obtenidos y cuantificados por el método de placas virales (UFP/ml) en células Vero y en células MDBK para BVDV. Los stocks virales correspondientes a CxB1 y EV71 fueron propagados y cuantificados en células Rd. Todos los stocks virales fueron conservados a temperaturas de -70 °C hasta su utilización.

4. Material Vegetal. Recolección e identificación

Las plantas medicinales estudiadas en este trabajo de investigación pertenecen todas a la familia Asteraceae y fueron recolectadas en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Entre Ríos, Santa Fe y Tucumán, Argentina entre los años 2005 y 2010. La información sobre los datos de recolección e identificación se encuentra resumida en la Tabla 2.

Tabla 2: Información sobre los datos de recolección e identificación de las especies de plantas vegetales seleccionadas.

Especie	N° herbario	Época de recolección	Lugar de recolección	Identificado por:
<i>B. articulata</i> (Lam.) Pers.	Ba1 ⁺	Marzo 2010	Rosario, Santa Fe	Dra. S. Gatusso
<i>B. crispa</i> Spreng	Bc1 [^]	Marzo 2005	Punilla, Córdoba	L. Oakle
<i>B. gaudichaudiana</i> DC.	N° 2019 ⁺	Septiembre 2010	Rosario, Santa Fe	Dra. S. Gatusso
<i>B. penningtonii</i> Heering	S. Gatusso 80 1650 ⁺	Marzo 2006	Entre Ríos	Dra. S. Gatusso
<i>B. phyteumoides</i> (Less.) DC.	S. Gatusso 807 1651 ⁺	Marzo 2006	Entre Ríos	Dra. S. Gatusso
<i>B. spicata</i> (Lam.) Baill.	G. Giberti 710 [^]	Mayo 2008	Entre Ríos	Dr. G. Giberti
<i>B. trímera</i> (Less.) DC.	M1 ⁺	Diciembre 2005	Pronunciamiento, Entre Ríos	Dra. S. Gatusso
<i>B. tucumanensis</i> Hook. & Arn	A. Slanis 1042 [^]	Mayo 2009	Tafí del Vale, Tucumán	Lic. A. Slanis y Farm. B. Juárez
<i>Bidens subalternans</i> DC.	G. Giberti 704 (BAF) [^]	Abril 2009	CABA, Buenos Aires	Dr. G. Giberti
<i>Eupatorium buniifolium</i> Hook. & Arn.	A. Slanis 1043 [^]	Abril 2005 / Mayo 2009	Tafí del Vale, Tucumán	Lic. A. Slanis y Farm. B. Juárez
<i>Pluchea sagittalis</i> (Lam.) Cabrera	G. Giberti 709 (BAF) [^]	Mayo 2008	Entre Ríos	Dr. G. Giberti
<i>Tagetes minuta</i> L.	G. Gilberti 714 [^]	Mayo 2008	Ibicuy, Entre Ríos	Dr. G. Giberti
<i>Tessaria absinthioides</i> Hook. & Arn. DC.	A. Slanis 1041 [^]	Junio 2009	Depto. de Trancas, Río Vapos, Tucumán	Lic. A. Slanis y Farm. B. Juárez

⁺ Un espécimen está depositado en la Cátedra de Botánica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

[^] Un espécimen está depositado en el Museo de Farmacobotánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA

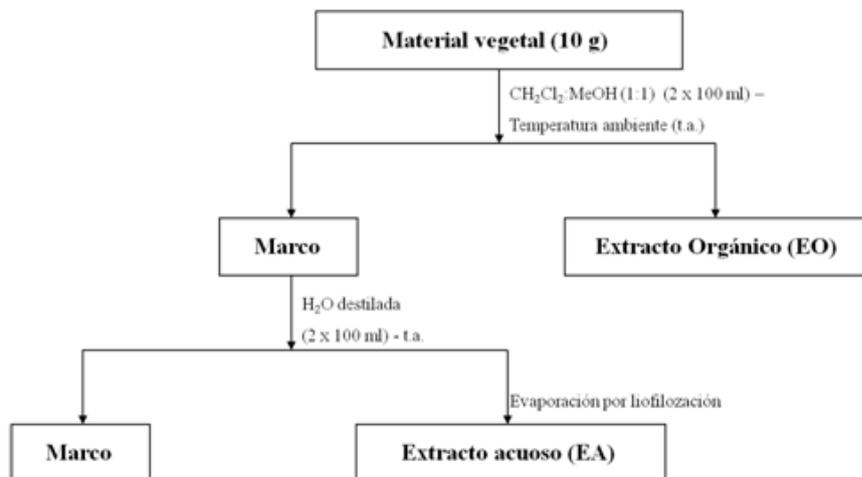
5. Obtención de los extractos orgánicos y acuosos

De cada una de las plantas seleccionadas se obtuvieron dos extractos, un extracto orgánico (EO) y un extracto acuoso (EA).

Las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de cada una de las plantas fueron secadas y molidas. Diez gramos del polvo de cada una de las especies fueron extraídos con 100 ml de una mezcla de CH_2Cl_2 :MeOH (1:1) por 24 h a temperatura ambiente (t.a.) Luego se filtró por vacío y se repitió la extracción por otras 24 h. Se reunieron los filtrados y se evaporaron en un rotavapor a menos de 40 °C. El residuo seco obtenido de cada planta se denominó extracto orgánico (EO).

El marco vegetal residual obtenido luego de la extracción con el solvente orgánico, se extrajo con 100 ml de agua destilada por 24 horas a t.a., se filtró por vacío y se repitió la extracción. Los filtrados se combinaron y liofilizaron. El residuo seco de cada planta se denominó extracto acuoso (EA) (Esquema 1).

Tanto los EO como EA fueron acondicionados en viales de vidrio. Los EO se conservaron a t.a. y los EA a 4 °C, hasta su uso.



Esquema 1: Obtención de los extractos orgánicos y acuosos de las especies vegetales.

6. Análisis por cromatografía en capa delgada de los extractos orgánicos y acuosos

El análisis cromatográfico preliminar de los extractos EO y EA se realizó por cromatografía en capa delgada (TLC) utilizando como FE placas de silicagel 60 F₂₅₄ y/o de celulosa; con diferentes fases móviles según correspondiera. Las placas fueron visualizadas con luz UV (254 y 366 nm) y reveladas con los reactivos AniS o NPR.

7. Obtención de los extractos activos en escala preparativa

La obtención de los extractos EA y EO de *B. gaudichaudiana* y el EO de *E. buniifolium* a escala preparativa se hizo de acuerdo a lo descrito a escala analítica en el punto 5. 500 g de las partes aéreas, secadas y molidas, de cada planta fueron extraídas con 500 ml de la mezcla de CH_2Cl_2 : MeOH (1:1) para la obtención de los EO bajo las mismas condiciones ya descritas en el punto 5. En el caso de *B. gaudichaudiana*, el marco residual fue extraído dos veces con 500 ml agua destilada, para la obtención del EA.

8. Fraccionamiento del EA de *B. gaudichaudiana*: Extracción líquido-líquido

El EA de *B. gaudichaudiana* fue reconstituido en agua destilada y extraído durante 5 días en un extractor líquido-líquido con AcEt (Figura 9). Finalizada la extracción se obtuvieron dos fases, una fase orgánica de AcEt (FO) y una fase acuosa residual (FAR). La FO se llevó a seco en un rotavapor y la FAR fue liofilizada.

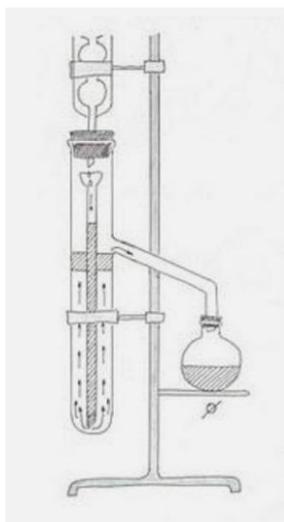


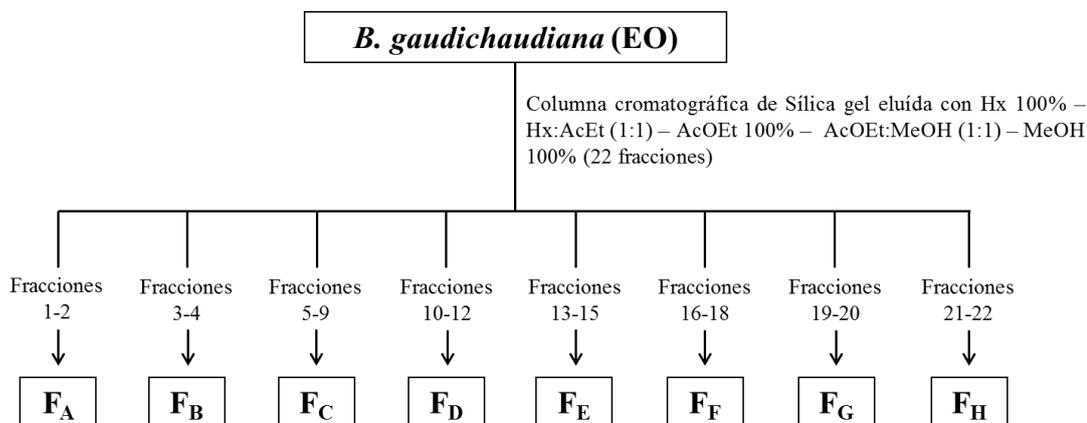
Figura 9: Esquema del extractor líquido-líquido

9. Fraccionamiento bioguiado del EO de *B. gaudichaudiana*

30 g del EO de *B. gaudichaudiana* fueron fraccionados por cromatografía en columna (30 x 7 cm) usando como FE silicagel 60 (500 g). La misma se eluyó con Hx 100 %, Hx:AcEt (1:1); AcEt 100 % y MeOH 100 %, obteniéndose 22 fracciones de 500 ml cada una.

Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por TLC, usando FE de celulosa y como FM AcH 15 % o 40 %, reveladas con NPR o en placas de silicagel 60 con las siguientes FM: CH_2Cl_2 :MeOH (8:2), Hx:AcEt (9:1), Hx:AcEt (7:3) y Hx:AcEt (1:1) y reveladas

con AniS. De acuerdo al perfil cromatográfico que presentaron cada una de las fracciones, fueron combinadas en ocho fracciones finales (F_A - F_H) (Esquema 2).



Esquema 2: Fraccionamiento bioguiado del EO de *B. gaudichaudiana*. Hx: hexano; AcEt: acetato de etilo; MeOH: metanol.

9.1. Análisis de las fracciones F_C , F_D y F_H de *B. gaudichaudiana* por cromatografía líquida de alta presión

Las fracciones F_C , F_D y F_H de *B. gaudichaudiana* se analizaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) usando como FE una columna RP-18 y como FM agua (A) y MeOH (B) en gradiente según, 0-15 min: 2 → 98 % A; 15-20 min: isocrático 98 % de A; 21-25 min: 98 → 2 % de A. El flujo fue de 1 ml/min. El volumen de inyección fue de 10 μ l y se utilizó un detector de fotodiodos.

9.2. Análisis de la fracción F_C por HPLC

La fracción F_C fue posteriormente analizada por HPLC en la misma columna descrita anteriormente (sección 9.1). El volumen de inyección fue de 50 μ l y el flujo de 1 ml/min. La FM fue agua (A) y metanol (B) según: 0-15 min: isocrático 50 % de A; 15-25 min: 50 → 98 % de A; 25-30 min: isocrático 98 % de A; 30-31 min: 98 → 50 % de A.

Los eluatos se recolectaron en cuatro fracciones diferentes: F_{C1} (entre 0-13 min); F_{C2} (entre 13-20 min); F_{C3} (entre 20-25 min) y F_{C4} (entre 25-31 min).

9.3. Análisis de las fracciones F_{C2} y F_{C3} por HPLC

El análisis por HPLC de las fracciones F_{C2} y F_{C3} se llevó a cabo por HPLC bajo en las mismas condiciones que para las fracciones F_C , F_D y F_H , según la metodología previamente descrita, en la sección 9.1.

9.4. Fraccionamiento bioguiado de la fracción F_C por columna cromatográfica

Con el objetivo de poder aislar los compuestos presentes en la fracción F_C , se sometió a un fraccionamiento por cromatografía en columna (40 x 3 cm) empacada con silicagel 60. Se sembraron 2,5 g de la fracción la F_C disuelta en Hx 100 % y posteriormente se eluyó con solventes de polaridad creciente: Hx 100 %, Hx:AcEt (95:5), Hx:AcEt (8:2), Hx:AcEt (6:4), Hx:AcEt (5:5), Hx:AcEt (3:7), AcEt 100 %, AcEt:MeOH (1:1) y MeOH 100 %. En total se recolectaron 170 fracciones de 20 ml cada una, que luego fueron agrupadas en 28 fracciones finales (F_{C1} - $F_{CXXVIII}$) de acuerdo al perfil cromatográfico luego del análisis por TLC en los diferentes sistemas cromatográficos. En la fracción F_{CXI} se obtuvo un precipitado blanco-amarillento (P_{XI}).

9.5. Purificación del precipitado P_{XI}

El precipitado obtenido (P_{XI}) en la fracción F_{CXI} se separó de las aguas madres y se recristalizó de AcEt.

La purificación del precipitado P_{XI} (3 mg) se llevó a cabo por cromatografía en columna (12 x 2 cm) empacada con silicagel 60 y se eluyó con una mezcla isocrática de CH_2Cl_2 :MeOH:AcH (95:5:1). Se obtuvieron 24 fracciones de 5 ml cada que fueron reunidas en tres fracciones finales (P_{XI-A} – P_{XI-C}) de acuerdo al perfil cromatográfico que presentaron luego del análisis por TLC (FE: silicagel 60; FM: CH_2Cl_2 :MeOH:AcH (95:5:1); reactivo revelador: NPR). De la fracción P_{XI-C} se obtuvo un compuesto A cuya pureza se determinó por TLC en tres sistemas cromatográficos diferentes: Sistema I: FE: silicagel 60, FM: CH_2Cl_2 :MeOH (8:2), reactivo revelador: AniS; Sistema II: FE: celulosa, FM: AcH 40 %, reactivo revelador: NPR; y Sistema III: FE: silicagel 60; FM: CH_2Cl_2 :MeOH:AcH (95:5:1); reactivo revelador: NPR y por HPLC.

10. Identificación del compuesto A

El compuesto A se identificó en base al análisis de los espectros infrarrojo y ultravioleta, y por comparación con patrones de referencia.

11. Fraccionamiento del extracto orgánico de *E. buniifolium*

30 g del EO de *E. buniifolium* obtenido según la metodología descrita en el punto 5 fueron fraccionados mediante cromatografía en columna empacada con sílicagel 60. La misma se eluyó con Hx 100 %, Hx:AcEt (1:1); AcEt 100 %, AcEt:MeOH (1:1) y MeOH 100 % obteniéndose 10 fracciones de 250 ml cada una.

Los eluatos se analizaron por TLC en placas de celulosa corridas con AcH 15 % o 40 % como FE y reveladas con NPR; o en placas de sílicagel 60 y usando como FE los sistemas de Tol:AcEt (3:7), CH₂Cl₂:MeOH (8:2), Hx:AcEt (9:1), Hx:AcEt (7:3) o Hx:AcEt (1:1) y reveladas con AniS. De acuerdo al perfil cromatográfico de cada fracción, fueron reunidas en cinco fracciones finales (F₁-F₅).

11.1. Fraccionamiento bioguiado de la fracción F₂

La fracción F₂ obtenida del fraccionamiento del EO de *E. buniifolium* fue fraccionada por cromatografía en columna (40 x 3 cm) empacada con sílicagel 60. Se sembraron 2,1g de la fracción F₂ disuelta en 1 ml de Hx 100 % y se eluyó con solventes de polaridad creciente: Hx 100 %, Hx:AcEt (95:5), Hx:AcEt (9:1), Hx:AcEt (7:3), Hx:AcEt (5:5), AcEt 100 % y MeOH 100 %.

Se recolectaron 42 fracciones de 15-20 ml cada una, que luego fueron agrupadas en 17 fracciones finales (F_{2.I}-F_{2.XVII}) de acuerdo al perfil cromatográfico por TLC. En la fracción F_{2.VI} se obtuvo un precipitado cristalino de color amarillo en formas de agujas, denominado compuesto B.

11.2. Purificación del compuesto B de las fracciones F_{2.V} y F_{2.VII}

El compuesto B obtenido a partir de la purificación de la fracción F_{2.VI} se aisló también de las fracciones F_{2.V} y F_{2.VII} por TLC preparativa. Para ello, las fracciones F_{2.V} y F_{2.VII} (20 mg) y se sembraron en placas preparativas de sílicagel 60 (20 x 20 cm) utilizando como FM Hx:AcEt (9:1). El revelado se realizó con luz UV 254 nm. El compuesto B se recrystalizó de AcEt.

11.3. Identificación del compuesto B

El compuesto B se identificó en base al análisis de los espectros de IR, UV, EI-MS y ¹H-RMN y ¹³C-RMN.

12. *Screening* de la actividad antiviral de los extractos acuosos y orgánicos de las especies seleccionadas

Los EO y EA de *B. gaudichaudiana*, *B. spicata*, *Bidens subalternans*, *Eupatorium buniifolium*, *Pluchea sagittalis*, *Tagetes minuta* y *Tessaria absinthioides* fueron evaluados en un *screening* de actividad antiviral por reducción del efecto citopático viral (ECP): monocapas de células Vero confluentes con 24 h de subcultivo cultivadas en placas de 96 pocillos fueron infectadas con una multiplicidad de infección (moi) 0,01 con DENV, HSV-1, PV-2 o VSV; y monocapas subconfluentes de células MDBK fueron infectadas con igual moi de BVDV en presencia de dos concentraciones de cada extracto, 100 y 25 µg/ml, por cuadruplicado. Se incluyeron controles de células sin infectar y sin tratar (CC) y células infectadas pero no tratadas (CV). Las placas se incubaron a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % CO₂ hasta observar un 90 % ECP en los CV. Para determinar si en presencia del extracto se tiene un menor ECP, se midió la viabilidad celular por el método de MTS/PMS (CellTiter 96™ *Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*, n° catálogo G5421-Promega), según las instrucciones del fabricante.

Se midió la absorbancia (Abs) a 490 nm de cada unidad prueba y luego se calculó el porcentaje de reducción de ECP, según la fórmula:

$$\% \text{ Reducción ECP} = (\text{Abs}_m - \text{Abs}_{CV}) / (\text{Abs}_{CC} - \text{Abs}_{CV}) \times 100$$

Donde, Abs_m es la absorbancia promedio de los replicados a una concentración determinada para un extracto dado, Abs_{CV} es la absorbancia promedio de los pocillos correspondientes a los controles infectados pero no tratados y Abs_{CC}, a la absorbancia promedio de los controles sin tratar y sin infectar.

Se consideró un extracto activo (+) cuando la reducción del ECP a la menor concentración (25 µg/ml) fue mayor al 50 % respecto al control; un extracto inactivo (-), cuando el extracto no inhibió la replicación viral en ambas concentraciones evaluadas; y un extracto mostró inhibición parcial (+/-) cuando la reducción del ECP fue mayor al 50 % a 100 µg/ml.

El *screening* de actividad antiviral de las fracciones F_A-F_H del EO de *B. gaudichaudiana* se realizó a las concentraciones de 8 y 2 µg/ml; de las fracciones F_{CI}-F_{CXXVIII} de la fracción F_C de EO de *B. gaudichaudiana* a 10 y 2,5 µg/ml; y de las fracciones F_{2.I}-F_{2.XVII} de la fracción F₂ de EO de *E. buniifolium* a 15 y 5 µg/ml.

13. Ensayos de citotoxicidad. Determinación de la CC_{50}

La citotoxicidad de cada extracto, fracción o compuesto fue evaluada mediante el método de MTS/PMS en placas de 96 pocillos. Células Vero (8×10^4 células/pocillo) fueron cultivadas en placas de 96 pocillos durante 24 h. Las monocapas subconfluentes fueron tratadas por cuadruplicado con diluciones crecientes de cada una de las muestras. Se incluyeron controles de células sin tratar como control (CC). Se continuó la incubación a 37 °C durante 72 h. Finalizado el tiempo de incubación se observó la morfología celular en los CC y los pocillos tratados al microscopio invertido y luego se midió la viabilidad celular por el método de MTS/PMS. La Abs a 490 nm fue medida luego de 2 h de incubación. Se calculó el porcentaje de viabilidad celular para cada concentración de extracto respecto CC, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \text{Abs}_m \times 100 / \text{Abs}_{CC}$$

Donde, Abs_m es la absorbancia promedio de los replicados a una concentración determinada para un extracto dado y Abs_{CC} , a la absorbancia promedio de los CC.

Se graficó la curva dosis-respuesta de % de viabilidad del cultivo vs la concentración del compuesto y se ajustó por regresión lineal. A partir de la fórmula correspondiente a cada curva se calculó la **concentración citotóxica 50 (CC_{50})** de cada compuesto, definida como la concentración que reduce en un 50 % el número de células viables, respecto al control células sin tratar. Además, se determinó para cada extracto la **máxima concentración no citotóxica (MCNC)**, que se define como la mayor concentración de extracto que no afecta la viabilidad celular (100 % de células viables, igual que el control células sin tratar).

14. Ensayos de actividad antiviral por el método de reducción de placas virales.

Determinación de la CE_{50}

A los EO de *B. gaudichaudiana*, *B. spicata*, *E. buniifolium* y *T. absinthioides* se cuantificó la actividad antiviral mediante el método de reducción del número de placas virales frente PV-2. A los EA de las mismas especies con excepción del EA de *E. buniifolium*, se les determinó la actividad antiviral por el mismo método frente a HSV-1 y HSV-2.

Células Vero se sembraron a una densidad de $2,0 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron 24 h a 37 °C. Para el ensayo de actividad antiviral, se

infectaron las células de cada pocillo con aproximadamente 100 unidades formadoras de placas (UFP) del virus en estudio, en 100 µl de MI en presencia de concentraciones del extracto activo en diluciones seriadas en MI a partir de MCNC. Luego de 45 min de incubación a 37 °C, para permitir la adsorción y penetración del virus a las células, para remover el inóculo no adsorbido, se realizaron dos lavados con buffer fosfato salino (PBS, del inglés: *phosphate-buffered saline*) pH = 7,4 y se agregó 1 ml de MP en los controles, y MP conteniendo las mismas concentraciones presentes en la adsorción del extracto en MP. Se incluyó en cada ensayo los siguientes controles: células sin infectar y sin tratar con el compuesto (CC) y células infectadas y no tratadas (CV).

Luego de 24 - 72 h de incubación, se fijaron las células con formol 10 % y se tiñeron con cristal violeta 0,75 % en MeOH:agua (40:60). Se contaron las placas virales, se graficó la curva de número de UFP en función de la concentración de compuesto y se calculó, a partir de la curva ajustada por regresión lineal, la **Concentración Efectiva 50 (CE₅₀)**, definida como la concentración del compuesto que reduce en un 50 % el número de placas formadas respecto del CV.

El **índice de selectividad (IS)** fue calculado como la relación CC_{50}/CE_{50} .

La actividad antiviral de las fracciones F_C, F_D y F_H; F_{C1}-F_{C4}; F_{CX1} y P_{X1}; y el compuesto A (apigenina) del EO de *B. gaudichaudiana* y las fracciones F₁-F₅ y el compuesto B (euparina) del EO de *E. buniifolium* también se determinaron por el método de reducción de placas virales frente a PV-2.

Los EO de las especies de *Baccharis*, *B. articulata*, *B. crispa*, *B. gaudichaudiana*, *B. penningtonii*, *B. phyteumoides*, *B. spicata*, *B. trímera*, *B. tucumanensis* se evaluaron por este método frente a PV-1, PV-2 y PV-3. Los EA de las mismas especies se evaluaron frente a HSV-1 y HSV-2.

15. Determinación de la actividad antiviral y citotoxicidad de los patrones de referencia de apigenina y euparina

Tanto para la apigenina, aislada a partir del EO de *B. gaudichaudiana*; como para la euparina aislada del EO de *E. buniifolium*, se dispuso de patrones que permitieron el análisis comparativo: apigenina (Sigma - n° de catálogo 10798-25MG) y euparina (Chromadex Inc - Irvine, California, EEUU - n° catálogo ASB-00005387-010).

Tanto para los compuestos purificados como para los comerciales se determinó simultáneamente la citotoxicidad y la actividad antiviral por el método de reducción de placas obteniéndose los valores de CE_{50} , CC_{50} e IS de cada uno de ellos.

16. Evaluación de la actividad antiviral mediante reducción del efecto citopático

La evaluación de la actividad antiviral del EA de *B. gaudichaudiana* frente a HSV-1 cepa sensible y cepa resistente al aciclovir y de las fracciones FO y FAr obtenidas de ese mismo extracto se determinó por reducción del ECP en células Vero.

El ensayo se realizó de la misma forma que el *screening* de actividad antiviral descrito en el punto 11 pero en vez de analizar dos concentraciones arbitrarias, se realizaron diluciones seriadas a partir de la MCNC.

17. Estudio del mecanismo de acción

17.1. Efecto del pretratamiento de las células

El efecto del pretratamiento de las células Vero se determinó para los EO de *B. gaudichaudiana*, *B. trimera* y *E. buniifolium* y la euparina frente a PV mientras que el EA de *B. gaudichaudiana* se evaluó frente a HSV.

Para ellos, se utilizaron monocapas de células Vero con 24 h de subcultivo en placa de 24 pocillos (obtenidas como se describe en la sección 12). Para determinar el efecto del pretratamiento de las células, en primer lugar, se lavaron las monocapas tres veces con PBS. Luego, se agregó por cuadruplicado 1 ml de extracto en MI (10x, 5x y 1x CE_{90} – **CE_{90} : concentración efectiva 90**, concentración que reduce en un 90 % el número de placas formadas respecto del CV) por pocillo. La placa se incubó 7 h a 37 °C. Posteriormente se retiró el MI y se realizaron tres lavados con PBS y las monocapas celulares se infectaron con 0,2 ml de una dilución del stock de HSV-1 o PV-2 que contenía 100 UFP. Se incubó la placa por 45 min a 37 °C para permitir la adsorción del virus a las células. Se removió el inóculo no adsorbido, se realizaron dos lavados con PBS, y finalmente se agregó 1 ml de MP. Se incluyeron controles de células sin pretratamiento y sin infectar (CC) y células sin pretratamiento e infectadas con igual número de UFP (CV). Luego de 24 - 48 h de incubación, se fijaron las células con formaldehído 10 % y se tiñeron con violeta de genciana 0,75 %. Finalmente, se contaron las placas de lisis virales formadas. El valor de placas obtenidas en el CV se consideró como 100 %.

17.2. Ensayo de actividad virucida

Con el objetivo de determinar si los EO de *B. gaudichaudiana*, *B. trimera* y *E. buniifolium* y la euparina ejercían un efecto virucida sobre PV o el EA de *B. gaudichaudiana* frente a HSV, se incubaron $1,0 \times 10^6$ UFP de virus en presencia de $10 \times CE_{90}$ del extracto correspondiente, a 4 °C, t.a ó 37 °C, por 30 min. Paralelamente, se incluyó un control conteniendo la misma cantidad de UFP virales pero incubadas en presencia de MI sin extracto. Luego del tiempo de contacto a cada temperatura, se cuantificó el virus infeccioso residual por el método de placas virales (UFP/ml) en células Vero.

17.3. Efecto en la adsorción y post-adsorción

Para determinar en qué etapa del ciclo viral los EO de *B. gaudichaudiana*, *B. trimera* y *E. buniifolium* y la fracción F_C de *B. gaudichaudiana* eran capaces de inhibir PV y el EA de *B. gaudichaudiana* a HSV, se agregó el extracto o fracción durante la adsorción o la post adsorción del ciclo viral.

Se obtuvieron monocapas de células Vero como lo descrito en la sección 12. Las placas se incubaron en baño de hielo por 1 h. Luego se infectaron con 100 UFP/pocillo en presencia o ausencia de extracto por 1 h en baño de hielo, para permitir la adsorción de las partículas virales pero no la penetración de las mismas a las células. Las concentraciones de extracto utilizadas en este ensayo correspondieron a $1 \times CE_{90}$. Luego de la adsorción, las monocapas se lavaron tres veces con PBS frío para remover el inóculo no adsorbido y se agregó MP en presencia o ausencia de extracto a la misma concentración. Luego, las placas se incubaron por 24 o 48 h a 37 °C con 5 % CO_2 , se fijaron las células con formaldehído 10 %, se tiñeron con violeta de genciana al 0,75 % y se contaron las placas virales formadas.

Se evaluaron **tres condiciones** para este ensayo: **control virus (CV)**: monocapas infectadas en medio de infección sin extracto; **Adsorción (Ads)**: monocapas infectadas y tratadas con el extracto solamente durante la adsorción en baño de hielo; **Post-Adsorción (Post-Ads)**: monocapas infectadas y tratadas con extracto sólo después de la adsorción. Se incluyeron CC: monocapas sin infectar y sin tratar, y controles de actividad antiviral: monocapas infectadas en presencia del extracto durante todo de infección (TT).

17.4. Curva de crecimiento en un paso de PV-2

17.4.1. Cinética de producción de PV-2

Para determinar la cinética de replicación de PV-2 en nuestras condiciones, se realizó una curva de crecimiento en un paso en células Vero infectando monocapas celulares en condiciones de un paso y cosechando el sobrenadante de cultivo a diferentes tiempos del ciclo viral. Monocapas confluentes de células Vero con 24 h de subcultivo, en placa de 96 pocillos y enfriadas 30 min en baño de hielo, se infectaron con una moi de 10 UFP/célula. Para permitir la adsorción y evitar la penetración del virus a las células, los cultivos infectados se incubaron 60 min en hielo. Luego, se removió el inóculo no adsorbido, se realizaron dos lavados con PBS en frío, y se adicionó 1 ml de MI a cada pocillo. La placa se incubó a 37 °C y a distintos tiempos (0, 2, 4, 6, 8 y 10 h) post-adsorción (p.a.), se cosecharon los sobrenadantes de cultivo, se clarificaron y a cada uno de ellos se determinó el título viral por el método de reducción de placas virales (UFP/ml).

17.4.2. Efecto del agregado de la fracción F_C de *B. gaudichaudiana* a diferentes tiempos de un ciclo viral sobre la producción viral

En una placa de 96 pocillos, se sembraron células Vero a una densidad de $1,0 \times 10^5$ células/pocillo y se incubaron 24 h. Las monocapas confluentes se colocaron en hielo durante 30 min y posteriormente se infectaron con PV-2 a una moi de 10 UFP/célula. Para permitir la adsorción y evitar la penetración del virus a las células, los cultivos infectados se incubaron 60 min en hielo. Luego, se removió el inóculo no adsorbido, se realizaron dos lavados con PBS frío, y se adicionó 100 µl de MI a cada pocillo. A las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h p.a., se agregó 100 µl de la fracción F_C en MI ($10 \times CE_{50} = 22 \mu\text{g/ml}$). La incubación a 37 °C se continuó hasta alcanzar las 10 h p.i., tiempo en el que se cosecharon todos los sobrenadantes de infección. Para cuantificar el virus infectivo producido en cada caso, se clarificaron los sobrenadantes y se realizaron diluciones seriadas de los mismos y se determinó el título por el método de placas virales (UFP/ml).

17.4.3. Efecto del agregado de euparina a diferentes tiempos de un ciclo viral sobre la producción viral

Para analizar el efecto del agregado de euparina, monocapas de células Vero en placa de 24 pocillos con 24 h de subcultivo, se colocaron en hielo durante 30 min y

posteriormente se infectaron con 200 µl de una dilución del stock viral a una moi de 5 UFP/célula. Se incubó la placa en hielo durante 60 min para permitir la adsorción viral. Luego, se removió el inóculo no adsorbido, se realizaron dos lavados con PBS frío, y se adicionó 200 µl de MI a cada pocillo. A las 0, 2, 4, 6, 7 y 8 h p.a., se agregó 200 µl de euparina en MI ($10 \times CE_{90} = 46 \mu M$). Se incubó a 37 °C hasta alcanzar las 8 h p.a., tiempo en el que se cosecharon todos los sobrenadantes de cultivo. Se cuantificó el virus infectivo producido en cada caso, por el método de placas, luego de clarificar los sobrenadantes. En la placa se incluyeron controles de células no infectadas; controles virus sin tratar; células infectadas y tratadas con euparina durante todo el período experimental y pocillos donde el compuesto estuvo presente solamente en la etapa de adsorción.

Luego de analizar los resultados obtenidos, se repitió el ensayo pero agregando el compuesto a los 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos (min) p.a. bajo las mismas condiciones experimentales; e incluyendo los mismos controles que los descriptos previamente.

17.5. Ensayos de centros infecciosos de PV-2

Para determinar el efecto de la euparina en la adsorción viral, monocapas de células Vero cultivadas en placas de 6 pocillos se incubaron en baño de hielo por 30 min y posteriormente se infectaron con 200 µl de una dilución del stock viral PV-2 moi = 1. Para permitir la adsorción y evitar la penetración del virus a las células, los cultivos infectados se incubaron 60 min en hielo en ausencia o en presencia de euparina (10 y 20 µM). Luego, se removió el inóculo no adsorbido mediante dos lavados con PBS frío. Con el objetivo de determinar el número de células que tenían virus adsorbido, se procedió al recuento de células infectadas por el método de determinación de los centros infecciosos.

Se tripzinizaron las monocapas celulares de cada pocillo y se resuspendieron en 1 ml de MI. Las células en suspensión se colocaron en un tubo estéril, en el que se realizaron dos lavados con PBS, por centrifugación a 500 x g y 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de MI. A partir de esta suspensión, se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se inocularon por triplicado 200 µl de cada dilución sobre monocapas confluentes de células Vero en placa de 24 pocillos. Se dejaron reposar 1 h a 37 °C y luego las monocapas se cubrieron con 1 ml de MP. Se continuó la incubación a 37 °C

por 48 h, cuando las monocapas celulares se fijaron con formol, se tiñeron con cristal violeta y posteriormente se contaron los centros infecciosos obtenidos, donde se consideró que cada placa observada correspondía a una célula con al menos una partícula de PV-2 adsorbida.

17.6. Evaluación del efecto antiviral sobre la etapa de penetración de PV-2

17.6.1. Producción de un stock de PV-2 fotosensible

Para la evaluación del efecto de la euparina en la penetración, se decidió obtener un stock de PV-2 sensible a la luz blanca. Para ello, y siempre en oscuridad, se infectó una monocapa de células Vero en botellas de cultivo de 25 cm² de área (T25) con PV-2 (moi = 0,1) en presencia de 4 µg/ml de rojo neutro. A las 24 h, se cosechó el stock producido en oscuridad. Se realizaron tres ciclos de congelado-descongelado y se clarificó el sobrenadante, se realizó una dilución 1:10 y se infectó una nueva monocapa celular. El procedimiento se repitió dos veces más. Finalmente, se confirmó la fotosensibilidad del stock de PV-2 producido en presencia de rojo (PV-2 fs), mediante la infección de tres monocapas de células Vero, una mantenida en la oscuridad, y las otras expuestas a la luz blanca luego de la adsorción en baño de hielo y la tercera expuesta luego de 4 h post infección y determinando el ECP resultante luego de 24 h, en todos los casos. Al stock de PV-2 fs resultante, se le cuantificó el título viral por el método de placas virales manteniendo las monocapas celulares en la oscuridad durante todo el ensayo.

17.6.2. Evaluación del efecto de euparina en una infección de PV-2 en múltiples ciclos

Para evaluar el efecto de la euparina en la penetración de PV-2 a las células, se determinó el efecto del agregado de dicho compuesto a diferentes tiempos de la infección con el stock PV-2 fs. Para ello, monocapas de células Vero en placas de 24 pocillos se colocaron en hielo por 30 min y posteriormente se infectaron en la oscuridad con 200 µl de una dilución del stock viral PV-2 fs correspondiente a 100 UFP/pocillo. La incubación en baño de hielo continuó por 60 min, luego se removió el inóculo no adsorbido, se realizaron dos lavados con PBS frío, se adicionó 200 µl de MI a cada pocillo y se incubó la placa a 37 °C. A los 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min p.a., se agregó 200 µl de euparina en MI (1xCE₉₀ = 4,6 µM).

Luego, se incubaron 2 h adicionales a 37 °C en la oscuridad y luego se expusieron las placas a luz blanca por 15 min, se lavaron 2 x 1 ml PBS y se agregó 1 ml de MP a cada pocillo. Las placas fueron incubadas durante 48 h a 37 °C en atmósfera húmeda y con 5 % de CO₂ cuando las monocapas celulares se fijaron y tiñeron, y se hizo el recuento de placas virales obtenidas.

17.7. Determinación de la frecuencia natural de mutantes resistentes

Con el objetivo de estimar la presencia de variantes de PV-2 resistentes a la euparina en la población original de PV-2 (PV-2 wt, del inglés: *wild type*) previo a la exposición a la droga, se determinó la frecuencia natural de mutantes resistentes (FNR).

Para ello, diluciones seriadas de un stock de PV-2 wt ($2,0 \times 10^7$ UFP/ml) se sembraron en monocapas confluentes de células Vero en placa de 24 pocillos con 24 h de subcultivo, en MP en ausencia (CV) o presencia de cuatro concentraciones de euparina, 10, 20, 30 y 40 μ M; cada condición por cuadruplicada. Además se incluyeron controles CC, correspondientes a monocapas no infectadas e incubadas en presencia de MP. Las monocapas se incubaron por 24 h a 37 °C para permitir la formación de placas virales. Luego, las monocapas se fijaron y tiñeron con violeta de genciana y se contaron las placas virales. Con esos datos, se determinó el título viral en cada una de las concentraciones evaluadas y se determinó la FNR en cada condición.

17.8. Selección y purificación de mutantes resistentes a euparina

Monocapas de células Vero se infectaron con diluciones seriadas de PV-2 en ausencia (control) y presencia de cuatro concentraciones diferentes de euparina (10, 20, 30 y 40 μ M). Luego de incubar las monocapas por 24 h a 37° C, se seleccionaron 25 placas virales aisladas (C1-C25). A cada placa viral obtenida se le determinó el título viral en ausencia y presencia de la misma concentración de euparina a la cual la placa fue seleccionada.

De las 25 variantes obtenidas, se seleccionaron cuatro (C13, C17, C19 y C21) para su posterior purificación mediante la técnica de clonado biológico. Brevemente, diluciones seriadas de cada clon se agregaron sobre monocapas confluentes de células Vero en presencia de la misma concentración de euparina bajo la cual dicho clon fue seleccionado. Monocapas infectadas con las diluciones de cada clon pero en ausencia de compuesto fueron incluidas como control virus. Luego, las placas fueron incubadas por

24 h a 37 °C hasta la formación de placas virales. De las monocapas infectadas en presencia de euparina, se seleccionaron de 2 a 5 placas virales aisladas y bien definidas (Cn.1).

A partir de este nuevo aislamiento (Cn.1) se repitió el proceso de clonado biológico dos veces más obteniéndose los clones Cn.1.1 y Cn.1.1.1. De éste último, monocapas confluentes de células Vero en botellas T25 se infectaron con $moi = 0,01$ en presencia de euparina. Una vez alcanzado un 80 – 90% de ECP se cosecharon y acondicionaron las infecciones. El stock viral (PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 y PV-2-R21) obtenido fue extraído con cloroformo en proporción 9:1 (virus:solvente) con el fin de eliminar la euparina presente en el medio.

17.9. Caracterización biológica de los clones obtenidos

17.9.1. Titulación de los clones en presencia y ausencia de euparina

Cada uno de los clones obtenidos a lo largo del proceso de clonado biológico para los clones provenientes de C13, C17, C19 y C21 (Cn.1-Cn.1.1.1); y los stocks virales obtenidos luego de la amplificación (PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 y PV-2-R21) se titularon por el método de placas virales (UFP/ml) en ausencia y en presencia de euparina.

La concentración de compuesto utilizada para la titulación fue la misma que la concentración de euparina a la cual se seleccionó el clon original (punto 14.8).

17.9.2. Efecto de las diferentes concentraciones de euparina en la replicación de un clon dependiente

Para determinar el efecto de la concentración de euparina presente en la replicación del clon dependiente (PV-2-D19), se evaluó la replicación viral en presencia de concentraciones crecientes del compuesto.

Para ello, monocapas de células Vero en placas de 24 pocillos se crecieron en atmósfera húmeda y con 5 % CO_2 a 37 °C con 24 h de subcultivo. Luego, las monocapas celulares se infectaron con 100 UFP del stock dependiente. Para permitir solamente la adsorción del virus a las células, se realizó la infección a 4 °C por 1 h en presencia de diluciones al medio de euparina comenzando desde 50 μM . Luego de la adsorción se realizaron dos lavados con PBS frío y se agregó MP conteniendo la misma concentración de euparina. Se incluyeron monocapas no infectadas ni tratadas (CC) y monocapas infectadas pero

incubadas en MI sin euparina (CV) como controles. Se incubaron las placas por 48 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ cuando se fijaron y tiñeron las placas de cultivo y se cuantificaron las placas virales obtenidas.

17.9.3. Evaluación de la termoestabilidad del clon dependiente a la euparina

Con el objetivo de determinar si la estabilidad térmica de las partículas virales dependientes PV-2-D19, se incubaron $1,0 \times 10^7$ UFP de virus en presencia de 10 µM de euparina, a 37 °C o 48 °C, por 30 min. Se incluyeron como control la misma cantidad de UFP virales del stock dependiente pero incubadas con MI sin euparina; y la misma cantidad de PV-2 wt incubada en presencia de 10 µM de compuesto o con MI. Luego, el virus infectivo residual se tituló en células Vero por el método de placas virales (UFP/ml) en ausencia y en presencia de euparina.

18. Caracterización molecular de los clones obtenidos

18.1. Secuenciación de las proteínas de la cápside

18.1.1. Extracción de ARN y retrotranscripción

A partir de los stocks acondicionados de PV-2 wt y los stocks amplificados de las mutantes dependientes y resistentes (PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 o PV-2-R21), se extrajo el ARN con TRIzol (GIBCO-BRL, CA) según las instrucciones del fabricante y se utilizó como molde en una reacción de retrotranscripción (RT) para obtener el ADN complementario (ADNc). La reacción de RT se realizó en un volumen final de 25 µl, utilizando 10 µl del ARN extraído, 200 U de transcriptasa reversa MMLV (n° catálogo 28025, Invitrogen), 40 U de inhibidor de RNAsas RNAsin (n° catálogo N2615, Promega), dNTPs 0,5 mM y 10 pmoles del oligonucleótido específico Q8 (véase apéndice 6), siguiendo las indicaciones del proveedor. Se desnaturalizó el ARN a 70 °C por 5 min y se llevó a cabo la reacción durante 90 min a 42 °C, seguida de una inactivación enzimática de 10 min a 72 °C. El ADNc obtenido se utilizó como molde para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: *polymerase chain reaction*).

18.1.2. Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa

Para amplificar las regiones codificantes de todas las proteínas de la cápside de PV-2 (3384 nucleótidos), se sintetizaron 6 cebadores específicos previamente descritos en la

literatura, cuyas secuencias se encuentran detalladas en el apéndice 6. Para la secuenciación de la proteína VP1 se siguió el protocolo descrito y aceptado por el CDC (Kilpatrick et al. 2011); mientras que la secuenciación de las demás proteínas estructurales se realizó con modificaciones de los protocolos previamente descritos en la literatura (Zhang et al. 2010). De esta forma, se obtuvieron tres fragmentos solapados correspondientes a las VP4/VP2, VP3 y VP1. Los ADNc obtenidos se amplificaron por PCR.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l, utilizando 5 μ l del ADNc, 12,5 pmoles de cebador sentido y de antisentido, MgSO₄ 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM y 1,25 U de ADN polimerasa (Platinum DNA polymerase High Fidelity, n° catálogo 11304-011, Invitrogen).

Para la amplificación de la VP1 se siguió el siguiente protocolo: 5 min de activación a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificación (30 seg a 94 °C, 45 seg a 42 °C y 2 min a 72 °C) y un paso final de amplificación de 5 min a 72 °C.

Para la amplificación de la VP4/2 y VP3 se siguió el siguiente protocolo: 5 min de activación a 94 °C, seguido de 35 ciclos de amplificación (30 seg a 94 °C, 45 seg a 62 °C y 2 min a 72 °C) y un paso final de amplificación de 5 min a 72 °C.

18.1.3. Purificación de los productos de PCR

Los amplicones obtenidos de la PCR se purificaron mediante electroforesis en geles de agarosa, utilizando el kit para extracción de nucleótidos QIAquick Gel Extraction (n° catálogo 28706, QiaGen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

18.1.4. Secuenciación de las proteínas de la cápside

Para secuenciar la región correspondiente a las proteínas de la cápside, se sintetizaron nueve cebadores, cuyas secuencias se detallan en el apéndice 7. Se realizó la secuenciación con el secuenciador ABI ABI3130XL 131 (Applied Biosystems; Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología, INTA, Castelar, Argentina). Las secuencias obtenidas se alinearon con el ClustalX 1.83 (Thompson et al. 1997), se editaron con el software BioEdit v 7.0.9.0 (Hall 1999) y se compararon con la secuencia de PV-2 Sabin de referencia (Toyoda - n° acceso X00595.1) y PV-2 Sabin incluida en el estudio (PV-2 wt).

La numeración de las mutaciones encontradas en las secuencias nucleotídicas se realizó directamente de acuerdo a las secuencias disponibles en el GenBank detalladas

anteriormente y el punto de comienzo y fin de la región codificante de cada proteína se determinó según lo especificado en la secuencia de referencia (n° acceso X00595.1).

La amplificación, purificación y secuenciación de los fragmentos correspondientes a la VP1 se realizó en el servicio de Neurovirosis del Instituto Malbrán, Buenos Aires, Argentina, en colaboración con la Dra. Cecilia Freire y la Dra. Cristina Lema.

19. Estudios de la reversión de la dependencia y la resistencia a euparina

Con el objetivo de evaluar la estabilidad del fenotipo resistente y dependiente a la euparina en PV-2, se evaluó la susceptibilidad a la euparina en dichos clones luego de un bajo número de pasajes en ausencia de droga. Para ello, se realizaron tres pasajes sucesivos de las cuatro poblaciones de PV-2 seleccionadas (PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 y PV-2-R21) en ausencia del antiviral. Brevemente, se infectaron cuatro monocapas confluentes de células Vero en botellas de cultivo T25 con cada una de las líneas de PV-2 seleccionadas (moi de 0,01 UFP/célula) y se incubaron a 37 °C por 24 - 48 h. Se incluyó en cada pasaje un control de células sin infectar.

Una vez alcanzado el 90 % de ECP, se cosechó el sobrenadante de cultivo, se clarificó por centrifugación a 3500 x g a 4 °C, se alicuotó y conservó a -80 °C. Se determinó el título viral infectivo de cada stock por el método de placas virales (UFP/ml) en células Vero; en ausencia y en presencia de 10 µM de euparina, para evidenciar si hubo un cambio en la susceptibilidad al antiviral. Luego, cada uno de los stocks virales, con título conocido, fueron utilizados para realizar el siguiente pasaje mediante la infección de nuevas monocapas celulares, en las condiciones descriptas anteriormente. Se repitió este procedimiento dos veces más en las cuatro líneas de PV-2 (D13, R17, D19 y R21) y se denominó al stock viral obtenido de cada una de las líneas, propagadas en ausencia de euparina, PV-2-13-Rev1-3, PV-2-R17-Rev1-3, PV-2-D19-Rev1-3 y PV-2-R21-Rev1-3.

20. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos en cada experimento mediante la prueba de ANOVA con el posterior test de Tukey's, utilizando el programa GraphPad Prism v. 5.01.

Las curvas dosis-respuesta se ajustaron por regresión lineal o logarítmica usando el programa Microsoft Excel.

IV – RESULTADOS

Capítulo 1

Estudio de la actividad antiviral de plantas medicinales argentinas

IV - RESULTADOS

Capítulo 1: Estudio de la actividad antiviral de plantas medicinales argentinas

1. *Screening* de actividad antiviral frente a PV-2, HSV-1, BVDV, DENV y VSV

El *screening* inicial de actividad antiviral de las especies *Baccharis gaudichaudiana*, *B. spicata*, *Bidens subalternans*, *Eupatorium buniifolium*, *Pluchea saggitalis*, *Tagetes minuta* y *Tessaria absinthioides* se realizó evaluando el extracto orgánico (EO) y el extracto acuoso (EA) de cada una de estas plantas frente a un panel de virus: poliovirus tipo 2 (PV-2), herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), Dengue virus (DENV) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV).

La actividad antiviral, se determinó midiendo la reducción del efecto citopático (ECP) viral a dos concentraciones fijas de extracto (100 y 25 µg/ml). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3. Como criterio de evaluación se consideró que los extractos positivos (+) serían aquellos que produjeran valores de reducción del ECP viral mayor o igual al 50 % para las dos concentraciones evaluadas; negativos (-), los que dieran valores menores al 50 % para la mayor concentración; e inhibición parcial (+/-) aquellos que dieran inhibición solo para la mayor concentración.

A partir de los resultados obtenidos se demostró que los extractos EO y EA de *Bidens subalternans* y *Tagetes minuta* fueron negativos frente a todos los virus evaluados.

En cambio, para *Tessaria absinthioides*, el EA fue positivo para HSV-1 mientras que el EO fue activo frente a PV-2. En el caso de *Eupatorium buniifolium*, solamente el EO resultó positivo frente a PV-2. En el caso de *B. gaudichaudiana* y *B. spicata*, los EA resultaron activos contra HSV-1 y los EO frente a PV-2 y VSV.

Tabla 3: Screening de actividad antiviral de los extractos EO y EA frente a los diferentes virus.

Especie vegetal	Extracto	BVDV	DENV	HSV-1	PV-2	VSV
<i>Baccharis gaudichaudiana</i> DC.	EO	-	-	-	+	+
<i>Baccharis gaudichaudiana</i> DC.	EA	-	-	+	-	-
<i>Baccharis spicata</i> (Lam.) Baill.	EO	-	-	-	+	+
<i>Baccharis spicata</i> (Lam.) Baill.	EA	-	-	+	-	-
<i>Bidens subalternans</i> DC.	EO	-	-	-	-	-
<i>Bidens subalternans</i> DC.	EA	-	-	-	-	-
<i>Eupatorium buniifolium</i> Hook.	EO	+/-	-	-	+	-
<i>Eupatorium buniifolium</i> Hook.	EA	-	-	-	-	-
<i>Pluchea sagittalis</i> (Lamb.) Cabr.	EO	-	-	+/-	-	+/-
<i>Pluchea sagittalis</i> (Lamb.) Cabr.	EA	-	-	-	-	-
<i>Tagetes minuta</i> L.	EO	-	-	-	+/-	-
<i>Tagetes minuta</i> L.	EA	-	-	-	-	-
<i>Tessaria absinthioides</i> (Hook. et Arn.) DC.	EO	-	-	-	+	-
<i>Tessaria absinthioides</i> (Hook. et Arn.) DC.	EA	-	-	+	-	-

Todas las especies vegetales corresponden a la familia Asteraceae. (+): la reducción del ECP fue mayor al 50% en ambas concentraciones evaluadas; (-): la reducción del ECP fue menor al 50% en ambas concentraciones evaluadas; (+/-): la reducción fue mayor solamente a la mayor concentración (100 µg/ml).

2. Cuantificación de la actividad antiviral

Los extractos que resultaron positivos (+), fueron reevaluados para confirmar la actividad antiviral. Primero se determinó para cada extracto la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) mediante el método de MTS/PMS. La actividad antiviral se evaluó por el método de reducción de placas virales, y determinar la concentración efectiva 50 (CE₅₀). Con ambos valores se calculó el índice de selectividad (IS), como la relación CC₅₀/CE₅₀.

Los EA activos frente a HSV-1, fueron también evaluados frente a HSV-2 (Tabla 4).

Tabla 4: Actividad antiviral de los extractos EO y EA de *B. gaudichaudiana*, *B. spicata*, *T. absinthioides* y del EO de *E. buniifolium*

Especie	Extracto	Virus	CE ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	IS
<i>Baccharis gaudichaudiana</i>	EO	PV-2	14,8 ± 1,5	161,0 ± 2,5	10,9
		VSV	33,9 ± 3,8		4,7
	EA	HSV-1	17,1 ± 0,02	>2000	> 117
		HSV-2	20,8 ± 2,7		> 111,1
<i>Baccharis spicata</i>	EO	PV-2	19,3 ± 3,9	114,3 ± 4,7	5,9
		VSV	23,8 ± 0,04		4,8
	EA	HSV-1	34,7 ± 3,2	>2000	> 57,6
		HSV-2	51,0 ± 6,0		> 39,2
<i>Eupatorium buniifolium</i>	EO	PV-2	9,5 ± 3,5	84,7 ± 3,1	8,3
<i>Tessaria absinthioides</i>	EO	PV-2	40,3 ± 5,6	390,1 ± 1,03	9,7
		HSV-1	15,0 ± 0,8		133,3
	EA	HSV-2	14,1 ± 2,8	> 2000	141,8

CE₅₀: es la concentración de extracto que reduce un 50 % el número de UFP respecto al control sin tratar. Se determinó por el método de reducción de placas virales.

CC₅₀: es la concentración de extracto que reduce un 50 % el número de células viables respecto al control sin tratar. Se determinó evaluando la viabilidad celular con MTS/PMS.

IS = CC₅₀/CE₅₀. Los resultados se muestran como promedio ± DS (n = 3).

3. Análisis de los extractos activos por TLC

La composición química cualitativa de los extractos activos se analizó mediante cromatografía en placa delgada (TLC) (Figura 10).

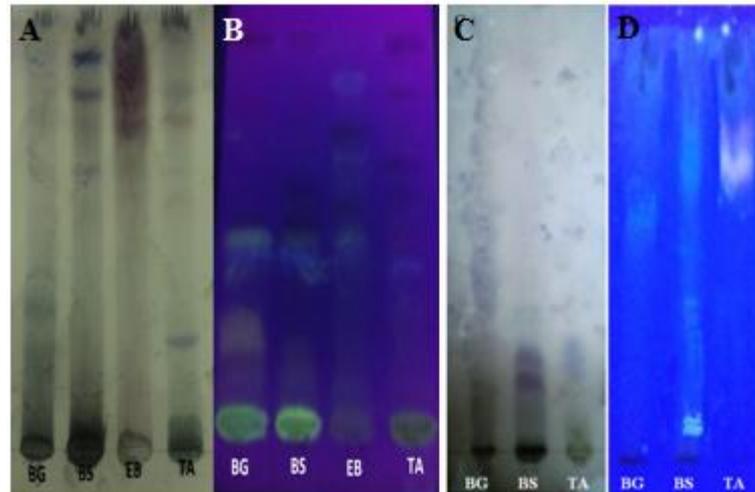


Figura 10: Perfiles cromatográficos por TLC de los extractos activos. Los paneles de la izquierda (A y B) muestran los perfiles cromatográficos de los EO de *B. gaudichaudiana* (BG), *B. spicata* (BS), *E. buniifolium* (EB) y *T. absinthioides* (TA) usando como FE placas de silicagel 60 F₂₅₄ y como FM (A-) Tol:AcEt (5:5) revelado con AniS bajo luz blanca; (B-) AcEt:Tol:ácido fórmico:MeOH (2:2:1:1) revelado con NPR y bajo luz UV de 366 nm. Los paneles de la derecha corresponden a los EA de BG, BS y TA con los sistemas cromatográficos (C-) FE: silicagel 60 F₂₅₄; y FM: AcEt:MeOH:H₂O (100:10:13) revelado con AniS bajo luz blanca: y (D-) FE: celulosa y FM: ácido acético 15% y revelado con NPR bajo luz UV 366 nm.

Cada extracto presenta un patrón de bandas (perfil cromatográfico) determinado evidenciando de esta manera la diversidad en la composición química de cada uno de ellos.

4. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos en el *screening* de actividad antiviral demostraron que algunas de las especies medicinales seleccionadas, podían resultar una fuente potencial de nuevos compuestos activos capaces de inhibir la replicación de diferentes virus de interés clínico.

Una observación que surgió a partir de los resultados obtenidos fue que los extractos orgánicos resultaron más activos frente a virus con genoma ARN (PV-2 y VSV), mientras que los extractos acuosos fueron activos frente a virus ADN (HSV-1 y HSV-2).

Teniendo en cuenta los índices de selectividad obtenidos, y considerando que un valor de IS > 8 es recomendable para continuar con el estudio de un extracto; se procedió a iniciar un proceso de fraccionamiento bioguiado a fin de aislar y purificar los compuestos responsables de la actividad presentada por los extractos y a estudiar el

mecanismo de acción antiviral del extracto acuoso de *B. gaudichaudiana* y de los extractos orgánicos de *B. gaudichaudiana* y *E. buniifolium*.

Es importante destacar que algunos de los extractos analizados exhibieron actividad antiviral parcial (definidos como +/-) y que esos extractos podrían contener compuestos con actividad antiviral que pudieran estar presentes en cantidades insuficientes para inhibir la replicación viral o bien en el extracto completo (mezcla de diferentes compuestos) su actividad puede estar antagonizada por otros metabolitos presentes.

Capítulo 2

Análisis de la actividad antiviral del extracto acuoso
de *Baccharis gaudichaudiana* sobre HSV-1

Capítulo 2: Análisis de la actividad antiviral del extracto acuoso de *Baccharis gaudichaudiana* sobre HSV-1

1. Estudio del mecanismo de acción del EA de *B. gaudichaudiana*

Dado que durante el *screening* (Capítulo 1) la actividad anti HSV-1 del EA de *B. gaudichaudiana* fue evaluada en condiciones experimentales en las que el extracto se hallaba presente durante todo el tiempo experimental, fue importante determinar si la actividad detectada podía deberse a: (i) la inducción de un estado antiviral en la célula hospedadora que impidiera la posterior infección; (ii) una acción virucida, es decir que, por contacto del extracto con la envoltura de HSV-1 se produjera una inactivación de la partícula viral con la consiguiente pérdida de la infectividad; o (iii) un efecto inhibitorio ejercido sobre alguna etapa del ciclo viral mediante la interacción del extracto sobre un blanco viral específico, es decir un efecto antiviral verdadero.

1.1. Efecto del pretratamiento de las células con el EA

Para determinar cómo el EA de *B. gaudichaudiana* ejercía la actividad antiviral, se inició el estudio del pretratamiento de las células con el extracto previo a la infección con HSV-1.

En la Figura 11 se observa que a ninguna de las tres concentraciones evaluadas, el EA fue capaz de inducir un estado antiviral en las células que protegiera de la infección posterior de las mismas con HSV-1.

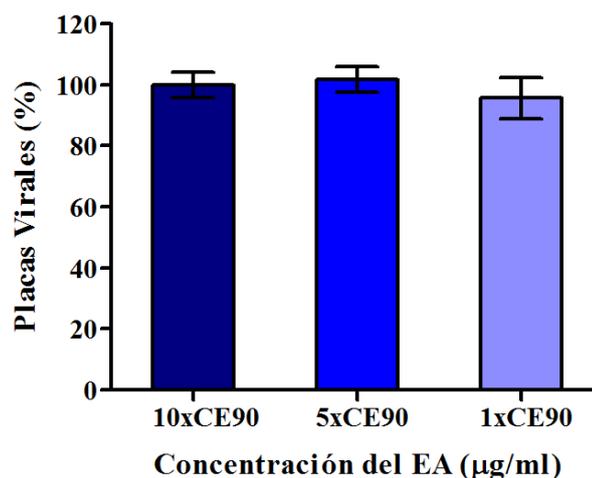


Figura 11: Efecto del pretratamiento de células Vero con el EA de *B. gaudichaudiana*. Se grafica el porcentaje de placas obtenidas luego de 7 h de contacto de las células Vero en presencia de diferentes concentraciones de los extractos considerando el promedio de placas obtenido en el control virus el 100%. Los resultados se muestran como promedio \pm DS ($n = 3$), cada vez por cuadruplicado. $p > 0,05$

1.2. Actividad virucida del EA de *B. gaudichaudiana* a diferentes temperaturas

Una vez que se confirmó que el EA no inducía un estado antiviral en las células Vero, se continuó con el estudio del efecto virucida del extracto. Para ello, se evaluó el efecto del EA sobre un stock de HSV-1 a tres temperaturas diferentes (temperatura ambiente, 37°C y en baño de hielo) manteniendo constante el tiempo de contacto (Figura 12).

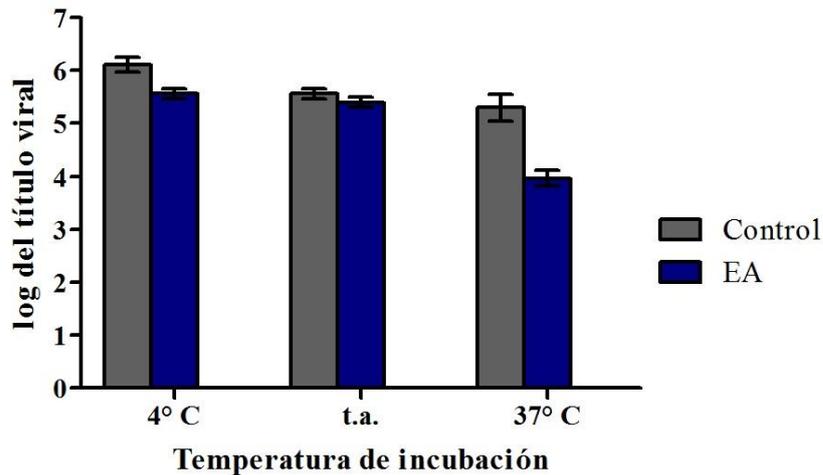


Figura 12: Actividad virucida del EA de *B. gaudichaudiana* a diferentes temperaturas. Se grafica el log del título obtenido de la infectividad residual luego de 30 min de contacto con medio de infección (CV) o con $10 \times CE_{90}$ del EA (350 $\mu\text{g/ml}$) a diferentes temperaturas. Los resultados se muestran como promedio \pm DS (n = 3). t.a.: temperatura ambiente. $p > 0,05$

Como se puede observar, a medida que aumenta la temperatura de incubación, se observa una mayor inactivación de las partículas virales. Sin embargo, dicha inactivación nunca es mayor a 2 log de diferencia respecto al control virus, donde el stock de HSV-1 fue incubado con medio de infección sin extracto.

1.3. Efecto en la adsorción y en la post-adsorción del EA de *B. gaudichaudiana*

Finalmente, se determinó si el EA era capaz de interferir con la adsorción del virus a las células o si interfería con alguna de las etapas de la post-adsorción. Para sincronizar el cultivo, la adsorción se realizó a 4°C, temperatura a la cual además, el EA no ejerce actividad virucida significativa.

Como se puede observar en la Figura 13, cuando el EA de *B. gaudichaudiana* estuvo presente durante la adsorción o durante todo el período experimental, el porcentaje de reducción de las placas virales obtenidas fue máxima. Estos resultados sugerirían que el EA estaría interfiriendo con la unión a los receptores en la superficie celular.

En el período de PA, se observa una reducción del 25 % respecto a CV. Esto podría deberse a que el EA agregado en la PA del primer ciclo estaría interfiriendo en la adsorción viral en los ciclos posteriores que podrían estar ocurriendo durante las 48 h del período experimental a 37 °C.

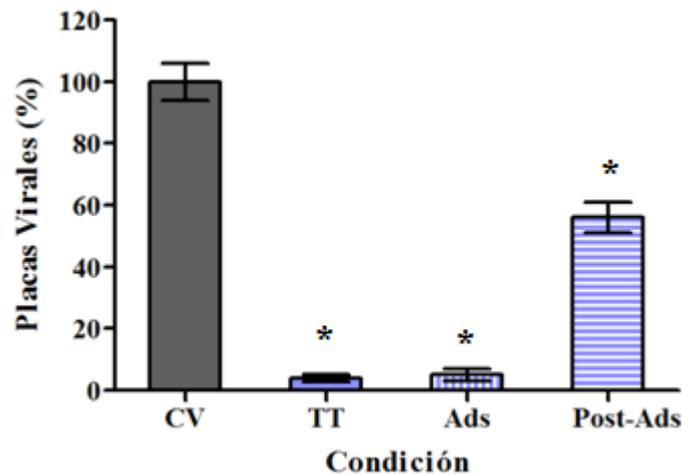


Figura 13: Efecto del tratamiento con el EA de *B. gaudichaudiana* en cada una de las condiciones experimentales. El promedio de placas obtenido en CV se consideró como 100 % y el porcentaje de las otras tres condiciones se calculó respecto a este valor. CV: control virus, ausencia total de extracto; TT: todo el tiempo, presencia de extracto durante toda la infección; Ads: adsorción, el extracto estuvo presente solo durante la adsorción; Post-Ads: post-adsorción, el extracto estuvo presente luego de finalizada la adsorción y durante el resto del período de incubación. Los resultados se muestran como promedio \pm DS (n = 3), cada vez por cuadruplicado. * $p < 0,05$ vs CV.

2. Actividad antiviral del EA en cepas de HSV-1 Resistentes a aciclovir

Si bien se demostró que el EA de *B. gaudichaudiana* era capaz de interferir en la adsorción de HSV-1, se evaluó la acción del EA frente a HSV-1 cepa 2006 (resistente al ACV).

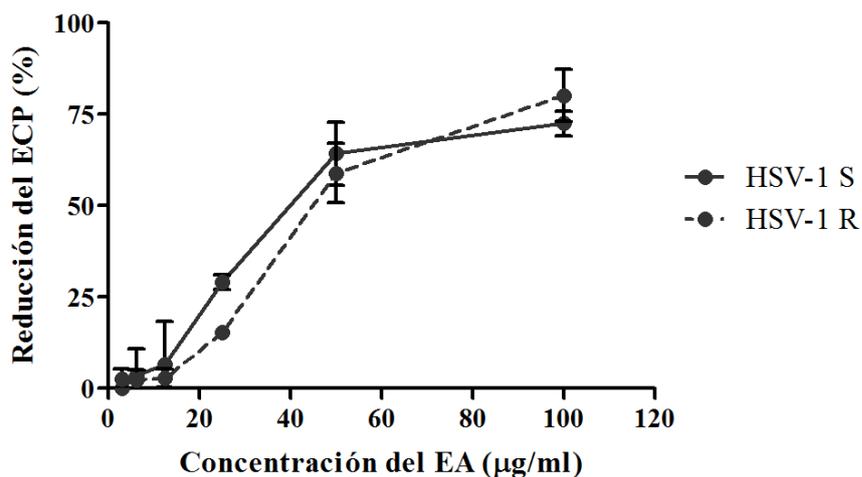


Figura 14: Actividad antiviral del EA de *B. gaudichaudiana* frente a HSV-1 resistentes al aciclovir. HSV-1 S (HSV-1 cepa F, sensible) y HSV-1 R (cepa 2006, resistente al ACV).

Los valores obtenidos de CE_{50} para el EA de *B. gaudichaudiana* frente a la cepa sensible fue de $35,8 \pm 6,3$ µg/ml mientras que para la cepa resistente fue de $46,4 \pm 5,2$ µg/ml (Figura 14).

Las diferencias observadas en la susceptibilidad de ambas cepas confirman que el mecanismo de acción del EA frente a HSV-1 no se solapa con el mecanismo de acción del ACV.

3. Fraccionamiento bioguiado del EA de *B. gaudichaudiana*

Con el fin de poder determinar el/los compuestos activos responsables de la actividad antiviral y virucida antes observadas; se realizó un fraccionamiento del EA. Para ello, se preparó un nuevo extracto a partir de una mayor cantidad de material vegetal. La CE_{50} de este nuevo extracto preparativo fue de $28,7 \pm 1,3$ µg/ml.

3.1. Extracción líquido-líquido del EA de *B. gaudichaudiana*

El EA de *B. gaudichaudiana* se fraccionó mediante una extracción líquido:líquido con acetato de etilo (AcEt)-agua (1:1) y se obtuvieron dos fases, una fase orgánica (FO) y una fase acuosa residual (FAR). Las dos fases fueron caracterizadas por TLC (Figura 15).

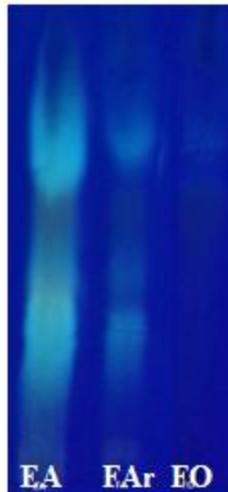


Figura 15: Análisis cromatográfico de las fracciones del EA de *B. gaudichaudiana* por TLC. FE: celulosa y FM: AcH 15 %. Reactivo revelador: NPR

Como puede observarse, la FAr mantiene la mayor parte de los compuestos presentes en el EA original mientras que la FO de AcEt arrastró solamente un par de compuestos presentes en el EA.

3.2. Actividad antiviral de las fracciones obtenidas

La actividad antiviral de las fases FO y FAr se evaluó frente a HSV-1 para las dos fases (FAr y FO).

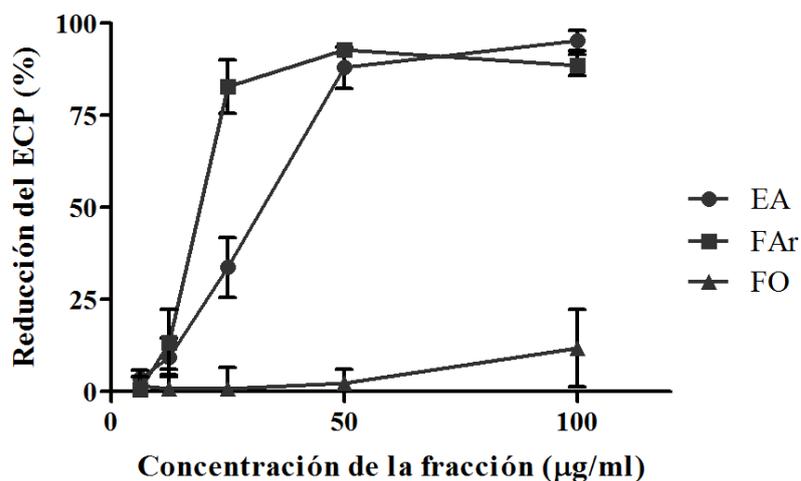


Figura 16: Actividad antiviral de las fases FO y FAr. Se grafica el porcentaje de reducción del ECP para FO y FAr frente a HSV-1.

Como puede observarse en la Figura 16, la FAr presentó una $CE_{50} = 18,5 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$ mientras que la FO no presentó actividad antiviral frente a HSV-1. Siendo la actividad

antiviral del EA preparativo $28,7 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$; la purificación con AcEt mejoró la actividad antiviral presente en la FAr 1,6 veces.

4. Conclusiones parciales

El estudio preliminar del mecanismo de acción del extracto acuoso (EA) de *B. gaudichaudiana* demostró que el mismo, sería capaz de inhibir la replicación de HSV-1 por dos mecanismos diferentes: mediante una inactivación de las partículas virales por contacto directo (acción virucida) y a bajas concentraciones mediante una interferencia en la adsorción del virus a la célula. Si bien la disminución de la infectividad cuando el EA se encuentra presente en el período de la adsorción podría deberse a una acción virucida que ocurre rápidamente y previo a la unión del virus a los receptores celulares, este efecto se descarta ya que la actividad virucida a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ fue muy baja, lo que justificaría el mecanismo dual propuesto, que pudiera estar relacionado con la acción de uno o más compuestos presentes en el EA.

Además, el EA fue capaz de inhibir cepas de HSV-1 resistentes al compuesto de elección para el tratamiento de las infecciones, como es el ACV, indicando que el blanco viral del cual el EA sería diferentes a la Tk viral o a la ADN polimerasa viral; y el mecanismo de acción diferente a la inhibición con la replicación del genoma viral.

Capítulo 3

Extracto orgánico de *Baccharis gaudichaudiana*:
Estudio preliminar del mecanismo de acción anti-PV-
2 y fraccionamiento bioguiado

Capítulo 3. Extracto orgánico de *Baccharis gaudichaudiana*: Estudio preliminar del mecanismo de acción anti-PV-2 y fraccionamiento bioquímico.

1. Estudio del mecanismo de acción del extracto orgánico de *B. gaudichaudiana*

1.1. Efecto del pretratamiento de las células con el EO

Al igual que con el extracto acuoso de la misma planta, se puede observar (Figura 17) que a ninguna de las tres concentraciones evaluadas, el EO fue capaz de inducir un estado antiviral en las células Vero, que protegiera de la posterior infección de las mismas con PV-2.

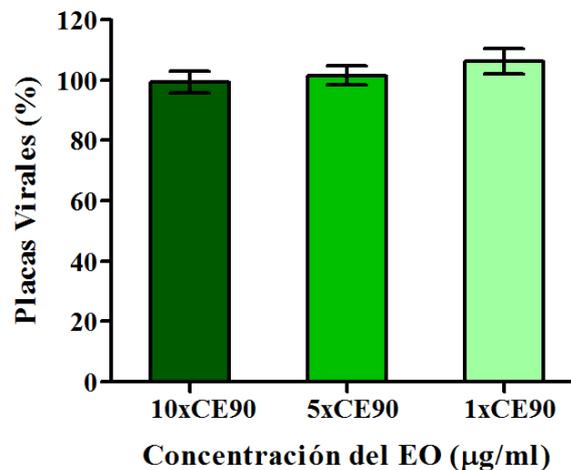


Figura 17: Efecto del pretratamiento de células Vero con el EO de *B. gaudichaudiana*. Se grafica el porcentaje de placas virales obtenidas para cada tratamiento respecto al control virus sin tratar. Monocapas de células Vero fueron incubadas 7 h a 37 °C con cada concentración del EO, previo a la infección viral. Los resultados representan el promedio \pm DS, cada vez por cuadruplicado (n = 3). $p > 0,05$.

1.2. Actividad virucida del EO de *B. gaudichaudiana* a diferentes temperaturas

Se evaluó si el EO era capaz de reducir la infectividad de las partículas de PV-2 luego de 30 min de contacto a temperatura ambiente (t.a.) y a 37 °C.

Los resultados muestran que la infectividad residual del stock de PV-2, luego de 30 min de contacto con el EO, es semejante al obtenido con el control. Por lo tanto, se puede concluir que el EO de *B. gaudichaudiana* no ejerce acción virucida sobre PV-2, en las condiciones experimentales evaluadas (Figura 18).

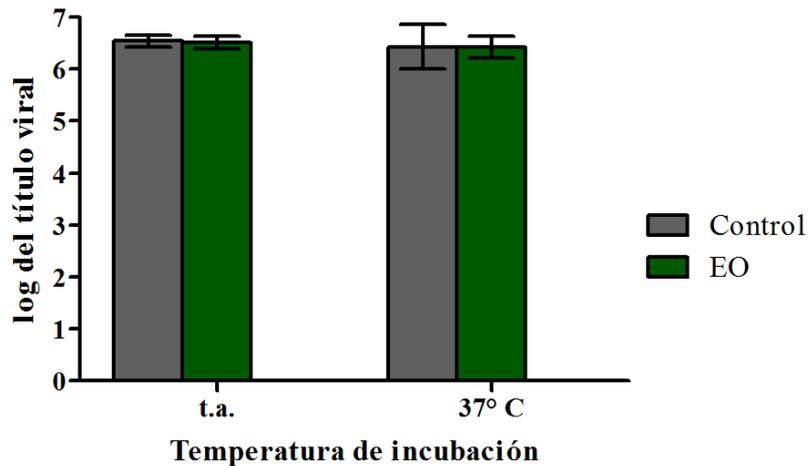


Figura 18: Actividad virucida del EO de *B. gaudichaudiana* a diferentes temperaturas. Se grafica el log del título viral midiendo la infectividad residual luego de 30 min de contacto con medio de infección (control) o con 10xCE₉₀ del EO (300 µg/ml) a t.a. y a 37 °C. Los resultados representan el promedio ± DS, cada vez por duplicado (n = 3). p > 0,05.

1.3. Efecto en la adsorción y en la post-adsorción del EO de *B. gaudichaudiana*

Se evaluó el efecto del EO de *B. gaudichaudiana* en las distintas etapas del ciclo viral de PV-2. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 19.

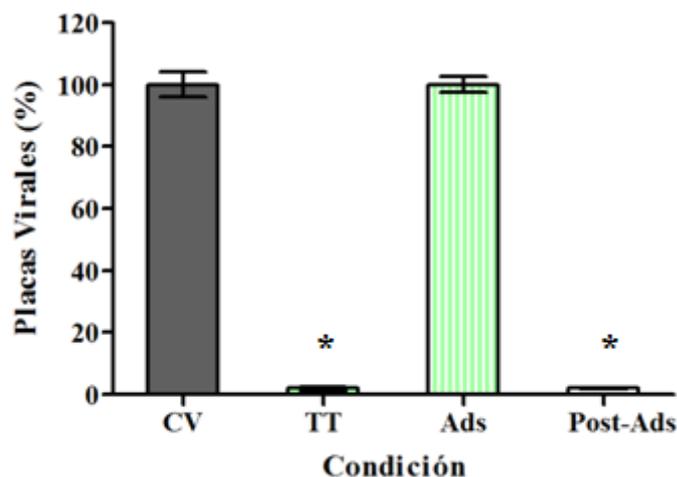


Figura 19: Efecto del EO de *B. gaudichaudiana* sobre PV-2, en cada una de las condiciones experimentales. El porcentaje del número de placas virales obtenido para cada condición se calculó teniendo en cuenta el número promedio de placas virales del CV como el 100 %. CV (control virus): medio de infección en ausencia de extracto; TT (todo el tiempo): medio de infección conteniendo 1XCE₉₀ (30 µg/ml) del EO de *B. gaudichaudiana*, presente durante todo el tiempo de la infección, Ads (adsorción): el extracto estuvo presente solamente durante la adsorción; y Post-Ads (post-adsorción): el extracto estuvo presente solamente durante la Post-ads y hasta el final del período experimental. Los resultados representan el promedio ± DS, cada vez por cuadruplicado (n = 3). p < 0,05 vs CV.

La reducción en el número de placas de PV-2 obtenidas con el EO de *B. gaudichaudiana* fue máxima cuando el extracto estuvo presente durante todo el tiempo y durante la post adsorción. Estos resultados sugieren que el EO estaría ejerciendo su actividad antiviral en alguna de las etapas del ciclo viral que ocurren luego de la adsorción del virus a las células.

2. Fraccionamiento bioguiado del EO de *B. gaudichaudiana*

Con el objetivo de aislar e identificar el/los compuestos activos presentes en el EO de *B. gaudichaudiana* se realizó un fraccionamiento bioguiado. Para ello, la extracción del material vegetal se llevó a cabo a escala preparativa, según lo descrito en el punto 7 de materiales y métodos.

2.1. Fraccionamiento del EO por cromatografía en columna. Perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas.

El EO se fraccionó por cromatografía en columna obteniéndose ocho fracciones (F_A - F_H) finales, las cuales se analizaron por TLC (Figura 20).

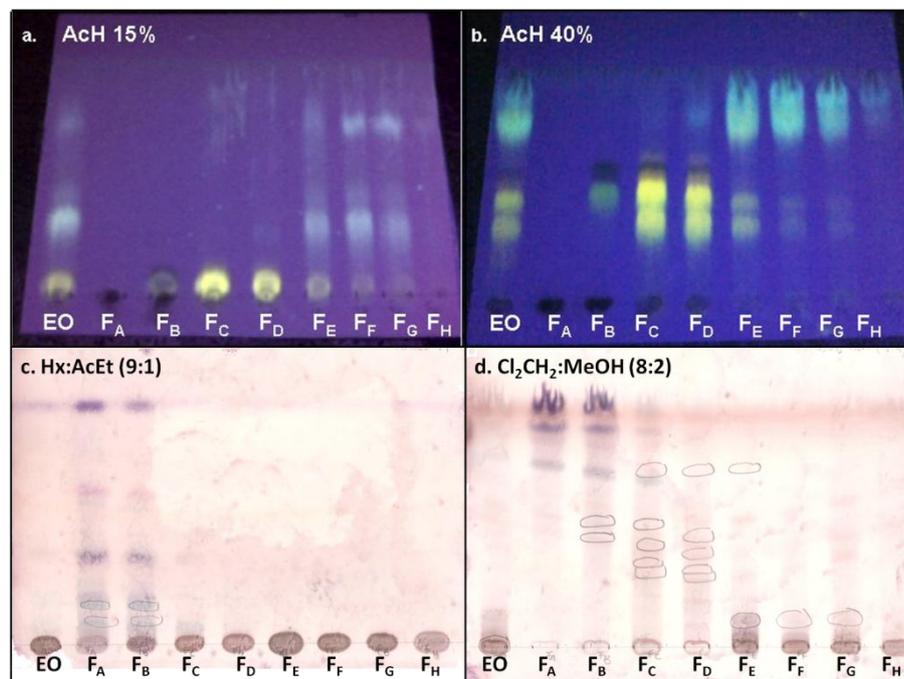


Figura 20: Análisis cromatográficos de las fracciones F_A - F_H por TLC. FE: celulosa y FM: (a.) AcH 15 % y (b.) AcH 40 %; ambas reveladas con NPR. FE: silicagel 60 y FM: (c.) Hx:AcEt (9:1) y (d.) CH_2Cl_2 :MeOH (8:2), ambas reveladas con AniS.

En la Figura 20 se puede observar una distribución diferencial de los compuestos, representados por las diferentes bandas en las fracciones $F_A - F_H$.

Las bandas amarillas observadas en las fracciones F_C y F_D luego de reveladas con NPR podrían corresponderse con compuestos de naturaleza fenólica, probablemente flavonoides; mientras que las bandas azules podrían corresponderse con la presencia de derivados de ácido cafeoilfenólicos. Las bandas azul-violáceas que aparecen luego del revelado con AniS podría corresponderse con compuestos de naturaleza terpénica.

2.2. Actividad antiviral de las fracciones $F_A - F_H$ por reducción del efecto citopático

A cada fracción se le determinó la actividad antiviral por reducción del ECP (CE_{50}) y la citotoxicidad en células Vero durante 72 h de incubación (CC_{50}). Estos resultados, junto con el rendimiento obtenido de cada fracción, se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5: Actividad antiviral de las fracciones $F_A - F_H$ frente a PV-2

Fracción	Rto (g)	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IS
F_A	1,4	$396,7 \pm 14,4$	$15,4 \pm 1,0$	25,7
F_B	1,4	$196,1 \pm 6,1$	$7,6 \pm 0,4$	25,7
F_C	2,6	$118,5 \pm 6,5$	$3,1 \pm 0,3$	37,9
F_D	0,7	$110,2 \pm 7,9$	$4,9 \pm 0,3$	22,5
F_E	2,1	$390,9 \pm 10,9$	$38,4 \pm 3,8$	10,2
F_F	1,7	$390,4 \pm 10,4$	$33,1 \pm 4,8$	11,8
F_G	0,8	$412,3 \pm 7,1$	$27,4 \pm 3,9$	15,4
F_H	0,3	$729,0 \pm 3,1$	$20,8 \pm 3,6$	35,1

Rto: rendimiento. CE_{50} : concentración efectiva 50 determinada por reducción del ECP, infección con PV-2 ($\text{moi} = 0,01$) en ausencia (CV) o presencia de diferentes concentraciones de cada fracción. IS: índice de selectividad = CC_{50}/CE_{50} . Los resultados se muestran como promedio \pm DS, cada vez por cuadruplicado ($n = 3$).

Como puede observarse, las dos fracciones más activas fueron las fracciones F_C y F_D con valores de CE₅₀ de 3,1 y 4,9 µg/ml; respectivamente. Para la fracción F_H se observó un IS elevado (35,1). De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó la actividad antiviral de las fracciones F_C, F_D y F_H por el método de reducción de placas virales. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Actividad antiviral de las fracciones F_C, F_D y F_H determinada por el método de reducción de placas virales.

Fracción	CC ₅₀ (µg/ml)	CE ₅₀ (µg/ml)	IS
F _C	118,5 ± 6,5	2,1 ± 0,1	57,5
F _D	110,2 ± 7,9	2,5 ± 0,3	43,5
F _H	729 ± 31	21,4 ± 6,4	34,0

Los resultados se muestran como promedio ± DS (n = 3)

2.3. Análisis por cromatografía líquida de alta presión de las fracciones F_C, F_D y F_H

Las fracciones F_C, F_D y F_H obtenidas a partir del fraccionamiento del EO de *B. gaudichaudiana* se analizaron por HPLC, según la metodología descrita en el punto 9.1 de materiales y métodos (Figura 21).

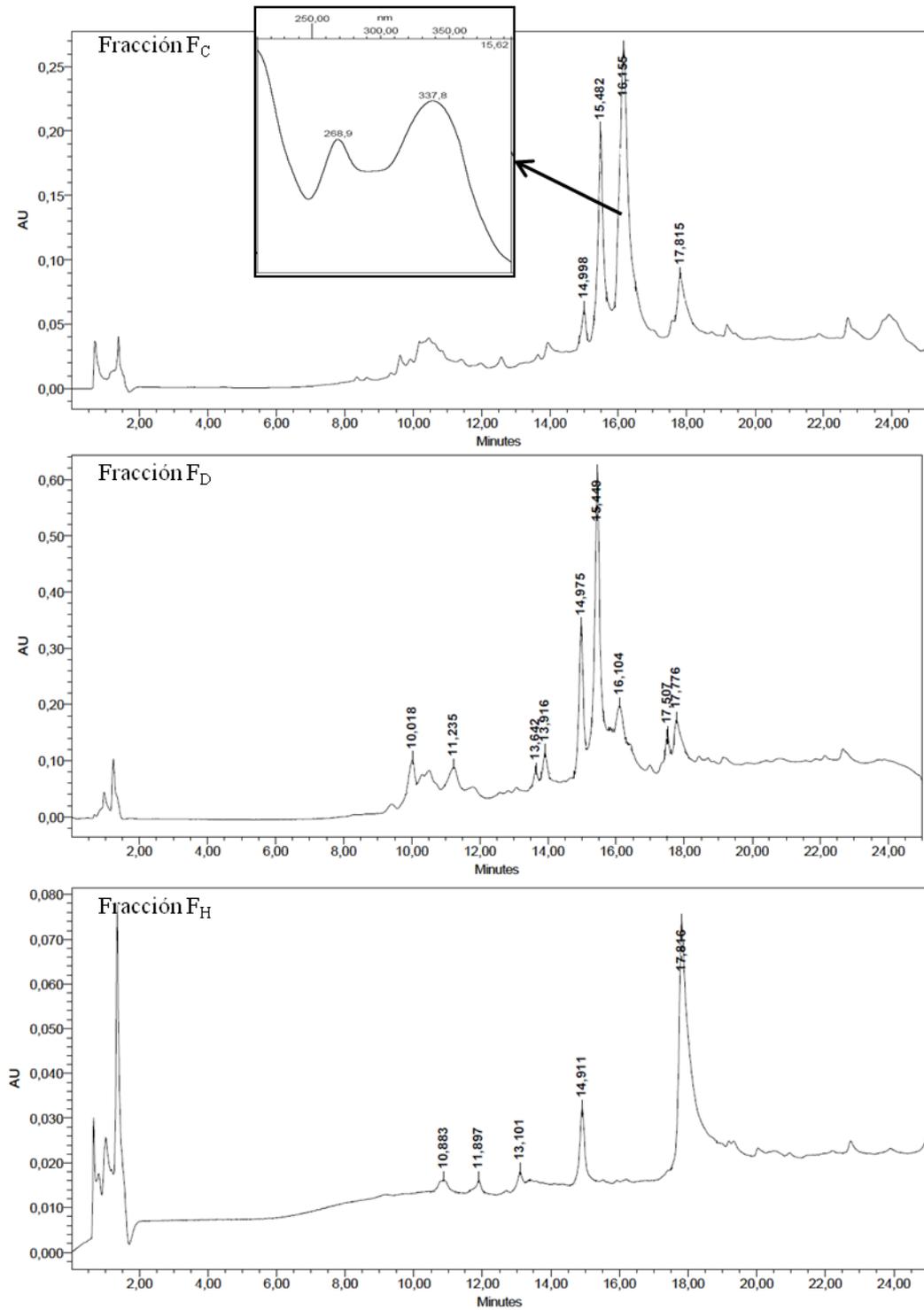


Figura 21: Análisis por HPLC de las fracciones F_C, F_D y F_H. En el recuadro se muestra el espectro de absorción al UV del pico mayoritario presente en la fracción F_C.

En la fracción F_C se observan cuatro compuestos mayoritarios con tiempos de retención (Tr) de 14,99, 15,48, 16,15 y 17,82 min. En el espectro UV del pico con Tr de 16,15 min se observan dos bandas de absorción a 270 y 340 nm. Estos valores serían compatibles con un flavonoide.

2.4. Estudio del mecanismo de acción de la fracción F_C . Curva de crecimiento en un paso

Luego de confirmar que F_C continuaba ejerciendo su acción inhibitoria en alguna de las etapas post-adsorción, se realizó una curva de crecimiento en un paso para poder determinar en qué etapa del ciclo de replicación de PV-2 podría inhibir dicha fracción.

En primer lugar se realizó una curva de multiplicación viral en un ciclo de PV-2 determinando la producción viral infectiva (UFP/ml) en función del tiempo (Figura 22A). Se determinó que el tiempo en que la producción de virus infectivo era máxima fue a las 10 h p.i.. Posteriormente, se determinó el efecto del agregado de F_C a distintos tiempos de la infección sobre la producción viral infectiva de PV-2.

Los resultados obtenidos (Figura 22B) demostraron que la fracción F_C ejercería su acción inhibitoria máxima hasta las cuatro horas post-adsorción del virus a las células. Luego de ese tiempo, el agregado de la fracción F_C produciría un menor efecto inhibitorio sobre replicación de PV-2.

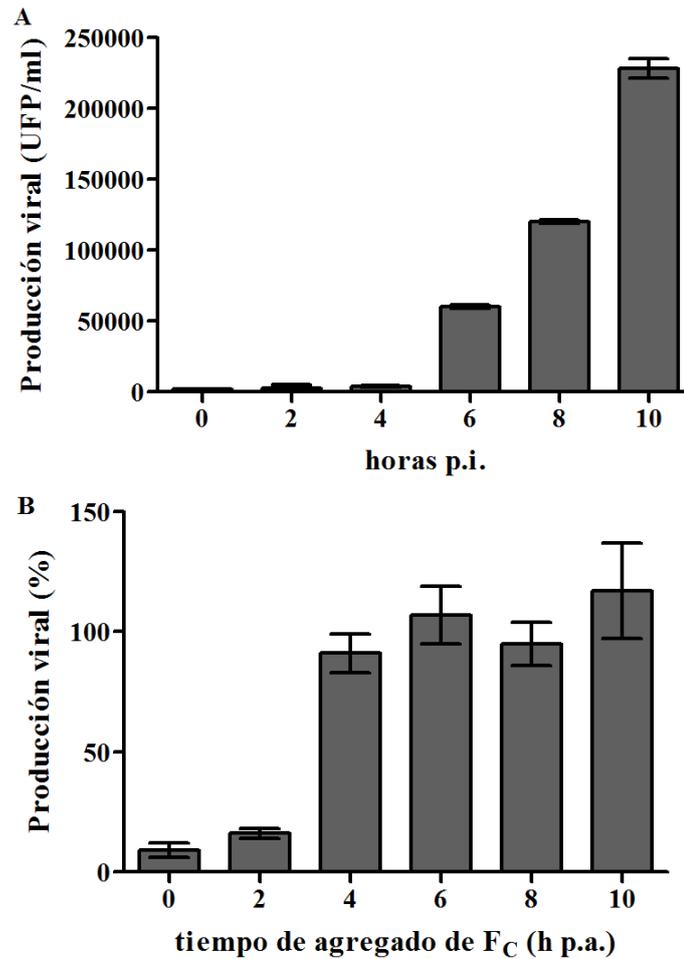


Figura 22: Efecto del agregado de F_C en el ciclo viral de PV-2. **A.-** Cinética de producción extracelular de PV-2 en condiciones de un paso: Las monocapas de células Vero fueron infectadas con PV-2 ($\text{moi} = 10$). A las 10 h p.i., se cosechó el sobrenadante y se determinó el título viral por el método de placas (UFP/ml). **B.-** Efecto del agregado de F_C a distintos tiempo del ciclo de PV-2: Se agregó F_C ($10 \times \text{CE}_{50} = 22 \mu\text{g/ml}$) a diferentes tiempos (horas) post infección (p.i.) de PV-2. Los resultados se expresan como % de la producción viral respecto al control sin tratar.

3. Análisis de la fracción F_C por HPLC

3.1. Fraccionamiento de F_C por HPLC

La fracción F_C fue sometida a una separación por HPLC y se obtuvieron cuatro fracciones: F_{C1} (0-13 min); F_{C2} (13-20 min) y F_{C3} (20-25 min) y F_{C4} (25-30 min) (Figura 23).

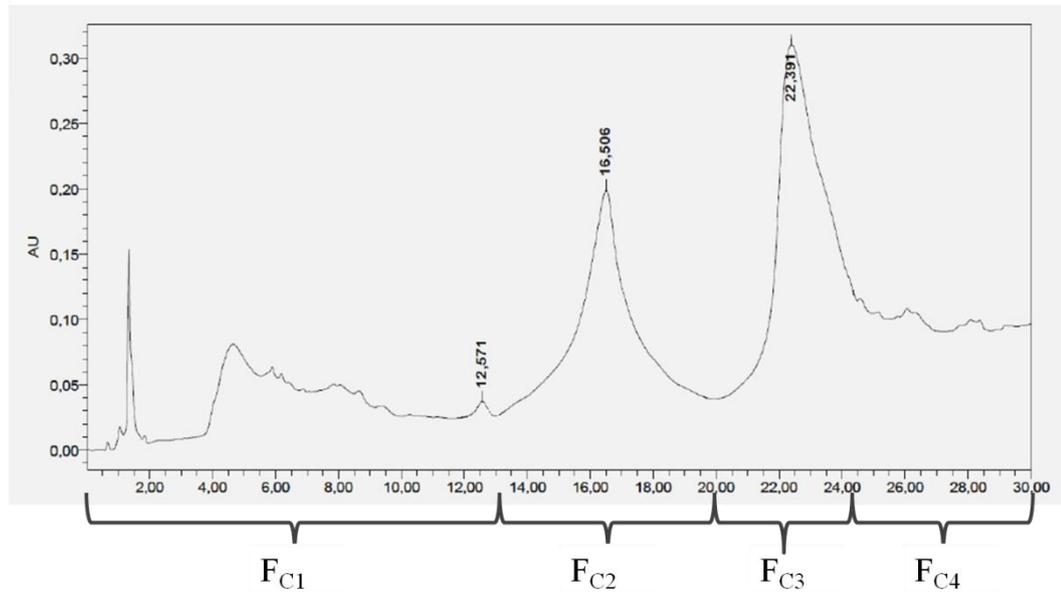


Figura 23: Análisis de la fracción F_C por HPLC. Fase móvil: gradiente de metanol (A) y agua (B): 0-15 min: isocrático 50% A; 15-25 min: 50 \rightarrow 98% A; 25-30 min: isocrático 98% A; 30-31 min: 98 \rightarrow 50% A.

3.2. Actividad antiviral de F_{C1} - F_{C4} frente a PV-2

Se determinó la actividad antiviral de las cuatro sub-fracciones (F_{C1} - F_{C4}) frente a PV-2 por reducción de placas (Figura 24).

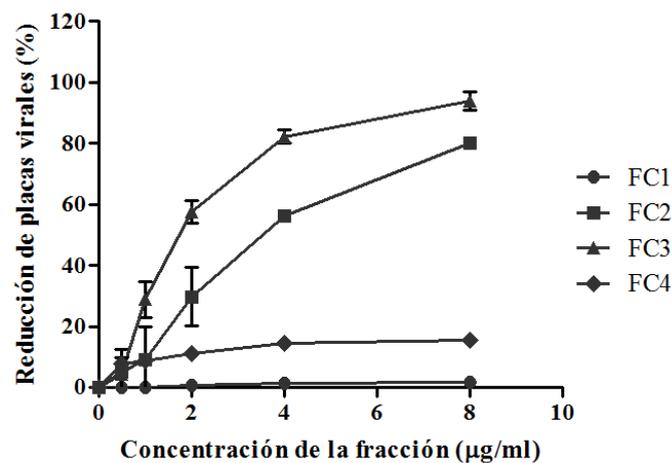


Figura 24: Actividad antiviral de las subfracciones F_{C1} - F_{C4} . Se muestra el porcentaje de reducción de placas virales en presencia de diferentes concentraciones de cada subfracción. Los resultados se expresan como promedio \pm DS ($n = 3$), cada vez por duplicado.

La actividad antiviral se recuperó en las fracciones F_{C2} y F_{C3} . La CE_{50} de F_{C2} fue de $3,3 \pm 0,3$ $\mu\text{g/ml}$ y para F_{C3} de $1,8 \pm 0,1$ $\mu\text{g/ml}$. El valor de citotoxicidad (CC_{50}) para F_{C2} no

fue posible determinarlo debido al bajo rendimiento de esta fracción, mientras que para F_{C3} la CC_{50} fue mayor a 100 $\mu\text{g/ml}$, resultando en un $IS > 55,6$.

3.3. Análisis de la fracción F_{C3} por HPLC

La Figura 25 muestra el análisis por HPLC de la fracción F_{C3} . En el cromatograma se pueden observar dos picos mayoritarios a Tr de 10,56 y 13,82 min. En el recuadro de la figura se muestra el espectro UV del pico mayoritario con máximos de absorción a 337 y 269 nm; que sería compatible con el pico mayoritario previamente observado en la fracción F_C .

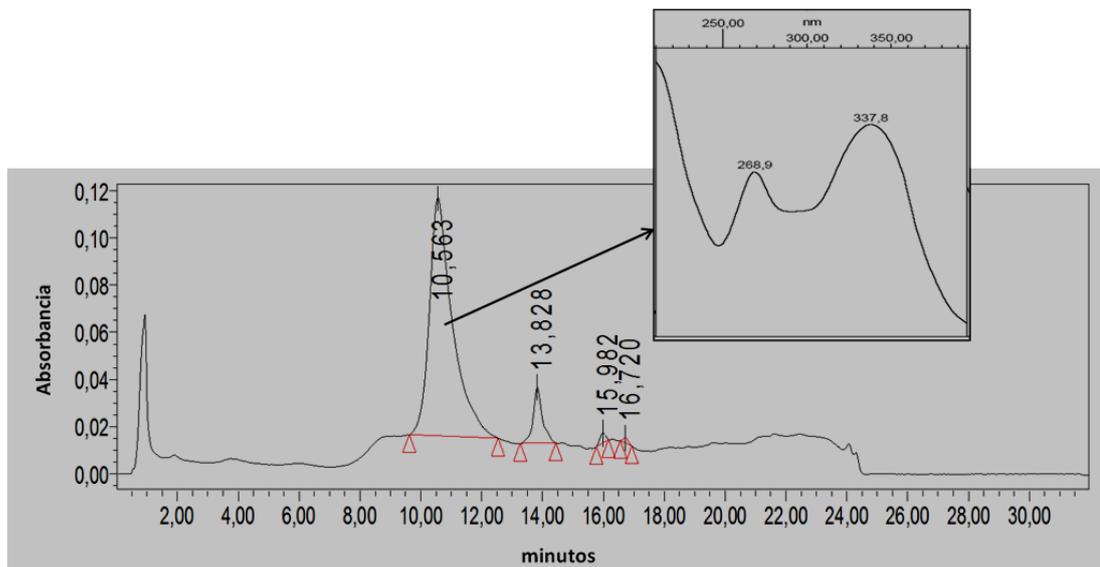


Figura 25: Análisis por HPLC de la fracción F_{C3} . En el recuadro se observa el espectro de absorción UV del pico mayoritario.

4. Fraccionamiento de F_C de *B. gaudichaudiana* a escala preparativa

4.1. Fraccionamiento de F_C de *B. gaudichaudiana*

Con el objetivo de obtener mayor cantidad de los compuestos presentes en la fracción activa, se realizó un nuevo fraccionamiento de la fracción F_C , por cromatografía en columna. De este fraccionamiento (punto 9.3 de materiales y métodos) se obtuvieron 28 fracciones (F_{C1} - $F_{CXXVIII}$). En la fracción F_{CXI} apareció un precipitado blanco amarillento que se denominó P_{XI} .

A cada una de las fracciones (F_{C1} - $F_{CXXVIII}$) se les determinó la actividad antiviral a las concentraciones de 10 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

En la Figura 26 se presentan los resultados obtenidos de la reducción del ECP con cada una de las fracciones a la concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

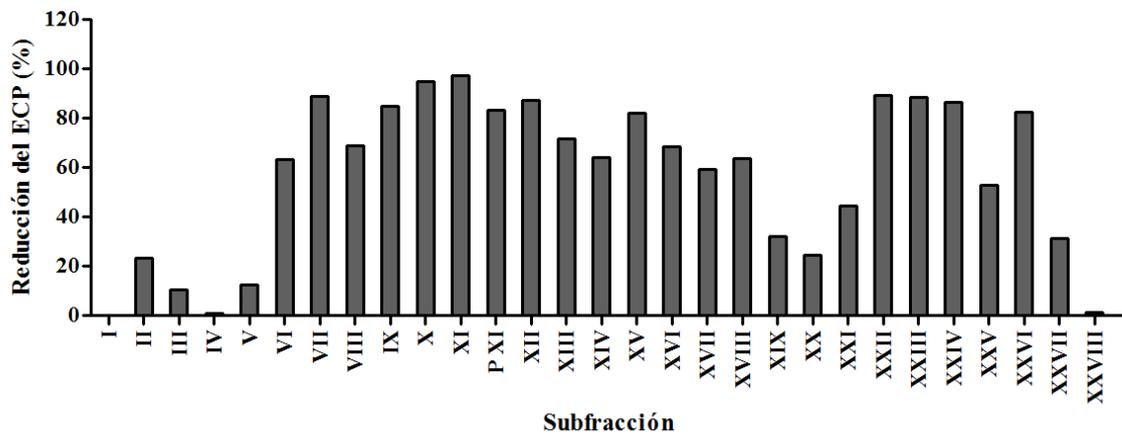


Figura 26: Actividad antiviral de las fracciones F_{CI} – F_{CXXVIII}. Se muestran los porcentajes de reducción del ECP de cada una de las fracciones a 2,5 µg/ml. Se incluyó P_{XI} (precipitado obtenido de la fracción F_{CXI}).

Como se puede observar en la Figura 26, tanto la fracción F_{CXI} como el precipitado P_{XI} presentaron valores de mayor reducción del ECP viral. F_{CXI} y P_{XI} presentaron valores de CE₅₀ de 0,45 y 0,84 µg/ml, respectivamente; mientras que la CE₅₀ de la fracción F_C original era de CE₅₀ de 2,1 ± 0,1 µg/ml. Por lo tanto, en ambos casos, se obtuvo una actividad antiviral mayor, respecto a la fracción original.

4.2. Análisis del precipitado obtenido de la fracción F_{CXI} (P_{XI})

El precipitado obtenido en la fracción F_{CXI}, P_{XI}, se analizó por TLC en tres sistemas cromatográficos diferentes. Los resultados se presentan en la Figura 27.

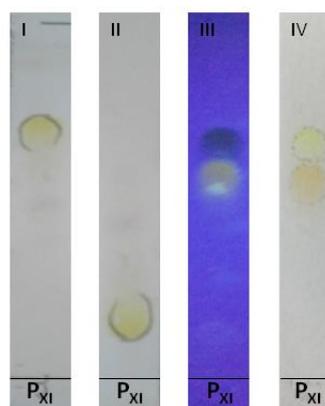


Figura 27: Análisis por TLC de P_{XI} en diferentes sistemas cromatográficos. Sistema I, FE: silicagel 60, FM: Cl₂:CH₂:MeOH (8:2). Sistema II, FE: silicagel 60, FM: Tol:AcEt (3:7); ambos revelados con AniS. Sistema III, FE: celulosa, FM: AcH 40 % revelado con NPR y vistas a III.- UV (355 nm) y IV.- luz blanca.

Como se puede observar, en el sistema cromatográfico III el precipitado P_{XI} no correspondía a un solo compuesto puro.

A fin de purificar el precipitado P_{XI} se llevó cabo una cromatografía en columna [FE: silicagel 60 y FM: de CH_2Cl_2 :MeOH:AcH (95:5:1)]. Se obtuvieron 24 fracciones que se agruparon en tres fracciones de acuerdo a su perfil cromatográfico por TLC: P_{XI-A} (1 a 6), P_{XI-B} (7 a 13) y P_{XI-C} (14 a 24).

El análisis por TLC de las tres fracciones se muestra en la Figura 28.



Figura 28: Análisis por TLC de P_{XI-A} , P_{XI-B} y P_{XI-C} . FE: celulosa; FM: CH_2Cl_2 :MeOH:AcH (95:5:1) y reactivo revelador: NPR. A: P_{XI-A} , B: P_{XI-B} y C: P_{XI-C} .

Como se puede observar en la Figura 28, solamente en la fracción P_{XI-C} fue posible la obtención de uno de los compuestos presentes en el precipitado original, mientras que en la fracción P_{XI-B} están presentes los dos compuestos. El compuesto aislado de P_{XI-C} se denominó compuesto A y su pureza se determinó por HPLC (96 %) (Figura 29).

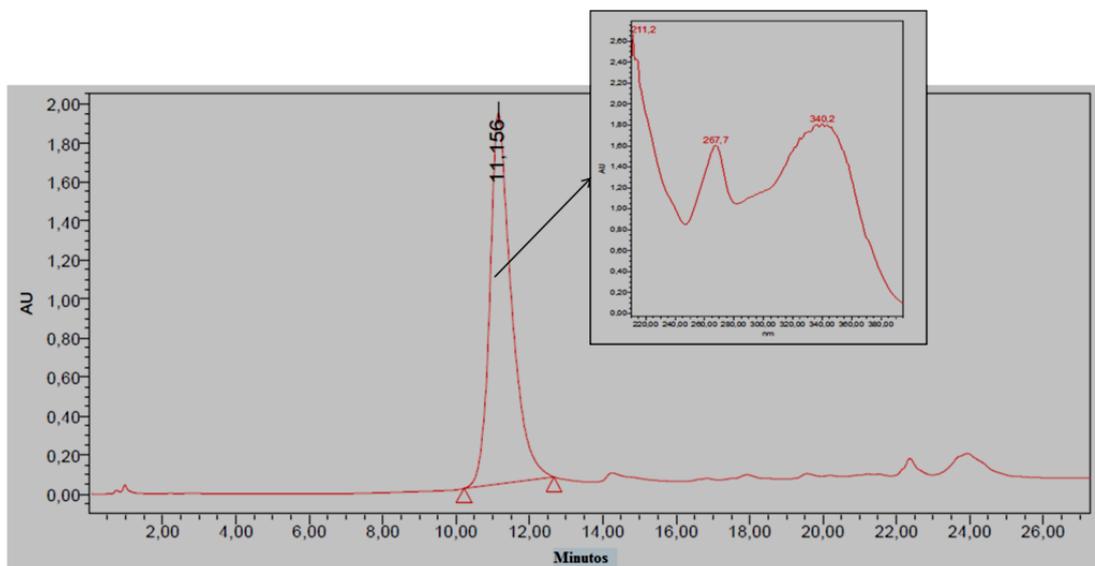


Figura 29: Análisis de la pureza del compuesto A (C_A), por HPLC. Fase móvil: gradiente de agua % (A) y metanol (B): 0-2 min: isocrático 50 % A; 2-15 min: 50 \rightarrow 2 % A; 15-25 min: isocrático 2 % A; 25-28 min: 2 \rightarrow 50 % A. El recuadro muestra el espectro de absorción UV del compuesto A.

4.3. Identificación del compuesto A

La identificación del compuesto A, se llevó a cabo en base al análisis de sus características cromatográficas y por técnicas espectroscópicas (espectroscopía IR y espectroscopía UV).

UV (λ max, nm): MeOH: 269, 296 (sh), 332; MeONa: 273, 326 (sh), 391; $AlCl_3$: 276, 301, 348, 376; $AlCl_3 + HCl$: 277, 301, 340, 372; NaOAc: 276, 301 (sh), 353; NaOAc + H_3BO_3 : 276, 301 (sh), 353.

El espectro UV del compuesto A en solución metanólica presentó dos bandas con λ máximos de absorción a 332 nm (banda I) y 269 nm (banda II). Estos resultados indicaron que se podría tratar de una flavona o un flavonol con el grupo OH en el C3 sustituido. La banda II presentó un solo pico que indicó que el anillo B se encontraba monosustituido. El agregado de MeONa a la solución metanólica del compuesto A produjo un corrimiento batocrómico de 59 nm (λ máx.= 391 nm) en la banda I con aumento de la intensidad (comparado con su espectro en MeOH), indicando la presencia de un grupo OH en el C4'. Cuando el espectro se midió nuevamente a los 5 min, los picos de absorción no degeneraron, indicando la ausencia de un sistema de hidroxilos altamente inestables.

El agregado de $AlCl_3$ a la solución metanólica del compuesto A produjo un corrimiento batocrómico de 44 nm en la banda I indicando la presencia de un grupo 5-OH. El

agregado de HCl a la solución anterior produjo un corrimiento hipsocrómico en la banda I de 4 nm (respecto al espectro medido en AlCl_3), indicando la ausencia de grupos orto-dihidroxi en el anillo B.

Cuando el espectro UV se midió con NaOAc (base débil que ioniza los grupos OH más ácidos del flavonoide) se obtuvo un máximo de absorción de la banda I a 353 nm. Este valor resultó menor que el observado luego del agregado de NaMeO (391 nm) indicando la probable presencia de un grupo 7-OH libre. Esto se corroboró por el corrimiento batocrómico de la banda II de 7 nm. El agregado de H_3BO_3 a la solución del compuesto A en NaAcO no produjo ningún corrimiento de la bandas indicando la ausencia de grupos orto-diOH.

IR (KBr), ν max (cm^{-1}): 3436 (OH), 1656 ($\text{C}=\text{O}$).

En el espectro infrarrojo el pico a 3436, banda ancha, corresponde al estiramiento O-H. La ausencia de picos en el rango 2950-2855 cm^{-1} correspondientes a las bandas de estiramiento C-H de hidrocarburos saturados indican la ausencia de azúcares en la molécula, confirmándose que se trata de un aglucón y no de un glicósido flavonoide. El espectro muestra también la presencia del grupo $\text{C}=\text{O}$ de la cromona a 1656 cm^{-1} .

Además, se realizó el análisis del perfil cromatográfico frente a un patrón de referencia (Figura 30).

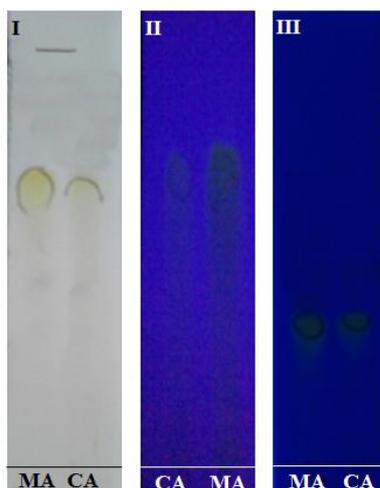


Figura 30: Análisis por TLC del compuesto A frente a un estándar de muestra auténtica. Sistema I: FE: silicagel 60, FM: $\text{Cl}_2:\text{CH}_2:\text{MeOH}$ (8:2), reactivo revelador: AniS. Sistema II: FE: celulosa, FM: AcH 40 %; Sistema III: FE: silicagel 60; FM: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{AcH}$ (95:5:1); reactivo revelador (II y III): NPR. MA: estándar de muestra auténtica de apigenina (Sigma), CA: compuesto A.

Las características de revelado así como los valores de R_f (relación de frente) obtenidos en distintos sistemas cromatográficos (Figura 30) indicaron que se trataba probablemente de un flavonoide. A la luz UV de 254 nm se observó una coloración violeta y a la luz UV de 366 nm presentó un color marrón que viró al amarillo por la exposición a vapores de NH_3 . Este comportamiento indicó que el compuesto A podría tratarse de una 5-hidroxi flavona o de un flavonol, con un grupo hidroxilo (OH) libre en posición C4'. Luego del revelado con el reactivo NPR, el compuesto A se visualizó de color amarillo, característico de un flavonoide monosustituido en el anillo B. Además, en los tres sistemas analizados, el compuesto A presentó R_f similares al compuesto de referencia.

Con todos estos resultados se concluyó que el compuesto A era la 5, 7-dihidroxi-2- (4-hidroxilfenil)-4H-cromen-4-ona o apigenina (Figura 31) (Mabry et al. 1970).

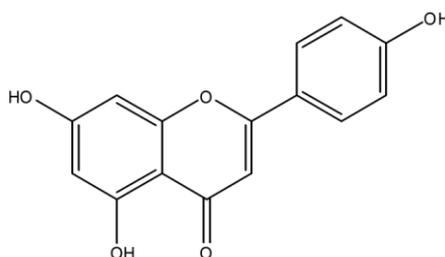


Figura 31: Estructura química de la apigenina. 5, 7-dihidroxi-2- (4-hidroxilfenil)-4H – cromen-4-ona, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, peso molecular: 270,24 g/mol.

4.4. Actividad antiviral de la apigenina

Se determinó la actividad antiviral de la apigenina aislada y purificada de la fracción F_C del EO de *B. gaudichaudiana* para PV-2. La CC_{50} para las células Vero fue de $230,7 \pm 4,4 \mu\text{M}$ y CE_{50} para PV-2 fue de $12,2 \pm 3,3 \mu\text{M}$; resultando un IS de 18,9. Estos valores para la apigenina patrón fueron de $\text{CC}_{50} = 234,2 \pm 5,5 \mu\text{M}$ y $\text{CE}_{50} = 12,0 \pm 0,7 \mu\text{M}$ y un IS de 19,5.

5. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que en el EO de *B. gaudichaudiana* se encontraban compuestos capaces de actuar como antivirales verdaderos, más específicamente interfiriendo alguna etapa del ciclo de replicación de PV-2 que

ocurriese antes de las cuatro horas posteriores a la adsorción de las partículas virales a las células.

Las sucesivas etapas de purificación permitieron aislar e identificar uno de los compuestos activos presentes, un flavonoide conocido, la apigenina.

Sin embargo, la actividad antiviral detectada en la fracción F_C pareciera no corresponder únicamente a la apigenina. Por lo tanto, estos resultados sugieren la presencia de algún otro compuesto activo, que pudiera actuar en forma sinérgica o aditiva a la apigenina frente a PV-2.

Capítulo 4

Actividad antiviral de ocho especies del género
Baccharis frente a poliovirus y herpesvirus

Capítulo 4: Actividad antiviral de ocho especies del género *Baccharis* frente a poliovirus y herpesvirus

1. Análisis de los extractos orgánicos y extractos acuosos de diferentes especies del género *Baccharis*

Del *screening* inicial de actividad antiviral (Resultados. Capítulo 1) se observó que los EO y EA de las especies *Baccharis*, *B. gaudichaudiana* y *B. spicata*, presentaban actividad antiviral frente a PV-2 y HSV-1; respectivamente. Por lo tanto, resultó interesante extender el análisis de la actividad antiviral a otras especies del mismo género. Así, se seleccionaron las especies *B. articulata*, *B. crispa*, *B. penningtonii*, *B. phyteumoides*, *B. tucumanesis* y *B. trimera*; y se obtuvieron los EO y EA de cada una de ellas, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, punto 5.

Cabe destacar que tres de estas plantas: *B. articulata*, *B. crispa* y *B. trimera*, tradicionalmente conocidas bajo el nombre de “carquejas”, están incorporadas desde el año 2006 en la Farmacopea Nacional Argentina.

Con el fin de evaluar la composición química de los extractos de cada una de estas especies, se llevó a cabo un análisis cromatográfico, por TLC, de los EO y EA obtenidos, en diferentes sistemas cromatográficos; y se los comparó con los EO y EA de *B. gaudichaudiana* y *B. spicata* (Figura 32).

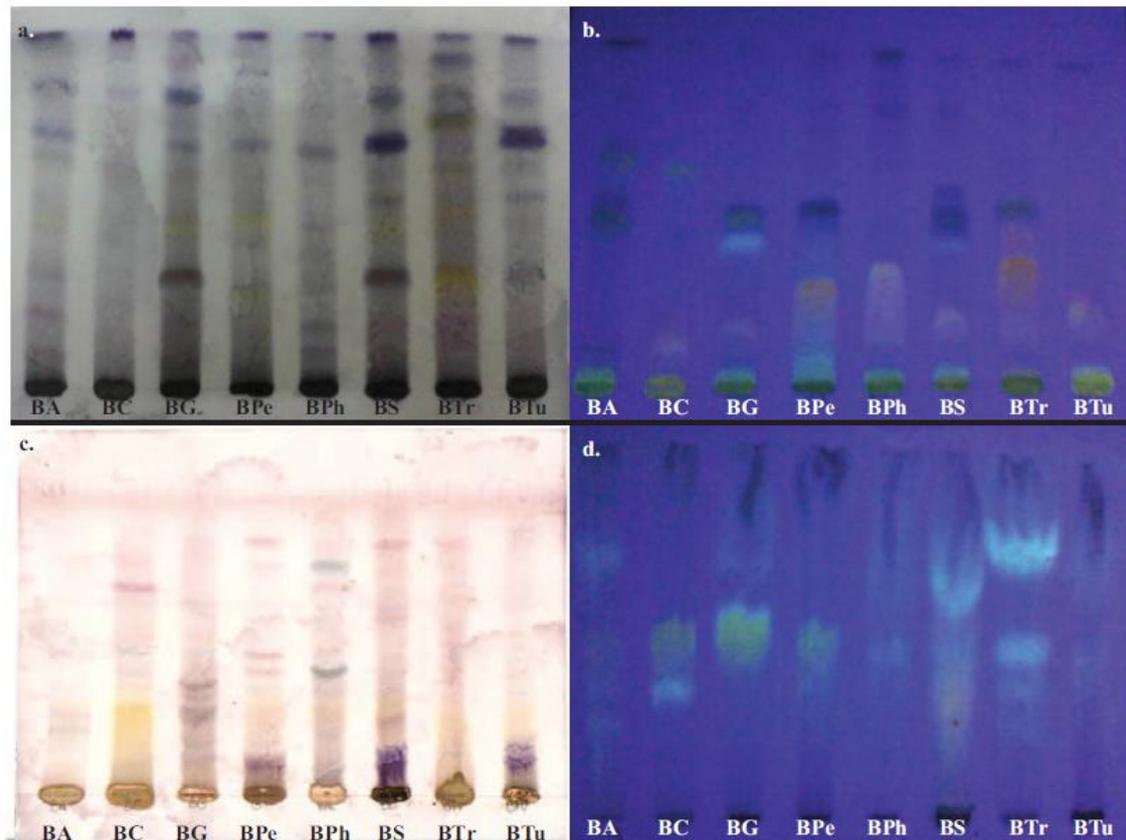


Figura 32: Análisis por TLC de los EO (a. y b.) y de los EA (c. y d.) de las ocho especies de *Baccharis*. (a.) FE: Silicagel, FM: Tolueno:acetato de etilo (5:5), revelado: AniS; y (b.) FE: Silicagel, FM: Tolueno:acetato de etilo (5:5), revelado NPR (365 nm). (c.) FE: Silicagel, FM: acetato de etilo:metanol:agua (100:10:13), revelado: AniS; y (d.) FE: celulosa, FM: AcH 15%, revelado: NPR (365 nm). BA (*B. articulata*); BC (*B. crispera*); BG (*B. gaudichaudiana*); BPe (*B. penningtonii*); BPh (*B. phyteumoides*); BS (*B. spicata*); BTr (*B. trimera*) y BTu (*B. tucumanensis*).

Si bien los perfiles cromatográficos son diferentes para cada especie, se pueden observar bandas comunes entre los EO y EA de las distintas especies; que podrían reflejar la presencia de los mismos compuestos. Luego del revelado con el reactivo NPR, tanto para los EO como para los EA, se observan bandas de color amarillo-anaranjado y azul-verdoso que suponen la presencia de compuestos del grupo de los flavonoides y ácidos cafeoilquínicos, respectivamente. Cuando se utilizó AniS como agente revelador, la aparición de bandas de color azul-violeta podría corresponderse con compuestos de naturaleza terpénica.

2. Actividad anti PV de los EO y anti HSV de los EA

La actividad antiviral de los EO de todas las especies de *Baccharis* se determinó frente a los tres serotipos de poliovirus (PV-1, PV-2 y PV-3); y la de los EA frente a HSV-1 y HSV-2 (Tabla 7 y Tabla 8).

Tabla 7: Actividad antiviral de las ocho especies de *Baccharis* frente a poliovirus.

	PV-1			PV-2		PV-3	
	CC ₅₀ (µg/ml)	CE ₅₀ (µg/ml)	IS	CE ₅₀ (µg/ml)	IS	CE ₅₀ (µg/ml)	IS
<i>B. articulata</i>	371,1 ± 1,3	46,4 ± 7,3	8,0	34,1 ± 3,1	10,9	42,2 ± 2,0	8,8
<i>B. crispa</i>	315,2 ± 6,8	24,8 ± 5,4	12,7	17,8 ± 2,3	17,7	47,3 ± 6,1	6,7
<i>B. gaudichaudiana</i>	161,0 ± 2,5	14,8 ± 1,5	10,9	7,7 ± 0,2	18,8	31,4 ± 2,8	5,1
<i>B. penningtonii</i>	82,9 ± 3,4	27,32 ± 2,32	3,0	34,4 ± 6,1	2,4	21,2 ± 3,2	3,9
<i>B. phyteumoides</i>	81,6 ± 4,3	47,0 ± 6,2	1,7	48,7 ± 5,0	1,7	47,3 ± 1,9	1,7
<i>B. spicata</i>	114,3 ± 6,7	19,3 ± 6,9	5,9	23,5 ± 4,3	4,9	28,9 ± 3,9	4,0
<i>B. tucumanensis</i>	62,9 ± 0,9	23,5 ± 2,0	2,7	24,9 ± 2,2	2,5	35,7 ± 2,1	1,8
<i>B. trimera</i>	285,2 ± 7,2	1.2 ± 0.4	239.7	1.2 ± 0.3	237.7	1.04 ± 0.2	274.2
Guanidina	> 1000	n.d.	n.d.	24,0 ± 0,6	39,8	n.d.	n.d.

Se determina la actividad antiviral por el método de reducción de placas virales (CE₅₀) y la citotoxicidad (CC₅₀) para células Vero por el método de MTS/PMS. IS = CC₅₀/CE₅₀. Se incluye la guanidina como control positivo. Los resultados corresponden al promedio ± DS (n = 3), cada vez por duplicado.

Tabla 8: Actividad antiviral de las ocho especies de *Baccharis* frente a herpesvirus.

	HSV-1			HSV-2	
	CC ₅₀ (µg/ml)	CE ₅₀ (µg/ml)	IS	CE ₅₀ (µg/ml)	IS
<i>B. articulate</i>	> 2000	117,1 ± 5,4	> 17,1	111,7 ± 6,3	> 17,0
<i>B. crispa</i>	> 2000	128,0 ± 4,3	> 15,6	149,0 ± 5,6	> 13,4
<i>B. gaudichaudiana</i>	> 2000	17,1 ± 0,02	> 116,8	20,8 ± 2,8	> 96,4
<i>B. penningtonii</i>	> 2000	32,7 ± 0,05	> 61,2	43,9 ± 6,0	> 45,6
<i>B. phyteumoides</i>	1640 ± 13	87,0 ± 3,7	18,9	101,8 ± 4,3	16,1
<i>B. spicata</i>	> 2000	34,7 ± 3,2	> 57,6	51,0 ± 6,0	> 39,2
<i>B. tucumanensis</i>	> 2000	23,0 ± 4,5	> 87,0	24,0 ± 3,7	> 83,3
<i>B. trimera</i>	1102 ± 7,0	32,8 ± 1,1	33,6	37,8 ± 1,1	29,2
Aciclovir	> 2000	0,43 ± 0,02	> 4651	0,45 ± 0,10	> 2000

Se determina la actividad antiviral por el método de reducción de placas virales (CE₅₀) y la citotoxicidad (CC₅₀) en células Vero. IS = CC₅₀/CE₅₀. Se incluye la actividad antiviral del aciclovir frente a HSV-1 y HSV-2 como control positivo. Los resultados se muestran como promedio ± DS (n = 3), cada vez por duplicado.

Los resultados obtenidos demostraron que el EO de *B. trimera* presentaba una elevada actividad antiviral frente a los tres tipos de PV, con un IS de 239,7 valor 22 superior al IS del EO de *B. gaudichaudiana*.

La evaluación de los EA de todas las especies del género *Baccharis* demostró que *B. gaudichaudiana* es la especie más activa frente a HSV-1 y HSV-2 con IS de mayores a 116,8 y 96,4; respectivamente. Otra de las especies que presentó una actividad significativa frente a ambos virus fue *B. tucumanensis* con valores de IS mayores a 87 y 83,3, respectivamente.

3. Estudio del mecanismo de acción de extracto orgánico de *B. trimera* frente a PV-2

Se continuó con el estudio preliminar del mecanismo de acción del EO de *B. trimera*. Para ello, se determinó en primer lugar, el efecto del pretratamiento de las células (Figura 33), luego la actividad virucida (Figura 34) y finalmente si el EO ejercía su

acción inhibitoria en la adsorción o en la post adsorción del virus a las células (Figura 35).

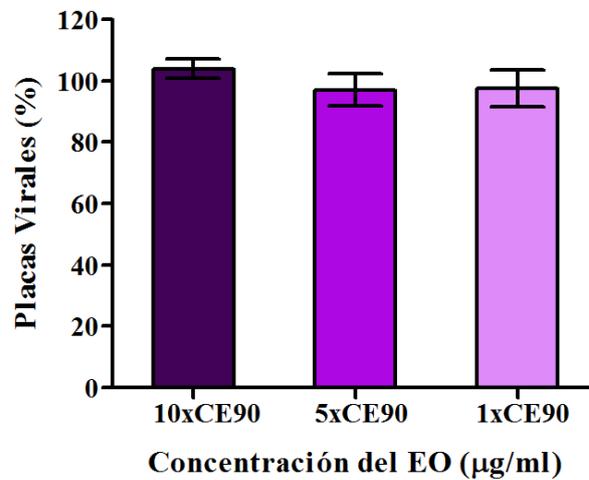


Figura 33: Efecto del pretratamiento de células Vero con el EO de *B. trimera*. Se grafica el porcentaje de placas obtenidas luego de 7 h de contacto con 1xCE₉₀ (5 µg/ml), 5xCE₉₀ (10 µg/ml) y 10xCE₉₀ (50 µg/ml) del EO con células Vero, considerando el promedio de placas obtenido en el control virus el 100%. Los resultados se muestran como promedio ± DS (n = 3), cada vez por cuadruplicado. $p > 0,05$.

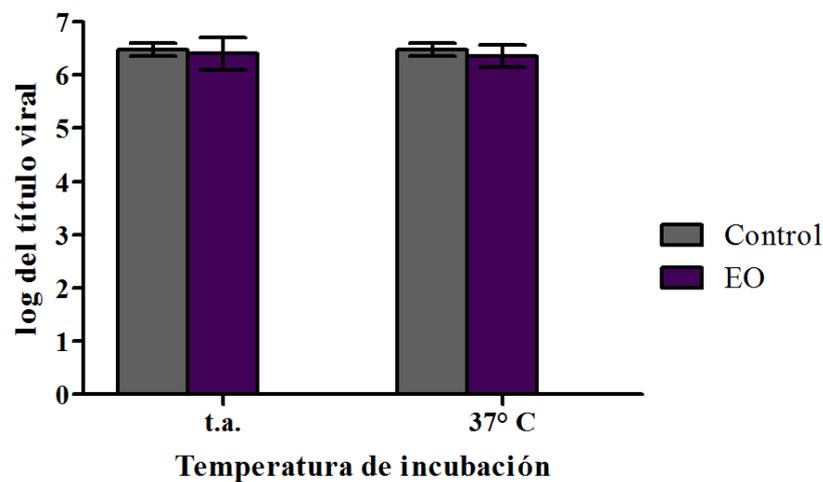


Figura 34: Actividad virucida del EO de *B. trimera* a diferentes temperaturas. Se grafica el log del título obtenido de la infectividad residual luego de 30 min de contacto con medio de infección (control) o con 10xCE₉₀ del EO (50 µg/ml) a diferentes temperaturas. Los resultados se muestran como promedio ± DS (n = 3). $p > 0,05$.

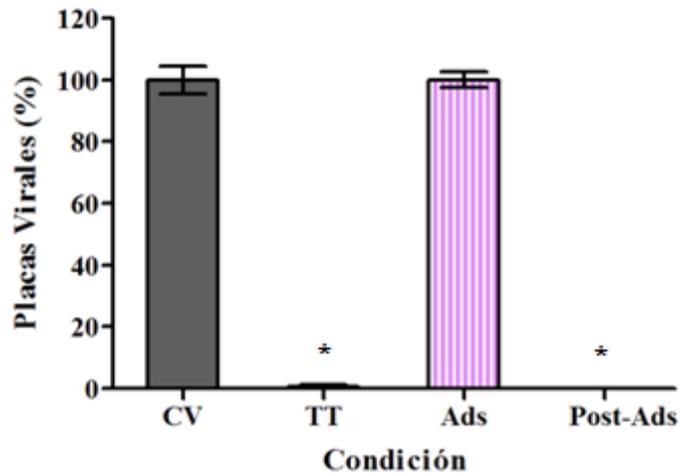


Figura 35: Efecto del EO de *B. trimerá*, sobre PV-2 a cada una de las condiciones experimentales. CV: control virus, ausencia total de extracto; TT: todo el tiempo, presencia completa de $1 \times CE_{90}$ ($5 \mu\text{g/ml}$) extracto; Ads: adsorción, el extracto estuvo presente solamente durante la adsorción; PA: post-adsorción, el extracto estuvo presente solamente durante la post-adsorción y hasta el final del período experimental. Los resultados se muestran como promedio \pm DS ($n=3$), cada vez por cuadruplicado, considerando 100 % a las placas obtenidas en CV. * $p < 0,05$ vs CV.

4. Conclusiones parciales

El análisis de los diferentes extractos de las plantas del mismo género demostró que la actividad antiviral varía según la especie analizada.

Respecto a los perfiles de TLC, se observa una amplia diversidad de compuestos presentes en las plantas así como respecto a la naturaleza química de los mismos. Con la técnica de TLC solamente se pueden apreciar la naturaleza química de los compuestos, pero debe remarcarse que diferentes compuestos pueden presentar el mismo color luego del revelado.

Se destaca de esta evaluación que el EO de *B. trimerá* emerge como un extracto con mayor actividad antiviral que el EO de *B. gaudichaudiana*. Si bien ambos extractos comparten bandas semejantes en la TLC; también hay bandas propias de cada especie.

El análisis cualitativo del EO de *B. trimerá* revela la presencia de gran cantidad de compuestos del tipo flavonoides. En la literatura no hay publicaciones sobre la actividad antiviral de esta planta ni de compuestos aislados y reportes sobre la actividad antiviral de diversos terpenoides o flavonoides aislados a partir de otras especies del género *Baccharis*. El fraccionamiento bioguiado de este extracto permitirá la identificación de los compuestos activos.

Capítulo 5

Estudio de la actividad antiviral del extracto orgánico
de *Eupatorium buniifolium* frente a poliovirus

Capítulo 5: Estudio de la actividad antiviral del extracto orgánico de *Eupatorium. buniifolium* frente a poliovirus

De acuerdo a los resultados descritos en el Capítulo 1, el EO de *E. buniifolium* fue activo contra PV-2, con un valor de $CE_{50} = 9,5 \pm 3,5 \mu\text{g/ml}$. En función de este resultado, se prosiguió con el estudio de su mecanismo de acción.

1. Mecanismo de acción del extracto orgánico de *E. buniifolium*

Con el objetivo de caracterizar preliminarmente el mecanismo de acción del EO de *E. buniifolium* se estudió, al igual que con los otros extractos, si era capaz de ejercer algún efecto en el pretratamiento, la actividad virucida y sobre las distintas etapas del ciclo viral de PV-2 (Figuras 36, 37 y 38; respectivamente).

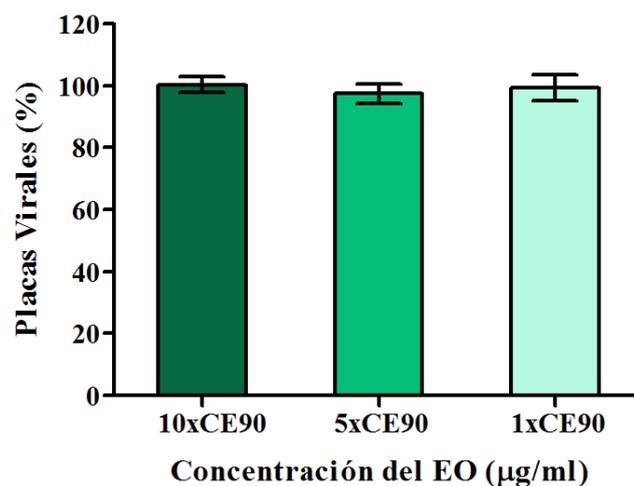


Figura 36: Efecto del pretratamiento de células Vero con el EO de *E. buniifolium*. Monocapas de células Vero fueron incubadas 7 h a 37 °C con distintas concentraciones (1xCE₉₀, 5xCE₉₀ y 10xCE₉₀, correspondientes a 20, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$; respectivamente) de EO de *E. buniifolium*. Luego de remover el medio, se realizaron tres lavados y se infectó cada monocapa con 100 UFP de PV-2. El número de placas virales obtenidas en el control virus (incubadas solamente con MI) se consideró el 100 %. Los resultados representan el promedio del porcentaje del número de placas obtenidas respecto al control, promedio \pm DS (n = 3), cada vez por cuadruplicado. $p > 0,05$.

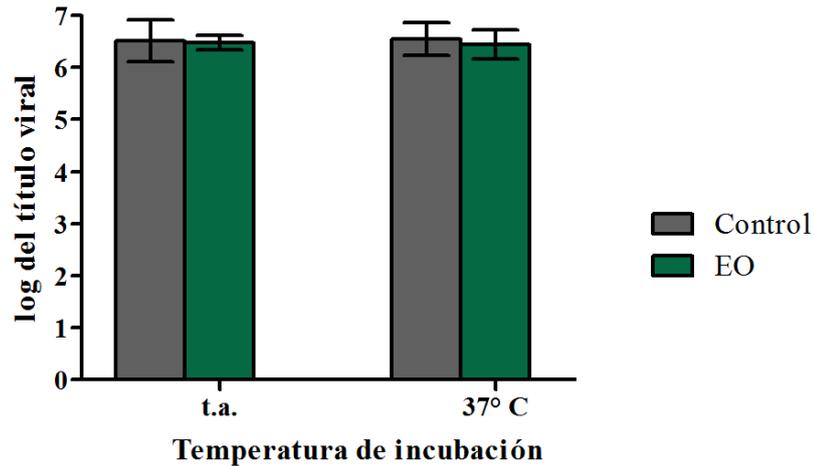


Figura 37: Actividad virucida del EO de *E. buniifolium* a diferentes temperaturas. Igual número de partículas virales infectivas de PV-2 se incubaron en MI (control) y en MI con el EO de *E. buniifolium* ($10 \times CE_{90} = 200 \mu\text{g/ml}$). Luego de 30 min de contacto a t.a. ó a 37°C , se determinó el título viral infectivo residual (UFP/ml). Los resultados representan el valor promedio del log del título infectivo residual \pm DS ($n = 3$). $p > 0,05$.

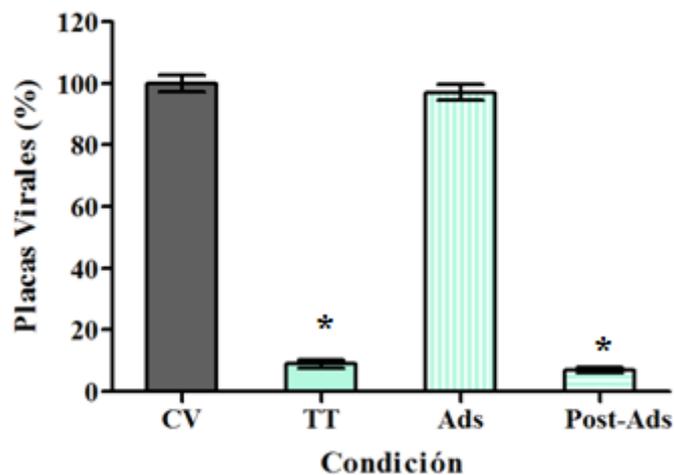


Figura 38: Efecto del EO de *E. buniifolium* sobre PV-2, en cada una de las etapas del ciclo viral. CV (control virus): incubación en MI en ausencia de extracto (100 % de placas virales); TT (todo el tiempo): medio de infección conteniendo $1 \times CE_{90}$ ($20 \mu\text{g/ml}$) del EO de *E. buniifolium*, presente durante todo el tiempo de la infección, Ads (adsorción): EO solo en el periodo de adsorción; y PA (post-adsorción): el extracto se agregó una vez finalizada la adsorción y estuvo presente durante todo el resto de la incubación. Los resultados representan el valor promedio \pm DS del porcentaje placas obtenidos ($n = 3$), por cuadruplicado cada vez. * $p < 0,05$ vs CV.

Los resultados obtenidos demuestran que el EO de *E. buniifolium* no induce un estado antiviral en las células Vero que pueda protegerlas de la infección posterior con PV-2, ni produce una inactivación de la infectividad viral el estar en contacto con las partículas virales; es decir, no ejerce una actividad virucida a ninguna de las dos

temperaturas y; finalmente, la inhibición se observa a tiempos posteriores a la adsorción del virus a la célula.

2. Fraccionamiento bioguiado del EO de *E. buniifolium*

Con el objetivo de aislar e identificar el/los compuestos activos presentes en el EO de *E. buniifolium* se llevó a cabo la preparación de un EO a escala preparativa, según lo descrito en el punto 7 (ver materiales y métodos).

En primer lugar, y previo al fraccionamiento del EO obtenido, se evaluó la actividad antiviral frente a los tres tipos de poliovirus humano, por el método de reducción de placas virales. Los valores de CE_{50} obtenidos fueron: $21,1 \pm 2,5$ $\mu\text{g/ml}$, $25,0 \pm 1,8$ $\mu\text{g/ml}$ y $23,3 \pm 3,3$ $\mu\text{g/ml}$ para PV-1, PV-2 y PV-3; respectivamente.

El EO se fraccionó por cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria silicagel 60 y eluida con diferentes solventes de polaridad creciente: Hx 100 %, Hx:AcEt (1:1), AcEt 100 %, AcEt:MeOH (1:1) y MeOH 100 %. Se recolectaron 10 fracciones de 250 ml cada una; que luego se reunieron en cinco fracciones finales (F_1 - F_5) de acuerdo a los perfiles cromatográficos.

2.1. Determinación de la actividad antiviral de las fracciones F_1 - F_5 frente a PV

Se determinó la actividad antiviral de las cinco fracciones obtenidas (F_1 - F_5) frente a PV-1. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Actividad antiviral de las fracciones F_1 - F_5 del EO de *E. buniifolium* frente a PV-1

Fracción	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IS
F_1	n.d.	> 100	n.d.
F_2	$254,2 \pm 1,2$	$13,3 \pm 2,6$	19,1
F_3	$140,8 \pm 2,7$	$27,8 \pm 1,1$	5,1
F_4	$205,1 \pm 3,4$	$19,4 \pm 1,6$	10,6
F_5	n.d.	> 100	n.d.

Se evaluó para cada fracción la citotoxicidad en células Vero y la actividad antiviral frente a PV-1 por el método de reducción de placas virales. A cada fracción se les determinó la actividad antiviral y el índice de selectividad (IS). n.d.: valor no determinado.

La fracción F_2 resultó la más activa, con una $CE_{50} = 13,3 \pm 2,6 \mu\text{g/ml}$ y un $IS = 19,1$. Estos resultados orientaron a proseguir con el fraccionamiento de esta fracción, como estrategia para el aislamiento y purificación de el/los compuesto/s activo/s.

3. Fraccionamiento y purificación de la fracción F_2

3.1. Fraccionamiento bioguiado de F_2

La fracción F_2 fue sometida a un nuevo fraccionamiento por cromatografía en columna empacada con silicagel 60 y eluida con solventes de polaridad creciente, obteniéndose 17 fracciones finales ($F_{2.I} - F_{2.XVII}$) según los perfiles de TLC.

3.2. Actividad antiviral de las fracciones de $F_{2.I} - F_{2.XVII}$

La actividad antiviral de las fracciones $F_{2.I} - F_{2.XVII}$ se determinó por el método de reducción del ECP viral frente a PV-1, a dos concentraciones fijas, 15 y 5 $\mu\text{g/ml}$. De todas las fracciones analizadas, en las fracciones $F_{2.V}$, $F_{2.VI}$ y $F_{2.VII}$ se concentró la actividad antiviral (Figura 39), con valores de reducción del ECP mayores a 75 % en ambas concentraciones. En la fracción más activa, $F_{2.VI}$, precipitó un compuesto cristalino de color amarillo, denominado compuesto **B**. El resto de las fracciones resultaron inactivas frente a PV-1.

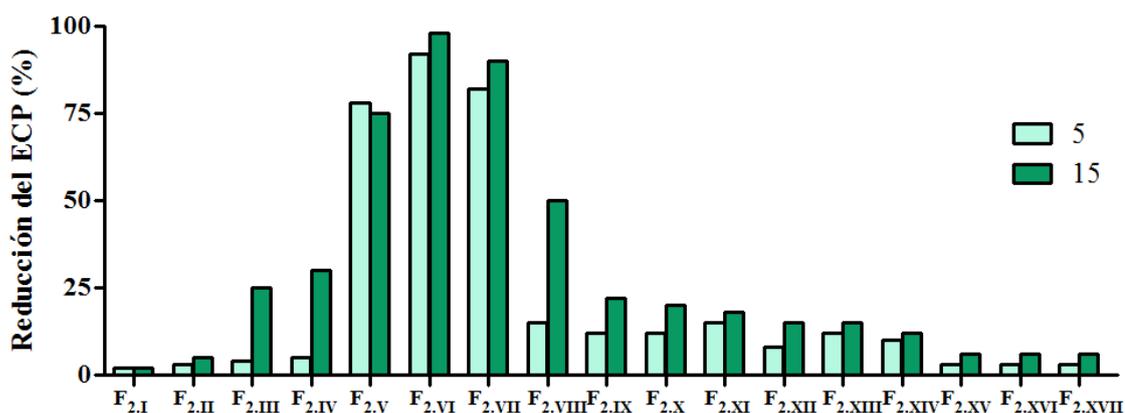


Figura 39: Actividad antiviral de las fracciones $F_{2.I} - F_{2.XVII}$ frente a PV-1. Se determinó la actividad antiviral de cada una de las fracciones por el método de reducción del efecto citopático a dos concentraciones fijas de fracción,

3.3. Aislamiento y purificación del compuesto B de las fracciones F_{2.V} y F_{2.VII}

El compuesto **B** precipitado en la fracción F_{2.VI} también se aisló de las fracciones F_{2.V} y F_{2.VII} por TLC a escala preparativa.

Para ello, 20 mg de una mezcla de las fracciones se sometió a cromatografías en placa. El compuesto **B** se identificó bajo luz UV y se obtuvo por raspado y elución con solventes. Luego se recrystalizó de acetato de etilo; hasta obtener una cantidad total de compuesto **B** de 39 mg (rendimiento 130 mg/100 g de extracto).

3.4. Determinación de la pureza e identificación del compuesto B

La pureza del compuesto **B** se determinó por TLC en dos sistemas cromatográficos diferentes y por HPLC.

En los dos sistemas cromatográficos se observó la presencia de un solo compuesto (Figura 40), sugiriendo la presencia de un compuesto puro.



Figura 40: Análisis de la pureza del compuesto B (C_B) por TLC en diferentes sistemas cromatográficos. I.- FE: silicagel 60, FM: Hx:AcEt 9:1 y agente revelador: AniS. II.- FE: silicagel 60, FM: Tol:AcEt 7:3 y agente revelador: NPR. C_B = compuesto B.

A la luz UV de 366 nm presentó fluorescencia naranja, la cual viró a un color amarillo intenso luego del agregado de vapores de amoníaco. Cuando se lo reveló con los reactivos NPR y AniS presentó una coloración naranja y verde, respectivamente.

La pureza del compuesto **B** fue luego confirmada por HPLC resultando del 95 %. La misma se calculó como el área del pico correspondiente al compuesto en relación con el área total de la corrida cromatográfica (Figura 41).

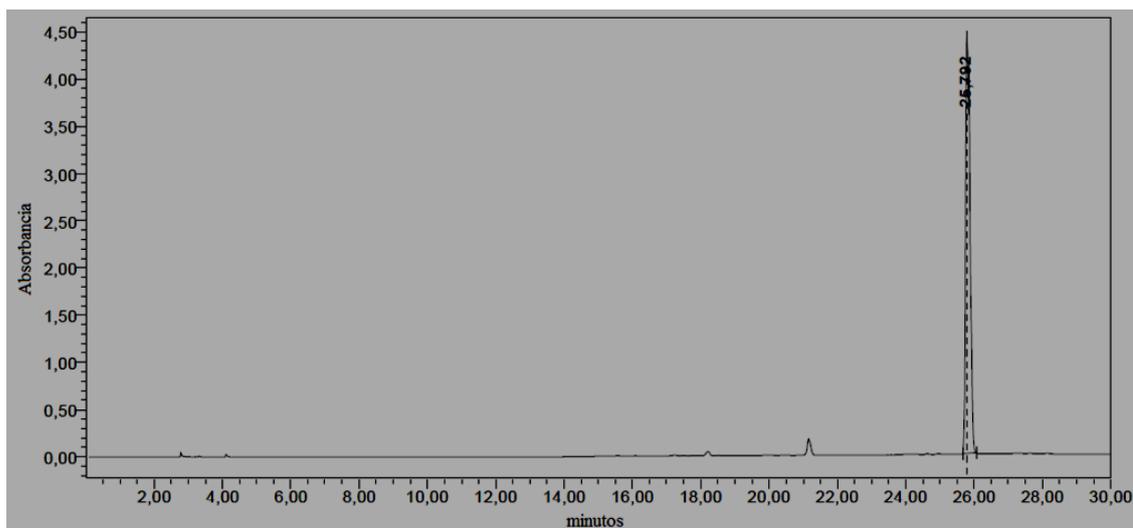


Figura 41: Análisis de la pureza del compuesto B (C_B), por HPLC. Fase móvil: gradiente de ácido trifluoracético 0,1 % (A) y acetonitrilo (B): 0-5 min: isocrático 95 % A; 5-20 min: 95 → 5 % A; 20-25 min: isocrático 5 % A; 25-28 min: 5 → 95 % A

Una vez determinada la pureza del compuesto, el mismo se identificó mediante técnicas espectroscópicas (Ver Anexos 1 a 5 correspondientes a los cromatogramas a página completa).

Los valores de los espectros obtenidos fueron los siguientes:

IR (KBr), ν_{max} (cm^{-1}): 3388 (OH), 2922, 2855, 1636 (C=COR), 1565 y 1470 (anillo aromático), 1442, 1565, 1367, 1320, 1083, 926, 886.

UV λ_{max} (nm) MeOH: MeOH: 260, 287 (sh), 300 (sh), 356; MeONa: 242, 264, 315, 386, AlCl₃: 280, 419; AlCl₃ + HCl: 266, 281 (sh), 363, 403 (sh); NaOAc: 261, 286 (sh), 300 (sh), 359; NaOAc + H₃BO₃: 261, 288 (sh), 300 (sh), 359.

¹H NMR (MeOH-*d*₄), δ (ppm): 8,18 (1H, s, H-4); 6,95 (1H, d, $J = 0.5$ Hz H3); 6,78 (1H, s, H7); 5,74 (1H, m, H11a); 5,21 (1H, m, H11b); 2,72 (3H, s, H-14); 2,14 (3H, s, H-12).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆), δ (ppm): 204,60 (s, C-13), 161,24 (s, C-8), 159,49 (s, C-6), 157,64 (s, C-2), 132,45 (s, C-5), 124,27 (d, C-4), 121,91 (s, C-9), 116,79 (s, C-10), 112,23 (t, C-11), 102,54 (d, C-3), 98,24 (d, C-7), 25,59 (q, C-14), 17,85 (q, C-12).

EI-MS (*m/z*, rel.int.): 218 (19,30), 217 (48,18), 216 (68,16) [M]⁺, 203 (2,52), 202 (16,22), 201 (100,00), 173 (26,88).

Sobre la base de los datos espectroscópicos UV, IR, MS, ¹H-RMN y ¹³C-RMN y por comparación con datos de bibliografía se identificó el compuesto **B** como el benzofurano euparina (Figura 42).

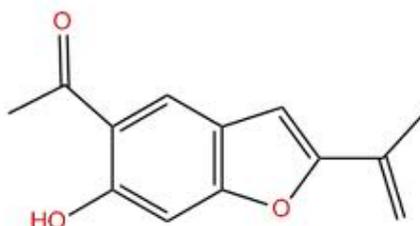


Figura 42: Estructura química de la euparina. 1-[6-Hidroxi-2-(1-metiletenil)-5-benzofuranil]etanona. C₁₃H₁₂O₃. PM: 216,23 g/mol.

4. Euparina

4.1. Actividad antiviral de la euparina frente a PV-1, PV-2 y PV-3

Una vez identificada la euparina como el compuesto activo aislado de *E. buniifolium*, se determinó la actividad antiviral frente a los tres tipos de poliovirus, PV-1, PV-2 y PV-3 (Tabla 10).

Tabla 10: Actividad antiviral de la euparina frente a los tres tipos de PV en células Vero.

	CC ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	IS
PV-1		2,1 ± 0,2	283
PV-2	596,0 ± 2,2	0,6 ± 0,2	993
PV-3		0,7 ± 0,1	851

La CC₅₀ se determinó por el método de MTS/PMS; la CE₅₀ se determinó por el método de reducción de placas virales y el IS = CC₅₀/CE₅₀. Los resultados se muestran como promedio ± DS (n = 3), cada vez por duplicado.

Si bien la euparina resultó activa frente a los tres tipos de PV, la actividad antiviral frente a PV-1 fue 3,5 y 3,0 veces menor que frente a PV-2 y PV-3, respectivamente. Sin

embargo, los IS fueron elevados y significativamente mayores que los IS obtenidos para el EO y las fracciones activas precedentes, frente a estos virus.

A partir de los resultados obtenidos, se decidió continuar el estudio de caracterización de la actividad antiviral de euparina frente a PV-2.

4.2. Actividad antiviral de la euparina aislada del EO de *E. buniifolium* vs la euparina comercial

Con el objetivo de comparar la actividad antiviral de la euparina natural aislada de *Eupatorium buniifolium* en esta tesis y la euparina comercial (Chromadex®), se evaluó la citotoxicidad y la actividad antipoliiovirus de ambos compuestos. Los resultados obtenidos corresponden a la Tabla 11.

Tabla 11: Actividad citotóxica y antiviral de la euparina natural y comercial

	CC ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)	IS
Euparina natural	596,0 ± 2,2	0,6 ± 0,2	993
Euparina comercial	603,7 ± 4,5	0,9 ± 0,3	670.8

La CC₅₀ se determinó por el método de MTS/PMS; la CE₅₀ se determinó por el método de reducción de placas virales frente a PV-2 y el IS = CC₅₀/CE₅₀. Los resultados representan el promedio ± DS (n = 3), cada vez por duplicado.

Los resultados obtenidos demostraron que la euparina comercial y la natural presentan una actividad antiviral similar. Por lo tanto, se decidió utilizar la euparina comercial en el resto de los experimentos de esta tesis.

4.3. Mecanismo de acción de la euparina

4.3.1. La euparina como un antiviral verdadero

En concordancia con los resultados obtenidos previamente con el EO de *E. buniifolium*, la euparina también se comporta como un antiviral verdadero. Es decir, la euparina no induce un efecto antiviral en las células (Figura 43); no tiene acción virucida (Figura 44) y solo interfiere en el ciclo de PV-2 en alguna de las etapas posteriores a la adsorción del virus a las células (Figura 45).

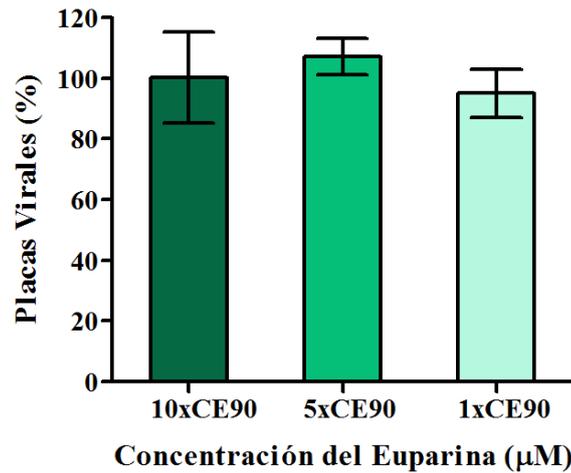


Figura 43: **Efecto del pretratamiento de células Vero con euparina.** Las células fueron incubadas durante 7 h con tres concentraciones de euparina [10x (45 µM), 5x (22,5 µM) y 1xCE₉₀ (4,5 µM)]. Finalizado el tratamiento, se removió el medio, se realizaron tres lavados y se infectaron las monocapas tratadas y no tratadas con 100 UFP de PV-2. $p > 0,05$.

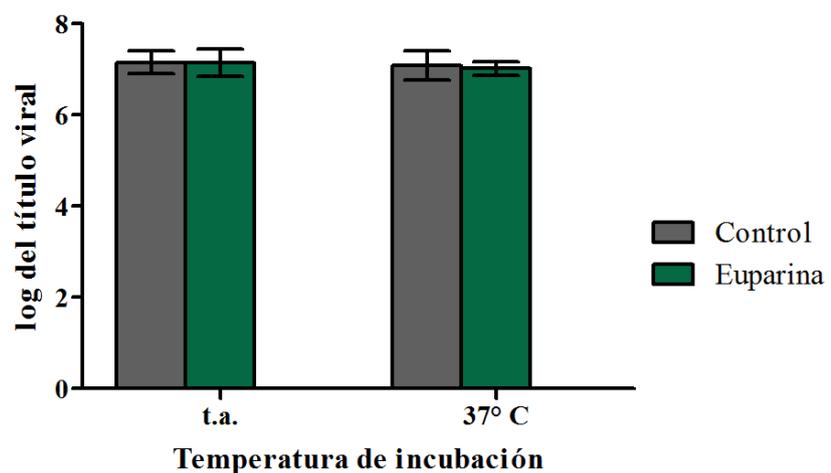


Figura 44: **Acción virucida de la euparina.** Se grafica el log del título viral midiendo la infectividad residual luego de 30 min de contacto con medio de infección (CV) o con 10xCE₉₀ del EO (45 µM) a t.a. y a 37 °C. Los resultados representan el valor promedio \pm DS de tres experimentos independientes. $p > 0,05$.

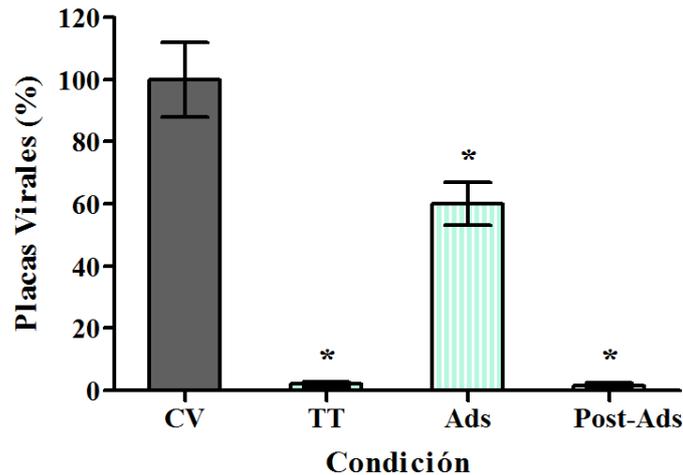


Figura 45: Efecto de la euparina sobre PV-2, en cada una de las condiciones experimentales. El porcentaje del número de placas virales obtenido para cada condición se calculó considerando el CV como el 100%. CV (control virus): medio de infección en ausencia de extracto; TT (todo el tiempo): medio de infección conteniendo 1XCE₉₀ (4,5 µM) del euparina, presente durante todo el tiempo de la infección, Ads (adsorción): el compuesto estuvo presente solamente durante la adsorción; y PA (post-adsorción): la euparina estuvo presente solamente durante la post-adsorción y hasta el final del período experimental. Los resultados representan el valor promedio ± DS del porcentaje placas obtenidos luego de tres experimentos independientes, por cuadruplicado cada vez. * p < 0,05 vs CV.

4.3.2. Estudio del mecanismo de acción de la euparina. Curva de crecimiento en un paso

Con el objetivo de determinar el efecto del agregado de euparina a distintos tiempos post-adsorción sobre la producción viral de PV-2, se infectaron monocapas de células Vero (moi: 10) a 4 °C durante 1 h para lograr la sincronización de la infección. Una vez finalizada la adsorción, se agregó euparina (tiempo 0 h p.a.), se cambió rápidamente la temperatura de incubación a 37 °C y a intervalos regulares de 1 h, se agregó euparina (Figura 46A). Se cuantificó la producción viral a las 8 h p.a. en el sobrenadante del cultivo celular. Los resultados obtenidos sugirieron que la euparina podría ejercer su acción inhibitoria durante la primera hora p.a. del ciclo de replicación de PV-2. En función de este resultado se decidió repetir estos ensayos para evaluar el efecto del agregado en el transcurso de la primera hora y a intervalos de 10 minutos (Figura 46B).

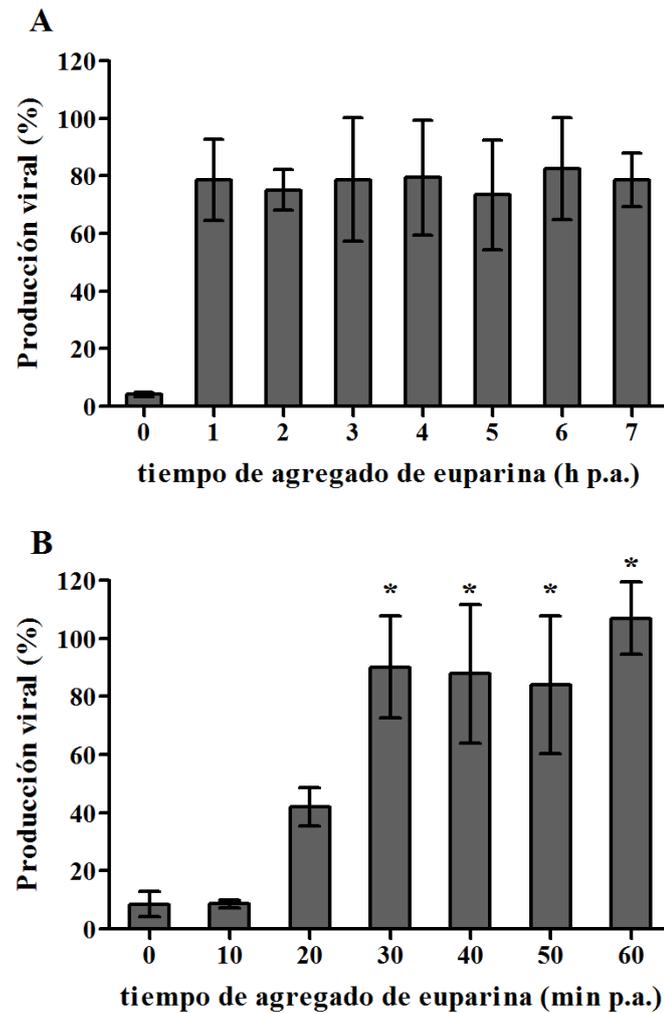


Figura 46: Efecto del agregado de euparina a distintos tiempos del ciclo viral de PV-2. Se agregó la euparina ($10XCE_{90} = 45 \mu M$) a distintos tiempos h p.a. (A) y min p.a. (B) del ciclo de PV-2. Los resultados se expresan como % de la producción viral respecto a la obtenida en el control no tratado con euparina luego de 8 h de incubación a $37^\circ C$. * $p < 0,05$ vs 0, 10 y 20 min p.a.

Los resultados obtenidos demuestran que el mayor efecto inhibitorio se obtiene cuando la euparina se agrega hasta los 10 min p.a.; por lo tanto, es probable que la acción se ejerza sobre un evento que ocurre en tiempos tempranos de la entrada del virus a la célula.

4.3.3. Estudio de la acción de la euparina en la etapa de adsorción viral

Si bien los resultados preliminares sugirieron que la euparina no interfería con la adsorción del virus a la célula, se consideró necesario abordar otra estrategia experimental que permitiera confirmar estos resultados.

Para ello, se decidió evaluar el efecto del agregado de la euparina en esta etapa mediante el ensayo de centros infecciosos.

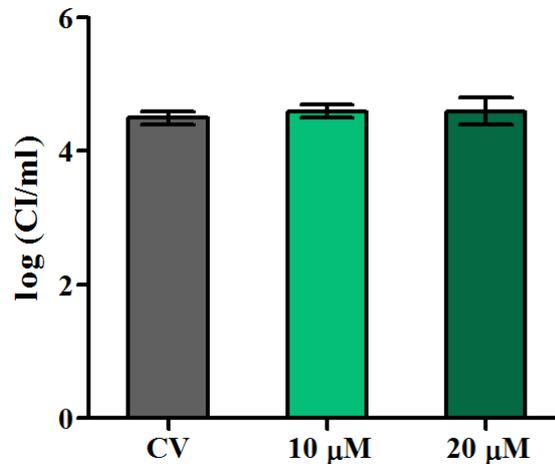


Figura 47: Efecto de la euparina en la adsorción de PV-2 a células Vero. Se evaluó la interferencia de 10 y 20 µM de euparina en la adsorción de PV-2 a las células Vero. Se determinó el número de centros infecciosos (CI) para cada una de las concentraciones como el valor promedio \pm DS (n=3), cada vez por triplicado. CI = corresponde a una placa viral que proviene de una única célula con alguna partícula de PV-2 infectiva adsorbida en su superficie. $p > 0,05$.

Como puede observarse en la Figura 47, se obtuvo un número similar de CI para el control virus y los tratados con ambas concentraciones de euparina. Estos resultados confirmarían que la euparina no interfiere en la adsorción de PV-2 a las células Vero.

4.3.4. Ensayo de penetración

4.3.4.1. Obtención del stock de PV-2 fotosensible

Dado que los resultados obtenidos permitieron descartar la acción de la euparina en la adsorción y en función de que la acción inhibitoria máxima de la euparina sobre la replicación de PV-2 se obtenía cuando se agregaba en los primeros 10 min p.a.; la euparina estaría ejerciendo su acción inhibitoria con tiempos del ciclo viral compatibles con la penetración y/o desnudamiento del genoma. Con el objetivo de abordar el estudio de estas etapas se procedió a obtener un stock de PV-2 fotosensible (PV-2 fs) mediante el cual fue posible diferenciar partículas virales que se adsorben y penetran a las células de aquellas que solamente se adsorben y no fueron capaces de penetrar al compartimiento intracelular.

El stock de PV-2 fs se preparó por pasajes sucesivos de PV-2 en presencia de rojo neutro y en oscuridad, en células Vero, de acuerdo a bibliografía (Wilson & Cooper 1963; Wilson & Cooper 1965). Al stock viral obtenido luego de tres amplificaciones en presencia de rojo neutro se le determinó la fotosensibilidad (Figura 48).

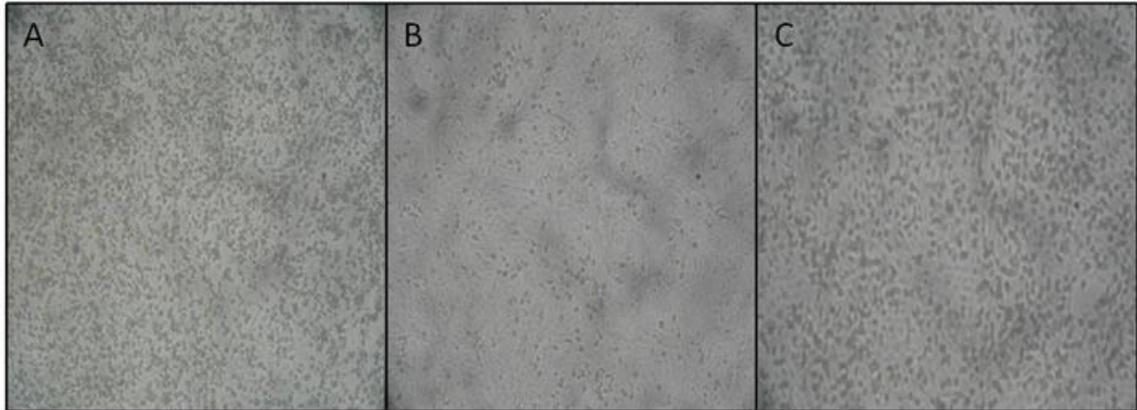


Figura 48: Fotosensibilidad del stock de PV-2 fs. Monocapas de células Vero se infectaron con PV-2 fs (MOI = 0,01) en la oscuridad bajo diferentes condiciones experimentales: **A.** incubación en oscuridad; **B.** exposición a la luz blanca 15 min inmediatamente 1 h de adsorción a 4°C y; **C.** exposición a la luz blanca durante 15 min luego de 4 h post infección. Las figuras A, B y C, son representativas del efecto citopático viral observado al microscopio óptico invertido (10X) luego de 24 h de incubación a 37 °C p.i.

El ECP observado en la Figura 48B reflejó la inactivación de la infectividad viral por acción de la luz blanca solo cuando las partículas virales PV-2 fs se encontraron en el medio extracelular (adsorbidas a receptores celulares o libres), momento en el que resultaron sensibles a la acción de la luz blanca. Por el contrario, cuando las infecciones transcurren en la oscuridad o cuando la exposición es a un tiempo en que el genoma viral ya ingreso a las células, no se afecta la infectividad viral por acción de la luz blanca (Figura 48A y C). De acuerdo con estos resultados el stock de PV-2 fs cumple con los requisitos para el ensayo de penetración.

4.3.4.2. Evaluación del agregado de euparina en una infección de PV-2 en múltiples ciclos

Con el objetivo de estudiar si la euparina podía interferir en la penetración y/o desnudamiento viral, se realizaron los siguientes ensayos utilizando el stock de PV-2 fs, obtenido previamente.

Monocapas de células Vero se infectaron con 100 UFP de PV-2 fs a 4 °C. Pasada la etapa de adsorción, la incubación continuó a 37° C para permitir la progresión del ciclo

viral (penetración/desnudamiento) y se agregó euparina cada 10 min durante la primera hora p.a.. Las monocapas celulares se incubaron 2 h adicionales a 37 °C, para permitir la progresión del ciclo viral y luego se expusieron a la luz blanca (15 min) para inactivar las partículas virales que no hubieran podido penetrar. Luego, las placas se incubaron durante 24-48 h a 37 °C. Finalizada la incubación se fijaron las células, se tiñeron y se realizó el recuento de las placas virales obtenidas para cada tiempo. Los resultados corresponden a la Figura 49.

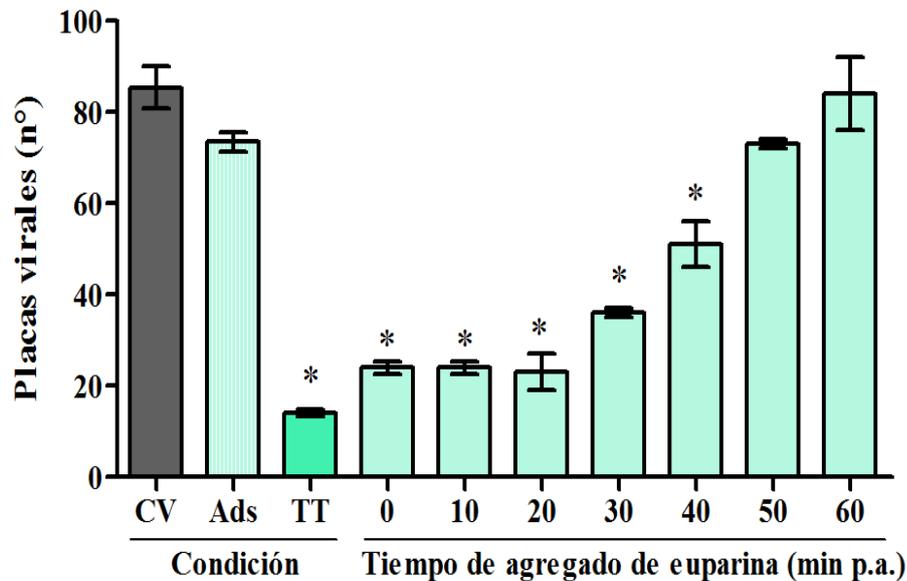


Figura 49: Efecto del agregado de euparina en el ciclo viral de PV-2 fs. La euparina (5 μ M) fue agregada a diferentes tiempos (p.a.) (min) durante la primera hora del ciclo de un stock de PV-2 fs en oscuridad. Luego de 2 horas de incubación a 37°C, las monocapas celulares fueron expuestas a la luz para inactivar las partículas virales que no hayan ingresado a las células. El control virus (CV) corresponde a monocapas celulares infectadas en ausencia de euparina; un control de adsorción (Ads): la euparina estuvo presente solo en la adsorción; y un control de todo el tiempo (TT): la euparina estuvo presente todo el período experimental. Cada valor representa el número de placas virales obtenidas en cada condición, promedio \pm DS (n=2) cada vez por duplicado. * $p < 0,01$ vs CV.

Los resultados obtenidos en estos experimentos confirman los resultados observados en la curva de producción en un ciclo, confirmando que el efecto inhibitorio de la euparina resulta máximo hasta los 20 min p.a.

4.4. Obtención de mutantes de PV-2 resistentes a euparina

El estudio de la resistencia a un antiviral es importante para la caracterización del mismo. La selección de mutantes resistentes a un antiviral representa una estrategia para

abordar el estudio del mecanismo de acción y la identificación del blanco viral. En consecuencia y con el objetivo de evaluar la probabilidad de emergencia de resistencia a la euparina, se planteó: 1.- Determinar la frecuencia de mutantes resistentes naturales en la población viral original, 2.- Seleccionar variantes resistentes a la euparina y 3.- Caracterizar biológica y molecularmente esas cepas resistentes.

4.4.1. Frecuencia natural de resistentes a euparina en un stock de PV-2 wt.

Dado que PV-2 es un RNA virus, un stock de PV-2 estará conformado por una mezcla de variantes virales cuyos genomas difieran en por lo menos un nucleótido, es decir que resulten genéticamente heterogéneas pero altamente relacionadas (cuasiespecies). En esa estructura genética poblacional de cuasiespecies podrán estar presentes en baja proporción variantes que pueden no ser susceptibles a la euparina. La frecuencia natural de variantes resistentes (FNR) es la cantidad relativa de variantes del total, capaces de replicar igual en presencia y ausencia de euparina, en una población de virus no expuesta previamente al compuesto.

Para tal fin, se determinó el título infectivo del stock de PV-2 original en ausencia y presencia de distintas concentraciones (10, 20, 30 y 40 μM) de euparina.

Los títulos obtenidos corresponden a la Tabla 12.

Tabla 12: Frecuencia Natural de variantes Resistentes a la euparina

Euparina (μM)	Título viral (UFP/ml)	FNR
0 (control)	$4,1 \times 10^6$	----
10	$3,0 \times 10^3$	0,07
20	$1,0 \times 10^3$	0,02
30	$1,4 \times 10^3$	0,03
40	$2,1 \times 10^3$	0,05

Monocapas celulares se infectaron con diluciones seriadas (-1 a -4) de un stock viral de alto título PV-2 wt (2×10^7 UFP/ml) en ausencia y presencia de MP suplementado con 10, 20, 30 y 40 μM de euparina. Luego de 36-48 h de incubación a 37 °C, se fijaron y tiñeron las monocapas celulares y se hizo el recuento de placas virales formadas. Se determinó la Frecuencia Natural de variantes Resistentes (FNR) como la relación entre el título infectivo de PV-2 en ausencia de euparina (control = 0 μM) y en presencia de diferentes concentraciones de compuesto.

Los resultados obtenidos mostraron que la FNR fue $< 0,1$ % (rango: 0.02-0.07) en todas las concentraciones evaluadas. Estos resultados muestran la preexistencia en baja proporción de variantes de PV-2 resistentes a la euparina.

4.4.2. Selección de clones PV-2 resistentes a euparina. Caracterización fenotípica de susceptibilidad a la euparina

Se seleccionaron 25 placas virales perfectamente aisladas en células infectadas en presencia de altas concentraciones de euparina.

La placa viral obtenida fue resuspendida en 0.5 ml de MI y se evaluó su susceptibilidad frente a la euparina (Tabla 13).

Tabla 13: Caracterización de la susceptibilidad a la euparina de los clones seleccionados.

N° de placa	[Euparina] (μM)	Título -E (UFP/ml)	Título +E (UFP/ml)	Relación +E/-E	Fenotipo
1	10	$5,5 \times 10^3$	$7,5 \times 10^3$	1,4	R
2	10	$1,1 \times 10^4$	$1,9 \times 10^2$	0,02	S
3	10	$4,2 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	0,5	R
4	10	$2,8 \times 10^4$	1,0	3×10^{-4}	S
5	20	$8,0 \times 10^3$	ECP difuso	-	R
6	20	$3,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^3$	0,7	R
7	20	$1,5 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$	20	D
8	20	$3,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	0,9	R
9	20	$4,5 \times 10^3$	32	7×10^{-3}	S
10	20	$4,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^2$	0,03	S
11	20	$3,0 \times 10^2$	1,0	3×10^{-3}	S
12	30	$8,0 \times 10^3$	1,0	1×10^{-4}	S
13	30	$1,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	1,3	R
14	30	$1,9 \times 10^4$	$3,8 \times 10^2$	0,02	S
15	30	$1,9 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$	0,5	R
16	30	$2,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	0,5	R
17	30	$6,1 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$	1,0	R
18	30	$9,0 \times 10^2$	1,0	1×10^{-3}	S
19	40	$4,0 \times 10^2$	$6,5 \times 10^3$	16,3	D
20	40	$1,4 \times 10^3$	$3,6 \times 10^4$	25,7	D
21	40	$1,3 \times 10^5$	$9,2 \times 10^4$	0,7	R
22	40	$3,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	0,5	R
23	40	$2,7 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	0,5	R
24	40	$1,0 \times 10^3$	$5,7 \times 10^2$	1,3	R
25	40	$4,9 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	0,6	R

Los títulos obtenidos en presencia de euparina (Título +E), en ausencia de euparina (Título -E); y el fenotipo resultante: S (sensible); R (resistente); o D (dependiente).

Los resultados obtenidos permitieron observar la coexistencia de variantes con diferentes fenotipos frente a la euparina. Entonces, se obtuvieron clones que se calificaron como sensibles (S), otros como resistentes (R) y algunos, inesperadamente,

como dependientes (D). Este patrón de fenotipos reflejaría la composición heterogénea del stock original.

De las 25 placas seleccionadas, 8 placas se categorizaron como S (32 %), 14 R (56 %) y 3 placas como D (12 %).

4.4.3. Clonado biológico de clones de PV-2 resistentes y dependientes a euparina

De las 25 placas virales aisladas, o clones biológicos, descritas se seleccionaron cuatro de ellos para ser caracterizados biológica y molecularmente: C13 (R), C17 (R), C19 (D) y C21 (R).

A cada clon se le realizó tres clonados biológicos sucesivos (Cn.1 a Cn.1.1.1) y finalmente una amplificación en frasco de cultivo T25 con monocapas de células Vero (PV-2-D13/19 y PV-2-R17/21). En cada uno de los pasos de clonado biológico, se tituló por reducción de placas en presencia y ausencia de euparina, para confirmar el fenotipo (Tabla 14).

Tabla 14: Determinación del título viral obtenido con los clones seleccionados en presencia (+E) y ausencia (-E) de euparina.

Clones virales	Título +E (UFP/ml)	Título -E (UFP/ml)	Relación E+/E-	Fenotipo
C13	1,0 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴	1,3	R
C13.1	1,3 x 10 ⁴	2,2 x 10 ⁴	0,6	R
C13.1.1	1,0 x 10 ⁴	9,8 x 10 ³	1,0	R
C13.1.1.1	1,3 x 10 ⁴	9,7 x 10 ³	1,4	R
PV-2-D13	3,4 x 10 ⁶	< 10	> 3,1 x 10 ⁵	D
C17	5,9 x 10 ⁴	6,1 x 10 ⁴	1,0	R
C17.1	2,2 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	1,5	R
C17.1.1	5,5 x 10 ⁴	5,8 x 10 ⁴	0,9	R
C17.1.1.1	9,0 x 10 ⁴	1,4 x 10 ⁵	0,6	R
PV-2-R17	3,9 x 10 ⁶	4,4 x 10 ⁶	0,9	R
C19	6,5 x 10 ³	4,0 x 10 ²	16,3	D
C19.1	1,1 x 10 ⁴	1,1 x 10 ³	10,0	D
C19.1.1	3,5 x 10 ⁴	1,2 x 10 ³	29,2	D
C19.1.1.1	2,1 x 10 ⁶	3,3 x 10 ⁴	63,6	D
PV-2-D19	8,3 x 10 ⁶	6,5 x 10 ³	1277	D
C21	9,2 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁵	0,7	R
C21.1	2,2 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁴	1,5	R
C21.1.1	1,0 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵	0,8	R
C21.1.1.1	6,8 x 10 ⁴	7,5 x 10 ⁴	0,9	R
PV-2-R21	4,9 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁵	1,5	R

Se determinó el título viral para cada uno de los clones seleccionados, los clones obtenidos durante el procedimiento de clonado biológico y su posterior amplificación. Se determinó además la relación entre títulos y el fenotipo resultante: D (dependiente) o R (resistente). S/C: sin crecimiento viral.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que todos los clones provenientes C19 mantuvieron el fenotipo dependiente; mostrando un incremento en la capacidad replicativa de más de 3 log en presencia de euparina respecto al título viral obtenido en ausencia de euparina.

Sin embargo, para el C13, inicialmente resistente, luego de los 3 pasajes sucesivos y la amplificación final con la obtención de PV-2-D13, el fenotipo cambio de resistente a dependiente.

La purificación de los otros dos clones, C17 y C21, y la evaluación de la estabilidad del fenotipo mostraron que en ambos casos, se mantenía la resistencia a la euparina.

4.4.4. Caracterización de la variante dependiente a euparina PV-2-D19

La detección de variantes dependientes fue un hallazgo inesperado, y fue de interés poder caracterizar esta dependencia.

4.4.4.1. Relación de la capacidad replicativa de PV-2-D19 con la concentración de euparina

Si bien, la FNR de PV-2 a la euparina resultó similar para las cuatro concentraciones evaluadas (10, 20, 30 y 40 μM); siendo estas concentraciones muy elevadas, se quiso determinar si la dependencia era proporcional a la concentración de euparina presente. Se estudió la formación de placas virales de PV-2-D19 en presencia de distintas concentraciones de euparina. Los resultados se muestran en la Figura 50.

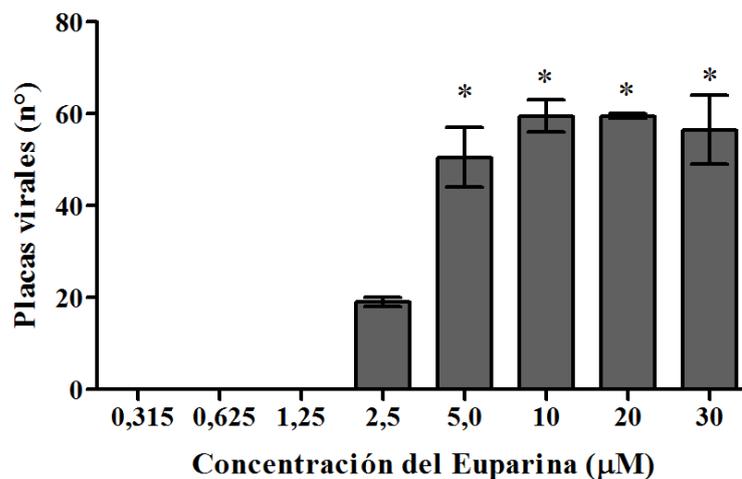


Figura 50: Formación de placas virales de PV-2-D19 a diferentes concentraciones de euparina. Monocapas de células Vero se inocularon con 100 UFP/pocillo de PV-2-D19 en presencia de diferentes concentraciones de euparina (μM). Los resultados representan el valor promedio \pm DS del número placas virales obtenidas a cada concentración ($n = 2$), por triplicado cada vez. * $p < 0,01$ vs 0,315; vs 0,625; vs 1,25 y vs 2,5.

Como puede observarse (Figura 50), el número de placas virales alcanza el máximo a 5 μM de euparina y se mantiene constante independientemente de la concentración de la droga, sin diferencias significativas entre el número de placas obtenidas a las concentraciones de 5, 10, 20 y 30 μM .

4.4.4.2. Termoestabilidad de la variante dependiente

En función de datos bibliográficos que describen una mayor estabilidad a la acción del calor de PV-2 wt y de variantes dependientes en presencia de compuestos que pudieren unirse a la cápside viral, se decidió estudiar la termoestabilidad de la variante PV-2-D19 respecto a PV-2 wt. Para ello, 10^7 UFP/ml de PV-2-D19 o de PV-2 wt se incubaron en presencia de 5 μ M euparina durante 30 minutos a 37 °C o 48 °C. Luego, se tituló el virus residual infectivo por el método de placas virales en ausencia y en presencia de 10 μ M de euparina. Se incluyeron como controles igual número de UFP de ambos stocks incubados en MI (sin euparina) y posteriormente fueron también titulados en presencia y ausencia de euparina.

Tabla 15: Termoestabilidad de la variante PV-2-D19.

		wt				PV-2-D19			
Incubación		-		+		-		+	
T °C	Titulación	-	+	-	+	-	+	-	+
	37°C		0	55	0	50	38.5	91.9	0
48°C		99.75	99.998	94.4	99.86	>	>	>	>
		99.23	99.998	> 99.12	99.998				

Reducción de la infectividad luego de la inactivación por calor a 37 °C o a 48 °C para PV-2 wt y PV-2-D19 en ausencia o presencia de 10 μ M de euparina. Las titulaciones, en todos los casos, se realizaron tanto en ausencia como en presencia de esa misma cantidad de euparina. Se consideró el 100 % al título viral del stock utilizado para el ensayo. T °C = temperatura de incubación

Como puede observarse en la Tabla 15, la infectividad de PV-2 wt no se ve alterada por la incubación a temperaturas fisiológicas de 37 °C. La reducción observada en el título viral (aproximadamente un 50 %), en presencia de euparina corresponde a la actividad antiviral de la euparina. Sin embargo, cuando este stock PV-2 wt es incubado a 48 °C, la

infectividad se reduce en 99,75 % cuando se incuba y se titula en ausencia de euparina mientras que en presencia de euparina la inactivación resulta menor (94,4 %). Los valores de reducción de la infectividad obtenidos a esta temperatura, cuando se incuba en presencia y ausencia de euparina pero se titula en presencia del compuesto, resultan de 99,998 y 99,86 %, indicando el efecto protector de la euparina durante la incubación a altas temperaturas de PV-2 wt.

En el caso de la mutante dependiente PV-2-D19, la incubación a 37°C en ausencia de euparina, produce una reducción del 91,9 % respecto al virus original. Sin embargo, cuando se incuba esta variante en presencia de euparina, la reducción disminuye de 91,9 a 47 %; siempre titulado en presencia de euparina. Este resultado sugiere un efecto estabilizador de la euparina para PV-2-D19.

A 48°C, se observa una inactivación casi completa de todo el virus infectivo, tanto en presencia y ausencia de euparina. Por lo tanto, la inestabilidad al calor resulta significativamente mayor para la variante dependiente que para PV-2 wt.

4.4.5. Caracterización molecular de las variantes dependientes y resistentes de PV-2 a la euparina

4.4.5.1. Secuenciación de las proteínas de la cápside de PV-2 wt, PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 y PV-2-R21

Los datos experimentales obtenidos hasta el momento sugirieron que la euparina probablemente actúe por un mecanismo similar al de los denominados “inhibidores de cápside”. Por lo tanto, se decidió iniciar la caracterización molecular mediante la secuenciación del genoma viral de cada una de las variantes seleccionadas y del PV-2 wt, específicamente en la región P1 del genoma viral, que codifica las proteínas virales estructurales VP1-VP4.

Si la euparina actuara como un inhibidor de cápside, mutaciones en alguna de estas proteínas podrían ser las responsables y justificarían los fenotipos resistentes y dependientes observados.

Para la secuenciación de la proteína VP1 se siguió el protocolo descrito y aceptado por el CDC (Kilpatrick et al. 2011); mientras que la secuenciación de las demás proteínas estructurales se realizó con modificaciones de los protocolos previamente descritos en la literatura (Zhang et al. 2010). La numeración de los nucleótidos en el genoma se realizó según la numeración de la secuencia de referencia de Toyoda (Toyoda et al. 1984) (véase Materiales y Métodos). En cuanto a la numeración de los cambios de

aminoácidos asociados, el primer número describe la proteína en la cual se encuentra la mutación (VP1-VP2-VP3 o VP4) y los tres números siguientes, la posición del aminoácido mutado dentro de esa proteína.

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos y el análisis de las secuencias de las proteínas de la cápside mostró que las mutaciones asociadas a cada fenotipo se correspondieron con uno o dos cambios aminoacídicos en las proteínas. Las mutaciones halladas en las variantes estudiadas se muestran en la Tabla 16 y los alineamientos de las secuencias en la Figura 51.

Tabla 16: Mutaciones asociadas a las diferentes variantes PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 y PV-2-R21

Variante	Cambio genómico	Proteína mutada	Cambio aminoacídico
PV-2-D13	A717G	5' UTR	
	A1914G	VP3	Ile3049Met
PV-2-R17	A1363G	VP2	Thr2137Ala
	G3067T	VP1	Val1196Leu
PV-2-D19	G2632A	VP1	Ala1051Thr
PV-2-R21	A3063G	VP1	Ile1194Met

Mutaciones asociadas a las variantes dependientes y resistentes analizadas respecto PV-2 wt (Toyoda et al. 1984). La numeración de nucleótidos se considera el primer nucleótido como posición 1 se numeran sucesivamente hasta el final de la región amplificada. En la numeración de aminoácidos, el primer número corresponde a la proteína de la cápside que se corresponde, y los tres números siguientes a la posición aminoacídica dentro de esa proteína. UTR: región no traducible.

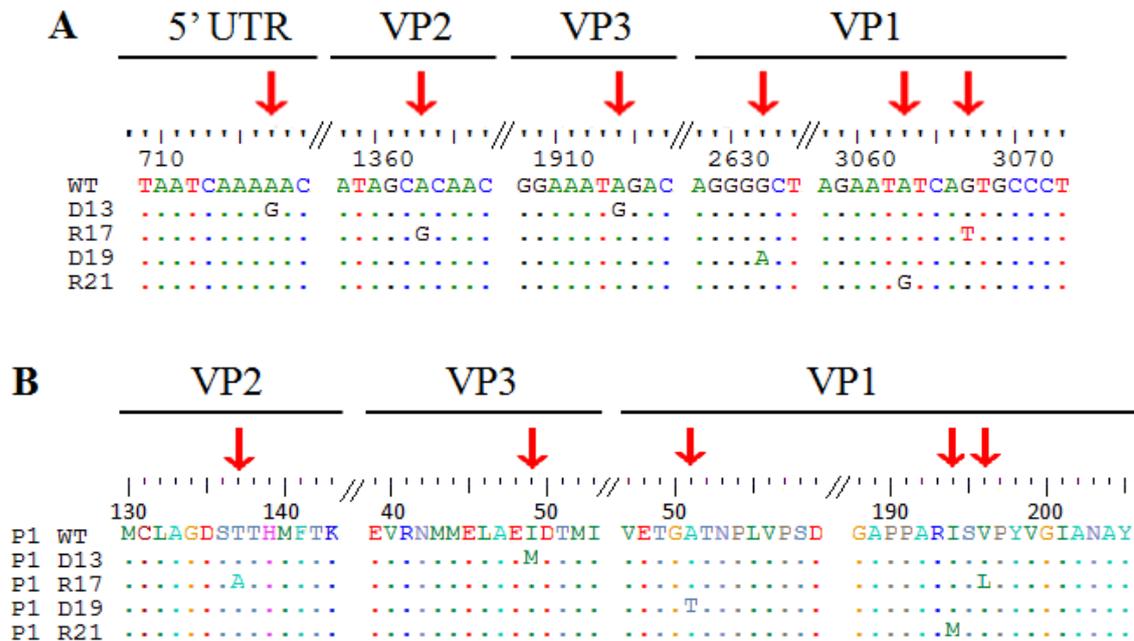


Figura 51: Alineamiento de las variantes PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 y PV-2-R21 en secuencia nucleotídica (A) y aminoacídica (B). En el análisis se incluye también la secuencia de PV-2 wt (referencia). La numeración en la figura considera números sucesivos para los nucleótidos y la posición de cada aminoácido en la proteína correspondiente. UTR: región no traducible.

Como puede observarse, en la proteína VP4 no se encontró ninguna mutación en ninguna de las variantes asociadas. Las variantes PV-2-D5 y PV-R21 mostraron solamente la VP1 mutada pero en sitios diferentes de la proteína. La variante PV-2-R17 también mostró la VP1 mutada en un sitio próximo a la otra variante resistente (2 aminoácidos de posteriores) pero también tuvo una mutación en VP2. Por último, la variante PV-2-D8 mostró la proteína VP3 mutada junto con otra mutación que se correspondía a la región de la 5'UTR. En ningún caso se encontraron mutaciones silenciosas en el genoma viral.

4.5. Obtención de revertantes

Con el objetivo de evaluar la estabilidad del fenotipo resistente y dependiente a la euparina, las variantes dependientes (PV-2-D13, PV-2-D19) y resistentes (PV-2-R17 y PV-2-R21) fueron propagadas en un ambiente libre de euparina. Se realizaron tres pasajes sucesivos e independientes de cada una de las variantes seleccionadas en células Vero (moi = 0,01 UFP/célula) a los que se denominaron (PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-

D19 o PV-2-R21)-Rev1-3, respectivamente. A cada stock viral resultante se le determinó la susceptibilidad a la euparina (Tabla 17)

Tabla 17: Determinación de la susceptibilidad a la euparina de las variantes obtenidas luego de tres pasajes en ausencia del antiviral.

Variante	Título -E (UFP/ml)	Título +E (UFP/ml)	Relación +E/-E	Fenotipo
PV-2-D13	< 10	3,4 x 10 ⁶	> 3,1 x 10 ⁵	D
PV-2-D13-Rev1	1,2 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁵	1,0	R
PV-2-D13-Rev2	9,5 x 10 ⁶	3,0 x 10 ⁵	0,03	S
PV-2-D13-Rev3	4,2 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁴	5,0 x 10 ⁻³	S
PV-2-R17	4,4 x 10 ⁶	3,9 x 10 ⁶	0,9	R
PV-2- R17-Rev1	7,9 x 10 ⁵	4,6 x 10 ⁵	0,6	R
PV-2- R17-Rev2	2,5 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁵	0,9	R
PV-2- R17-Rev3	1,5 x 10 ⁵	1,2 x 10 ⁵	0,8	R
PV-2-D19	6,5 x 10 ³	8,3 x 10 ⁶	1277	D
PV-2-D19-Rev1	3,6 x 10 ⁵	4,8 x 10 ⁷	132	D
PV-2-D19-Rev2	4,9 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁷	27	D
PV-2-D19-Rev3	6,4 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁵	0,02	S
PV-2- R21	3,3 x 10 ⁵	4,9 x 10 ⁵	1,5	R
PV-2- R21-Rev1	4,3 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵	1,2	R
PV-2- R21-Rev2	2,8 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁵	0,8	R
PV-2- R21-Rev3	4,6 x 10 ⁵	5,6 x 10 ⁵	1,2	R

Se determinó el título viral para cada uno de los stocks virales obtenidos luego de cada pasaje en ausencia de euparina (Rev1-3). Se incluye el título original de cada variante antes del proceso de reversión. Se establece el fenotipo resultante: D (dependiente), R (resistente) o S (sensible) según la relación de los títulos virales obtenidos en ausencia y presencia de euparina.

Los resultados obtenidos demostraron que para las líneas resistentes (PV-2-R17 y PV-2-R21) luego de los tres pasajes realizados en ausencia de euparina, el fenotipo resistente se mantuvo inalterado. Sin embargo, para las líneas dependientes, se observó una inestabilidad del fenotipo ya que en el primer pasaje PV-2 D13 se comportó como resistente, y en los próximos el fenotipo cambio a S; mientras que para la variante PV-2-D19 el cambio de fenotipo dependiente a fenotipo S se demuestra en el tercer pasaje.

4.6. Espectro de acción antiviral de la euparina

Con el objetivo de determinar el espectro de acción antiviral de la euparina, se evaluó la actividad de este compuesto frente a una serie de virus seleccionados con genomas de ADN y de ARN (de polaridad positiva y negativa), envueltos y desnudos, que representaran distintas familias virales con distintas estrategias de replicación. Los resultados obtenidos demostraron que la euparina no presenta actividad antiviral frente a las cepas evaluadas de HSV-1 F y adenovirus humano tipo 3 (Adv-3), ni frente a otros ARN virus no relacionados como el virus VSV cepa Indiana o DENV; ni frente a otros virus relacionados como enterovirus 71 (EV71) ni coxsackievirus B1. Estos resultados sugieren en conjunto que la euparina ejerce una acción selectiva frente a tres tipos de poliovirus humano.

5. Conclusiones parciales

A partir de un extracto orgánico de *E. buniifolium*, se aisló y purificó un benzofurano identificado como euparina, a partir de un fraccionamiento guiado por ensayos de actividad antiviral, siendo ésta la primera vez que se aísla en esta especie del género *Eupatorium*. A partir de la evaluación de la euparina como antiviral se concluye que se comporta como un antiviral verdadero capaz de ejercer una potente y selectiva actividad antiviral con elevados índices de selectividad, frente a los tres tipos de poliovirus humano. Los resultados obtenidos a partir del estudio de su mecanismo de acción sugieren que la euparina interaccionaría con la cápside viral, sin interferir con la adsorción del virus a la célula, pero sí con el desnudamiento del virus. La selección y estudio de las variantes seleccionadas en presencia de elevadas concentraciones de euparina permitió demostrar que en la población viral original de PV-2 coexisten variantes sensibles, resistentes y dependientes, previo a cualquier contacto o tratamiento con la euparina.

V – DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

V - DISCUSION Y CONCLUSIONES

Discusión

Screening de la actividad antiviral en plantas medicinales argentinas

Este trabajo de tesis se orientó hacia la búsqueda de nuevos agentes antivirales en plantas de la familia Asteraceae, la más ampliamente representada en nuestro país. Si bien ninguna de las especies estudiadas son utilizadas específicamente como antivirales, en algunos casos sus usos tradicionales podrían estar relacionadas con cuadros clínicos compatibles con infecciones virales, como *Baccharis gaudichaudiana*, que es utilizada para el tratamiento de heridas; o *Eupatorium buniifolium*, usada como desinfectante. Además, los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *E. buniifolium* habían sido evaluados previamente en nuestro laboratorio, demostrando su capacidad de inhibir la replicación de HSV-1 (García et al. 1990).

Otras plantas se incluyeron en este trabajo en base a estudios publicados previamente; por ejemplo, *Tessaria absinthioides*, cuyo aceite esencial tiene capacidad virucida frente a herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1) y al virus Junín (García et al. 2003); o *Bidens subalternans* seleccionada por los antecedentes etnofarmacológicos de otra especie del mismo género con la que se encuentra muy relacionada, *Bidens pilosa*; cuyos extractos demostraron ser activos frente a HSV (Chiang et al. 2003). Otra de ellas como, *Tagetes minuta*, fue estudiada en nuestro laboratorio, con el virus de la hepatitis B (HBV), demostrándose su capacidad de inhibir la replicación de HBV en células HepG2 2.2.15 y la expresión de antígeno S (Gagey 2012).

A partir del *screening* de actividad antiviral, con la que se inició este trabajo de tesis tres extractos resultaron los más activos y con $IS > 8$: el extracto acuoso (EA) de *B. gaudichaudiana* frente a HSV-1 y los extractos orgánicos (EO) de *B. gaudichaudiana* y *E. buniifolium* frente a PV-2.

El análisis de los resultados permitió realizar algunas observaciones generales, como el hecho de que la citotoxicidad de los EO para las líneas celulares utilizadas fue mayor que la observada para los EA. Estos resultados están de acuerdo con datos de bibliografía, que describen una mayor toxicidad de los extractos obtenidos con diclorometano de diversas especies del género *Baccharis* respecto a los EA de las

mismas plantas (Abad et al. 2006). Por otro lado, los EO resultaron más activos frente a virus con genoma ARN (PV-2 y VSV), mientras que los EA fueron activos frente a virus ADN (HSV-1 y HSV-2). Las diferencias de actividad observadas entre las especies y entre ambos extractos estarían relacionadas con las diferencias observadas en la composición cuali-cuantitativa de los metabolitos presentes en cada uno de ellos.

Teniendo en cuenta todos estos resultados, se inició un proceso de fraccionamiento bioquímico y el estudio del mecanismo de acción antiviral del EA de *B. gaudichaudiana* y de los EO de *B. gaudichaudiana* y *E. buniifolium*.

El EA de *B. gaudichaudiana* como inhibidor de HSV-1

El EA de *B. gaudichaudiana* resultó activo frente a HSV-1 y HSV-2. Si bien se disponen de antivirales aprobados para el tratamiento de las infecciones por HSV-1 y HSV-2, existe una emergencia de cepas resistentes y con resistencia cruzada a estos antivirales; especialmente en pacientes inmunosuprimidos (incluyendo pacientes trasplantados, oncológicos o infectados con HIV, entre otras) (Mundinger & Efferth 2008). En estos casos, las infecciones por herpesvirus pueden poner en peligro la vida del paciente. Por lo tanto, es necesario encontrar nuevos antiherpéticos; y de ser posible, con otro mecanismo de acción diferente al ACV y con la capacidad de inhibir dichas cepas resistentes.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo del estudio del mecanismo de acción del EA de *B. gaudichaudiana* se infiere que el efecto observado podría estar relacionado con dos posibles acciones: por un lado una capacidad virucida (Figura 12) y a bajas concentraciones una interferencia con la adsorción del virus a la célula (Figura 13). Esta última acción se deduce, a partir de haber demostrado que a 4 °C y altas concentraciones del EA, la acción virucida es casi nula. Por lo tanto, este extracto sería capaz de inhibir la replicación de HSV-1 por dos mecanismos diferentes: i.- una inactivación de las partículas virales por contacto directo (acción virucida) y ii.- impedir la adsorción del virus a los receptores celulares, en forma similar a lo descrito por Saddi et al. 2007, para este mismo virus. Estos resultados demostrarían un mecanismo de acción dual, poniendo de manifiesto la presencia de diferentes compuestos que serían responsables de ambas actividades.

Por otro lado, el EA fue capaz de inhibir cepas de HSV-1 resistentes al ACV (Figura 14), confirmando una acción inhibitoria en un blanco distinto a la enzima tirosina quinasa alterada, causa de la resistencia en la cepa HSV-1 2006 utilizada. Los EA e

hidroalcohólico de *B. erioclada* fueron capaces de inhibir a cepas de HSV-1 resistentes a ACV (cepa “29R-acyclovir strain”) (Montanha et al. 2004). Sin embargo, en dicho trabajo no se describe el mecanismo de acción por el cual *B. erioclada* es capaz de interferir con HSV-1.

Con el objetivo de avanzar en la purificación del EA, se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo (AcEt). La actividad antiviral luego de la purificación se retuvo en la fase acuosa residual (F_{Ar}), mientras que la fase orgánica de AcEt resultó inactiva. El AcEt extrae compuestos compatibles con flavonoides o ácidos hidroxycumarínicos (Krasteva et al. 2004; Stalikas 2007) que no estarían asociados a la actividad antiviral. Respecto a la naturaleza química de los compuestos activos que pudieran asociarse a las actividades observadas en la F_{Ar}, no se llegó a la identificación, ya que la caracterización de dicha fracción no fue posible.

Si bien no se aislaron e identificaron el/los compuesto/s responsables de la actividad antiviral observada, los resultados obtenidos con el EA de *B. gaudichaudiana* son promisorios. La baja toxicidad del EA acompañado de la actividad virucida observada a altas concentraciones, sugieren que esta F_{Ar} o un producto con mayor nivel de purificación podría ser útil para la formulación de un medicamento microbicida que pudiera ser eficaz para el tratamiento tópico o local de las infecciones por HSV o bien para disminuir los riesgos de transmisión de este virus.

El extracto orgánico de *B. gaudichaudiana* como verdadero antiviral. Identificación de la apigenina como uno de los compuestos activos.

El extracto orgánico de *B. gaudichaudiana* resultó activo frente a PV y a partir del análisis de su mecanismo de acción se demostró que actúa como un verdadero antiviral en alguna de las etapas de la post-adsorción del virus a las células.

Del fraccionamiento por cromatografía en columna, se obtuvieron ocho fracciones y todas presentaron actividad antiviral frente a PV-2, algunas siendo más activas que el EO original. Estos resultados sugieren que la actividad antiviral no está presente en un único compuesto, sino que varios compuestos presentes en el extracto podrían ser los responsables de la actividad anti-PV observada. Al analizar la citotoxicidad de las fracciones obtenidas, se puede observar que la distribución diferencial de compuestos también modificó la toxicidad; obteniendo fracciones más tóxicas que el EO original. Es interesante destacar que las dos fracciones (F_C y F_D) que resultaron ligeramente más

tóxicas que el EO, resultaron también las más activas, y junto con F_H , las que presentaron mayores valores de IS.

Los valores semejantes de CE_{50} de las fracciones F_C y F_D (2,1 y 2,5 $\mu\text{g/ml}$; respectivamente) sugieren la presencia de el/los compuesto/s activo/s en concentraciones similares en ambas fracciones. F_C y F_D mostraron perfiles cromatográficos tanto por TLC como por HPLC semejantes. Para ambas fracciones, en el cromatograma de HPLC (Figura 21), se observó un pico mayoritario con un tiempo de retención (Tr) cercano a los 16 min, cuyo espectro UV corresponde al de un flavonoide. Algunos estudios previos (Genovese et al. 1999; Tait et al. 2006; Savi et al. 2010) describen a distintos flavonoides como compuestos con actividad antiviral frente a diferentes virus.

El estudio del mecanismo de acción de F_C demostró que esta fracción es capaz de inhibir el ciclo de replicación de PV-2 en alguna de las etapas que ocurren antes de las 4 h post-adsorción (Figura 22B). Estos tiempos de infección se corresponderían con la etapa de crecimiento exponencial de PV-2, donde la síntesis de macromoléculas (ARN y proteínas) estaría en su máxima expresión. Estos resultados están en concordancia con estudios previos de la literatura (Savi et al. 2010; Almela et al. 1991; Salvati et al. 2004), donde se describen diferentes flavonoides, como ser el isoflavono o la 3-metilquercetina, que ejercen actividad antiviral inhibiendo el desnudamiento o la síntesis de ARN de PV-2. Nafisi et al describió la capacidad de interacción de diferentes flavonoides con moléculas de ARN (Nafisi et al. 2009). Por lo tanto, algún/os de los flavonoide/s presentes en la fracción F_C podrían estar interaccionando con el ARN viral e inhibir su replicación; observando en consecuencia, el efecto antiviral de esta planta.

Para el aislamiento y purificación de el/los compuesto/s activo/s presentes en la fracción F_C de *B. gaudichaudiana* se realizaron dos fraccionamientos independientes; uno por HPLC y otro por fraccionamiento por cromatografía en columna. A partir del primero, se obtuvo a una fracción activa (F_{C3} con un valor de $CE_{50} = 1,8 \mu\text{g/ml}$) pero con un muy bajo rendimiento que imposibilitó su posterior purificación.

A partir del segundo fraccionamiento de F_C , se obtuvieron 28 fracciones donde la mayoría de ellas presentaron actividad antiviral frente a PV-2. De una de ellas, F_{CXI} , se obtuvo un precipitado de color amarillento, P_{XI} , con un valor de $CE_{50} = 0,84 \mu\text{g/ml}$. A partir de la purificación de este precipitado, por cromatografía en columna, se aisló un compuesto que se denominó compuesto A.

Sobre la base de las características cromatográficas del compuesto A y del análisis de los espectros UV e IR se propuso que el compuesto A podría tratarse de la 5, 7, 4'-trihidroxi flavona o apigenina. Los datos obtenidos coincidieron con los encontrados en la literatura (Mabry et al. 1970) y su identidad fue finalmente corroborada por comparación cromatográfica contra una muestra auténtica (Figura 29).

La apigenina fue aislada previamente de *B. gaudichaudiana* (Fullas et al. 1994; Akaike et al. 2003; Hayashi et al. 2005) y es un flavonoide ampliamente distribuido en la naturaleza.

La apigenina ha sido evaluada previamente como antiviral resultando activa frente a diferentes virus no relacionados, hecho éste, que la ubica como un antiviral de amplio espectro. Inicialmente, fue evaluada frente al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Critchfield et al. 1996). Luego, se reportó la actividad antiviral de la apigenina frente a HSV-1 y adenovirus y una moderada actividad frente a EV71 y coxsackie B1 y actividad inhibitoria de la secreción de HBsAg y HBeAg del virus de la hepatitis B (Chiang et al. 2005). La actividad antiviral de la apigenina frente a HSV-1 (Lv et al. 2014) y EV71 (Ozçelik et al. 2011) fue nuevamente reportada en estudios más recientes. Además, la apigenina ha sido evaluada y resultó activa frente al virus de la hepatitis C (HCV) (M.-M. Liu et al. 2012; Manvar et al. 2012; Shibata et al. 2014) y frente al virus de influenza A, tanto H1N1 como H5N1 (Liu et al. 2008; Wu et al. 2010; Sithisarn et al. 2013).

Comparando el espectro UV de la apigenina con el compuesto mayoritario de la fracción F_{C3} se concluyó que la apigenina era responsable en parte de la actividad antiviral observada en F_{C3} . La actividad antiviral de la apigenina frente a PV-2 fue de $CE_{50} = 3,30 \mu\text{g/ml}$, equivalente a $12,2 \mu\text{M}$. Mientras que en el precipitado (a partir del cual fue aislada y purificada) presentó una $CE_{50} P_{XI} = 0,84 \mu\text{g/ml}$.

Estos resultados sugieren la presencia de, al menos, otro compuesto que pudiera ejercer con la apigenina, una acción aditiva o sinérgica frente a PV-2.

Tait et al. han evaluado una serie flavonoides sintéticos y naturales frente a un gran número de enterovirus demostrando que modificaciones de los sustituyentes en la molécula pueden afectar en diferente grado la capacidad antiviral de estos compuestos. Además, han demostrado que estos compuestos inhiben la replicación de los Picornavirus, previniendo el desnudamiento de las partículas y la siguiente liberación del genoma dentro de las células o bloqueando la síntesis de ARN viral (Tait et al. 2006).

Muchos otros flavonoides han sido identificados en *B. gaudichaudiana* como la hispidulina, jaceosidina, centauridina, quercetina, rutina, eupafolina, eupatilina o el isoschaftósido (Fullas et al. 1994; Akaike et al. 2003; Hayashi et al. 2005; Guo et al. 2007). La actividad antiviral de alguno de estos flavonoides o de alguno de sus derivados ya ha sido descripta.

Por ejemplo, la **quercetina** fue descripta como un flavonoide con capacidad de inhibir PV (Neznanov et al. 2008), HSV-1 (Ozçelik et al. 2011), HCMV (Cotin et al. 2012), HCV (Pisonero-Vaquero et al. 2014). El derivado metilado, la **3-metilquercetina** es un inhibidor de la replicación de PV (Castrillo & Carrasco 1987).

Otros flavonoides también presentaron actividad antiviral, la **luteolina** que inhibe la replicación del ARN viral de EV71 (Lv et al. 2014) y de coxsackie A16 a tiempos de infección correspondientes a 4 h p.a. (Xu et al. 2014), o frente al virus de influenza H5N1 e inhibe la expresión de la nucleoproteína (Sithisarn et al. 2013) y la neuraminidasa de influenza virus (Jeong et al. 2009; Liu et al. 2008). Con HCV como inhibidor de la polimerasa viral (M.-M. Liu et al. 2012; Manvar et al. 2012), o la proteasa 3C del coronavirus responsable del SARS (Ryu et al. 2010)

En cambio, la **rutina** inhibe la actividad enzimática de la proteasa 3C de EV71 y consecuentemente la replicación viral (Lin et al. 2012), y también es activa frente a HSV-1 y parainfluenza 3 (Orhan et al. 2010). La **eupafolina**, por su parte, fue capaz de inhibir a EV71 y coxsackie A16 (Wang et al. 2013).

Por lo tanto, es posible que alguno de estos flavonoides pudiera ser responsable o contribuir a la actividad observada.

Estudio comparativo de la actividad antiviral en el género *Baccharis*

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el *screening* de actividad antiviral con los extractos de las especies *B. gaudichaudiana* y *B. spicata*, resultó de interés estudiar la actividad antiviral de otras especies de este género ampliamente distribuido en nuestro país. Para ello, se agregaron las tres especies de *Baccharis* presentes en la Farmacopea Argentina, *B. articulata*, *B. crispa* y *B. trímera*; junto con otras tres especies: *B. penningtonii*, *B. phyteumoides* y *B. tucumanensis*.

Se estudió la actividad antiviral de los EO de estas plantas frente a los tres tipos de PV y de los EA frente a HSV-1 y HSV-2. La actividad antiviral observada fue diferente para cada especie. En el caso de *B. penningtonii* y *B. phyteumoides* este es el primer reporte acerca de la actividad antiviral de estas plantas.

Nuevamente, los EO resultaron más citotóxicos que los EA, repitiendo los resultados obtenidos en el capítulo 1 del *screening* de actividad antiviral.

En el caso de la actividad antiviral, no todas las especies resultaron activas frente a los virus evaluados. El análisis cromatográfico por TLC reveló la presencia de una gran cantidad de compuestos químicos pertenecientes al grupo de los flavonoides, ácidos fenólicos y compuestos de naturaleza terpénica. Si bien con una técnica como la TLC solamente se puede aproximar al tipo de compuesto presente en una muestra, no se puede negar que tanto la cantidad de compuestos químicos presentes en los extractos, como la naturaleza de los mismos, son muy amplias. Sin embargo, dado la baja sensibilidad de la técnica TLC solamente podemos inferir que dos bandas del mismo color y que aparecen a R_f semejantes, podrían corresponderse con un mismo compuesto, si bien es cierto que la banda de dicho compuesto podría estar enmascarando la presencia de otro/s compuesto/s que se desplazan igualmente en ese sistema; por lo que no se puede ser totalmente concluyente del perfil observado por TLC.

Sorprendentemente, de este análisis de las especies del género *Baccharis*, el EO de *B. trimera* emerge como un nuevo extracto promisorio, con excelente actividad antiviral frente a PV-2 y menor citotoxicidad. Esta especie ha sido ampliamente estudiada, y se han aislado diferentes compuestos: apigenina, 7,4'-di-O-metil-apigenina, cirsimarina, eupatorina, genkwanina, hispidulina, isoquercetina, luteolina, eupafolina, quercetina, 3-O-metilquercetina, 5,6-dihidroxi-7,3',4'- trimetoxiflavona y rutina (de Oliveira et al. 2013) además de bacrispina, escoparol, carquejol, pineno, sabineno, limoneno, espatulenol, entre otros (Barboza et al. 2009).

El estudio preliminar del mecanismo de acción de este EO, mostró resultados similares a los obtenidos con el EO de *B. gaudichaudiana* (Figuras 33, 34, 35). Si la apigenina es en parte la responsable de la actividad antipoliavirus de *B. gaudichaudiana*, probablemente sea la responsable de la actividad detectada en *B. trimera*. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de otros compuestos bioactivos.

Euparina: inhibidor de cápside selectivo de poliovirus aislado a partir del extracto orgánico de *E. buniifolium*

Para el fraccionamiento del EO de *E. buniifolium* se obtuvo el EO a escala preparativa. Para ello, fue necesaria una nueva recolección de la planta, que se realizó en el mismo lugar pero en épocas de recolección diferentes. El valor de CE_{50} obtenido en este nuevo EO ($25,0 \pm 1,8 \mu\text{g/ml}$) difiere significativamente del valor de CE_{50} ($9,5 \pm 3,5 \mu\text{g/ml}$)

obtenido durante el *screening* de actividad antiviral frente a PV-2. Estas diferencias pueden deberse a diferentes factores que condicionan la composición química de las plantas. La composición del suelo y la época en que se recolectaron ambas especies vegetales pueden influenciar los compuestos presentes en el EO obtenido y por consiguiente, el valor de actividad antiviral observado.

Sin embargo, a medida que transcurrió el fraccionamiento de éste nuevo EO, fue posible observar un incremento de la actividad antiviral con fracciones cada vez más activas y selectivas.

El fraccionamiento bioguiado permitió el aislamiento y la identificación de un compuesto bioactivo al que se denominó compuesto **B**. Este se presentó como un sólido cristalino amarillo que fue sometido a distintas metodologías para su identificación.

El espectro IR del compuesto B, presentó diversas bandas de absorción características a 3388 cm^{-1} (OH), 1636 cm^{-1} , (C=O) y 1565 y 1470 cm^{-1} (anillo aromático).

El espectro UV en solución metanólica presentó bandas con λ máximos de absorción a 260, 287 (sh), 300 (sh) y 356 nm. El agregado de MeONa a la solución metanólica produjo un corrimiento batocrómico de 30 nm (λ máx=386 nm) con aumento de la intensidad.

El espectro de MS exhibió un pico de ión molecular $[M^+]$ a m/z 216 (68 %), que junto con los datos obtenidos de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ permitió deducir la fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_3$. La comparación de los datos espectroscópicos del compuesto B (según lo detallado en el punto 3.4 del capítulo 5 de resultados), con los de la literatura, permitieron identificarlo como el benzofurano euparina (Siebertz et al. 1989). Si bien la euparina ya había sido aislada en otras especies del género a partir de un extracto de *E. purpureum* (Habtemariam 2001) y *E. cannabinum* (Chen et al. 2011), esta es la primera vez que la euparina se aísla de *E. buniifolium* (Visintini Jaime et al. 2013).

Este compuesto es activo frente a los tres tipos de poliovirus pero con una menor actividad frente a PV-1 que frente a PV-2 y PV-3 ($\text{CE}_{50} = 2,1 \pm 0,2$, $0,6 \pm 0,2$ y $0,7 \pm 0,1\ \mu\text{M}$; respectivamente). Es muy importante destacar su actividad frente a los tres poliovirus humanos, ya que es frecuente encontrar compuestos con actividad antiviral diferencial frente a cada tipo viral. Por ejemplo, el pleconaril, sería uno de los inhibidores de cápside, que si bien tiene valores de CE_{50} frente a PV-2 y PV-3 de $1,1 \pm 0,6\ \mu\text{M}$ y $0,22 \pm 0,15\ \mu\text{M}$ respectivamente; no es activo frente a PV-1 (De Palma, Vlieghe, et al. 2008).

Una serie de compuestos derivados de los bis-benzofuranos mostraron propiedades antivirales frente a los rinovirus (enterovirus), con un mecanismo de acción compatible con los inhibidores de cápside (Murray & Babe 1999).

Del estudio del mecanismo de acción, como los ensayos para evaluar el efecto del tiempo de adición de la euparina sobre la producción viral en condiciones de un paso, se demostró que la acción antiviral se ejercía en los primeros 20-30 min post adsorción del virus a las células (Figura 46). Los procesos tempranos que podrían estar involucrados en ese periodo del ciclo viral serían la adsorción, la penetración/desnudamiento o el inicio de la traducción del genoma viral.

La falta de acción de la euparina en la adsorción fue demostrada por dos estrategias experimentales distintas, en primer lugar se estudió la acción de la euparina en la adsorción a 4 °C y luego se analizó nuevamente esta etapa pero mediante el ensayo de determinación del número de centros infecciosos.

Si bien en el agregado de euparina durante la adsorción se observó una reducción del número de placas virales del 40 % (Figura 45), en el ensayo de los centros infecciosos se demostró que este compuesto no tiene efecto en la adsorción de PV-2 a las células Vero (Figura 47). Por lo tanto, se concluye que la reducción observada en la primera metodología podría deberse a trazas del compuesto que no fue eliminado durante el lavado.

Descartado el efecto de la euparina en la adsorción, fue de interés evaluar la etapa siguiente del ciclo viral: la penetración/desnudamiento de PV. Con este objetivo se determinó el efecto sobre la producción viral infectiva del agregado de euparina a distintos tiempos post adsorción, obteniéndose una máxima inhibición cuando la euparina se encontraba presente en los primeros 20 min p.i. (Figura 46B). Para poder diferenciar la penetración/desnudamiento del inicio de la traducción del ARN viral, se utilizó un stock de PV-2 fs, es decir, un stock obtenido en presencia de rojo neutro, de modo que las partículas de PV-2 fs están cargadas de rojo neutro, que al ser expuestas a la luz blanca se intercala en el RNA viral y lo inactivan rápidamente. Con este ensayo, todas las partículas virales que no fueron capaces de ingresar al citoplasma celular pueden ser inactivadas cuando las células se exponen a la luz blanca. De los resultados obtenidos de los ensayos realizados con el stock PV-2 fs se confirma que el tiempo de acción de la euparina es en los primeros 20 minutos post-adsorción (Figura 49) correspondientes a la etapa de la penetración y desnudamiento de la partícula viral.

Esta acción de interferencia en el desnudamiento ha sido descrita en varios de los enterovirus, incluido poliovirus, con pequeñas moléculas de distinta naturaleza química que por su mecanismo de acción se los denomina **compuestos inhibidores de cápside**. Estos compuestos desplazan al esfingolípido que se ubica naturalmente en el bolsillo hidrofóbico de la cápside viral. La interacción de estos compuestos con los aminoácidos que limitan el bolsillo hidrofóbico otorga rigidez a las proteínas de la cápside, impidiendo los rearrreglos conformacionales necesarios para la liberación del genoma viral en el citoplasma celular. Se sabe que la unión de poliovirus al receptor celular inicia una serie de cambios conformacionales que conducen a la “apertura” de la partícula. Si la euparina actúa por este mecanismo se espera que desplace al lípido conocido como “*pocket factor*” pero a diferencia de otros compuestos no interfiere con la adsorción del virus a la célula.

Como ocurre en la mayoría de los ARN virus, la polimerasa de ARN dependiente de ARN (ARNpol/ARNdep) de PV carece de la función de lectura de prueba y remoción de los nucleótidos erróneos (actividad exonucleasa 5' → 3'). Esta incapacidad de eliminar las bases incorporadas erróneamente al genoma viral contribuye a la alta tasa de mutaciones espontáneas que caracterizan a las poblaciones de ARN virus (Domingo 1997). Se ha postulado que estos virus conforman una población heterogénea de variantes genéticamente muy relacionadas, conocida como cuasiespecies, que están en un equilibrio relativo de acuerdo al ambiente en el que se encuentran (Domingo 1997; Jones & Weber 2001). En función de esta heterogeneidad genética de las poblaciones de ARN virus, se propuso evaluar si en la población de PV-2 wt estaban presentes variantes virales que sean menos susceptibles a la euparina y por lo tanto capaces de replicar en presencia del compuesto y ser seleccionadas. Además, se consideró la selección de variantes resistentes como una estrategia útil para caracterizar la acción antiviral de la droga y como herramienta que permitiera definir el blanco susceptible a la acción de la euparina.

En primer lugar se determinó la frecuencia natural de mutantes resistentes (FNR) en una población PV-2 wt que no había estado previamente expuesta a la euparina. Los valores de FNR entre 0,2 y 0,008, fueron bajos y están de acuerdo con valores reportados para otros compuestos que actúan por este mecanismo.

A continuación se seleccionaron 25 placas virales aisladas y bien definidas, que habían crecido en presencia de altas concentraciones de euparina. La caracterización biológica (determinación del título viral en presencia y ausencia del compuesto) demostró que si

bien la población de PV-2 wt no había estado en contacto previo con la euparina, el 32 % de las placas virales resultaron sensibles; el 56 % resistentes y el 12 % restante dependientes, reflejando la heterogeneidad existente en la población viral original. .

La detección de variantes dependientes resultó interesante como objetivo de estudio. Es decir, poblaciones virales de PV-2 que eran capaces de replicar eficazmente en presencia de euparina pero que lo hacían en un porcentaje significativamente menor en ausencia de la misma.

Al realizar una revisión bibliográfica se comprobó que el fenotipo dependiente para poliovirus y otros enterovirus relacionados, se había descrito para varios compuestos antivirales asociado a los denominados inhibidores de cápside.

Este fenotipo, sin embargo, también fue detectado para compuestos que actúan sobre otros blancos virales, como la guanidina que inhibe la proteína no estructural 2C de PV-2 (de la Torre et al. 1990).

Es importante remarcar que: i) la mayoría de los ejemplos de variantes dependientes entre los picornavirus, está relacionada con inhibidores de cápside; ii) la mayoría de los compuestos antivirales descritos para poliovirus y otros enterovirus actúan por este mecanismo; muy pocos compuestos interfieren con alguna proteasa o con la polimerasa viral, iii) la ecología de los enterovirus da cuenta de la elevada resistencia a compuestos químicos que deben tener estos virus para sobrevivir en el ambiente, por lo tanto en conjunto estos factores podrían contribuir a la hipótesis de que la dependencia podía tener un rol biológico mucho más importante que el que se le había adjudicado hasta el momento y podría ser un hecho emergente de la gran capacidad de adaptación de esta familia de virus.

Esta hipótesis convirtió a la dependencia a la euparina en poliovirus como un objeto de estudio en nuestro trabajo.

Con el objetivo de avanzar en este sentido, se realizaron tres pasos sucesivos de clonado biológico de algunas de las placas virales que habían sido seleccionadas en presencia de elevadas concentraciones de euparina. Los estudios de la dependencia se iniciaron con PV-2-D19, inicialmente caracterizada con fenotipo dependiente y que luego de los clonados biológicos mantenía dicho fenotipo. En primer lugar, se evaluó la capacidad replicativa de la variante en presencia de concentraciones crecientes de antiviral. Se demostró que 5 μ M de euparina son suficientes para potenciar la replicación de PV-2 en esas condiciones experimentales. No se observó la formación de placas a concentraciones muy bajas de euparina y a partir de 5 μ M hasta 30 μ M se obtuvo el

número máximo de placas virales. Se concluye entonces que una concentración de 5 μM es suficiente para que la variante alcance su capacidad replicativa máxima.

Por otro lado, estaba descrito que la presencia de compuestos que se unieran a la cápside viral, otorgaban un efecto protector a las partículas de PV salvaje frente a la acción del calor o mayor termoestabilidad y que partículas de PV dependientes a un antiviral resultaban más lábiles que PV wt frente a un aumento de la temperatura.

Se propuso evaluar la termoestabilidad de estas variantes y la capacidad estabilizadora que pudiera presentar la euparina. Al aumentar la temperatura (48 °C), las proteínas de la cápside de PV-2 wt se desestabilizarían perdiendo la infectividad. Sin embargo, al incubar a altas temperaturas las partículas de PV-2 wt en presencia de euparina, se observó una menor reducción de la infectividad (99,75 % en ausencia de euparina vs 94,4 % de reducción en presencia de la droga). Este resultado confirmaba que la euparina estaría actuando como los compuestos inhibidores de cápside, al otorgar cierta rigidez a esta estructura viral, estabilizando al virión y previniendo su inactivación por calor.

En el caso de la variante dependiente, se observó una mayor inestabilidad *per se* a temperaturas fisiológicas (37 °C). Sin embargo, en presencia de la euparina la inactivación a 37 °C nuevamente se encuentra disminuida (92 % vs 47 % de reducción de la infectividad). En este caso de la variante dependiente, se analizaron los títulos obtenidos en presencia de euparina, ya que es la condición a la cual esta variante replica más eficientemente. A altas temperaturas, 48 °C, se observa una gran inestabilidad de las partículas dependientes, no pudiendo ser recuperadas aun en presencia de euparina. Estudios previos ya han reportado una cápside altamente inestable en variantes dependientes y una rápida conversión de la partícula 160S a las partículas 135S y 80S, aun en ausencia de antiviral y/o receptor celular (Salvati et al. 2004). Un mecanismo semejante podría estar ocurriendo en esta variante dependiente estudiada en este trabajo de tesis.

Estos resultados sugieren que la euparina podría unirse a la cápside viral, siendo ésta el blanco de la actividad antiviral.

El análisis de las secuencias genómicas de PV-2 wt y de las variantes resistentes y dependientes seleccionadas se realizó en comparación con la cepa Sabin de referencia (Toyoda et al. 1984). A partir del análisis de las mutaciones presentes en las variantes dependientes y las resistentes, se observó que el cambio de fenotipo podía estar asociado a una única mutación en las variantes PV-2-D19 y PV-2-R21; o a dos

mutaciones en PV-2-D13 y PV-2-R17. A lo largo de la región analizada no se detectaron mutaciones sinónimas.

Una de las mutaciones en PV-2-D13 se localizó en la región 5' UTR, más precisamente en una de las dos secuencias espaciadoras presentes en esta región del genoma viral. En la región 5' UTR de PV-2 existen dos regiones espaciadoras, una comprendida entre los nucleótidos 89–123 y otra entre 640–742. La primera es una secuencia sin ninguna función asignada hasta el momento mientras que la segunda es una secuencia conservada en la cantidad de nucleótidos (100-104 nt) pero no en la secuencia propiamente dicha, cuya función también es desconocida (De Jesus 2007). El otro cambio en esta variante PV-2-D13, fue el cambio en la posición 49 de la VP3 de isoleucina por metionina (I3049M).

En la otra variante dependiente estudiada PV-2-D19, el único cambio detectado fue el de alanina por treonina (A1051T) en la proteína de cápside VP1.

En la secuenciación de la variante resistente PV-2-R17 fue posible detectar dos cambios de aminoácidos treonina por alanina (T2137A) y valina por leucina (V1196L), en las proteínas de la cápside viral VP2 y VP1, mientras que en la otra variante resistente, PV-2-R21, se encontró un único cambio de aminoácido en la VP1, en la posición 194, isoleucina por metionina (I1194M).

La mutación T2137A se encuentra en la superficie de la proteína VP2, en la región expuesta de la cápside. Esta región está asociada a una de las regiones variables de la proteína y se considera una de los determinantes antigénicos de poliovirus. Por lo tanto, esta mutación podría no estar asociada a la resistencia a la euparina.

Las dos mutaciones en la VP1 asociadas con la resistencia (aminoácidos 1194 y 1196) se encuentran localizadas en la misma región de la proteína, y se encuentran en la base del bolsillo hidrofóbico al cual se uniría la euparina. En ambos cambios, el aminoácido es reemplazado por un aminoácido con una cadena lateral más voluminosa, que podrían conferir una flexibilidad mayor en la lámina β de la VP1; permitiendo el desnudamiento aun en presencia del antiviral. Ambas mutaciones ya han sido descritas como lugar de mutación para la generación de variantes de PV-2 resistentes a diversos inhibidores de cápside, V-073 o 3(2H)-Isoflaveno (H.-M. Liu et al. 2012; Salvati et al. 2004) seleccionaron variantes resistentes I1194M; o para PV-3 resistente al disoxaril (Mosser et al. 1994) que seleccionó mutantes I1192F y V1194L (en este punto es válido aclarar que las mutaciones asociadas a la resistencia en PV-3 se encuentran en los aminoácidos

192 y 194 de la VP1. Sin embargo, la VP1 de PV-3 tiene una delección de dos aminoácidos respecto a PV-2 y PV-1, por lo que se trataría de posiciones equivalentes). En cuanto a las mutaciones asociadas a la dependencia se observaron tanto en la VP1 y en la VP3. La mutación encontrada en la VP1 se encuentra en un lugar diferente a las mutaciones asociadas a la resistencia. Esta mutación en la VP1 se encontró también en variantes de PV-3 resistente al disoxaril (A1049V) (Mosser et al. 1994). Al estudiar las mutaciones asociadas a la dependencia de PV-2 frente a 3(2H)-Isoflaveno; se encontró una mutación a dos aminoácidos de distancia del descrito en este trabajo de tesis: D1053S (Salvati et al. 2004). Por otro lado, la mutación encontrada en la VP3 (I3049M) también ya ha sido previamente descrita para PV-3 en presencia de disoxaril.

Se encuentran descritas tres regiones que serían puntos calientes para las mutaciones asociadas a la resistencia o a la dependencia: la pared del *canyon*, la base del bolsillo hidrofóbico y la cara interna de las proteínas de la cápside (Mosser et al. 1994). En este trabajo de tesis se observó que todas las mutaciones encontradas se ubican en alguno de estos sitios.

Para otros enterovirus también se ha demostrado la selección de mutantes resistentes y dependientes frente a inhibidores de cápside como otros compuestos con diferentes mecanismos de acción (Eggers & Tamm 1963; Heinz et al. 1989; Hadaschik et al. 1999).

La rápida selección de resistencia y la baja barrera genética observada frente a este tipo de compuestos son consistentes con la existencia de un blanco viral específico para compuestos como la euparina, capaces de interactuar y/o unirse al sitio hidrofóbico al que se une el factor lipídico.

Los pasajes de las variantes de PV-2 resistentes o dependientes sin presión del antiviral (ausencia de euparina) permitieron observar comportamientos distintos en cuanto a la capacidad de replicación de las distintas variantes, PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 y PV-2-R21.

Las variantes resistentes demostraron ser fenotípicamente más estables a lo largo de tres pasajes en ausencia de la presión del antiviral, ya que luego de los tres pasajes, ambas variantes, PV-2-R17 y PV-2-R21 conservaron el fenotipo resistente.

Por otro lado, las variantes dependientes resultaron ser menos estables a través de los pasajes. La variante PV-2-D13 mostró un cambio fenotípico a resistente luego del primer pasaje en ausencia de antiviral y, luego del segundo pasaje, resultó con fenotipo sensible. La posibilidad que una variante dependiente pudiera cambiar a un fenotipo

resistente ya ha sido previamente descrito (de la Torre et al. 1990). Por el otro lado, la variante PV-2-D19 cambió luego del tercer pasaje a sensible sin observarse un cambio a un fenotipo resistente intermedio.

Una observación que pudo realizarse de las variantes resistentes (R17 y R21) es que los títulos virales obtenidos fueron 1 a 2 log menores que los valores que se obtienen en los pasajes de PV-2 wt. Esto podría reflejar un menor *fitness* replicativo en ausencia de la euparina de las variantes resistentes comparado con el virus wt, como ha sido descrito para otras variantes resistentes (Cherwa et al. 2009).

En conjunto, los resultados obtenidos confirman el hecho de que la euparina actúe como un inhibidor de cápside, que presenta una acción selectiva frente a poliovirus humano.

La coexistencia de variantes sensibles, resistentes y dependientes a la euparina en una población que no ha sido previamente expuesta al compuesto, sugiere que poliovirus puede adaptarse rápidamente a la presencia de compuestos de este tipo, con una dinámica evolutiva de cuasispecies que le otorga la posibilidad de sobrevivir en ambientes adversos con diversos compuestos químicos que podrían inactivarlo. Por lo tanto, en lugar de inactivarlo, rápidamente lo convierte en un factor necesario para su replicación. Es importante destacar, que la evolución de variantes resistentes y dependientes luego de muy bajo número de pasajes, da cuenta de la plasticidad para el cambio de esta región denominada “*pocket hidrofóbico*” y la potencialidad que puede tener en el control de las infecciones por estos virus.

Conclusión

En este trabajo de tesis se estudió la actividad antiviral de dos extractos diferentes de ocho especies medicinales argentinas de la familia Asteraceae sobre BVDV, DENV, HSV-1, PV-2 y VSV. A partir de los resultados obtenidos en el *screening* preliminar de actividad antiviral, se seleccionó el extracto acuoso de *B. gaudichaudiana* y los extractos orgánicos de *B. gaudichaudiana* y *E. buniifolium* para su posterior fraccionamiento, para aislar e identificar los compuestos bioactivos.

De la especie *B. gaudichaudiana* se identificó el flavonoide apigenina con actividad antiviral sobre PV-2. De la especie *E. buniifolium*, se identificó el benzofurano euparina, con una significativa actividad específica sobre PV-1, PV-2 y PV-3.

Si bien no se profundizó en el estudio del mecanismo de acción de la apigenina, recientemente ha sido descrito para EV71, virus altamente relacionado con PV, que la

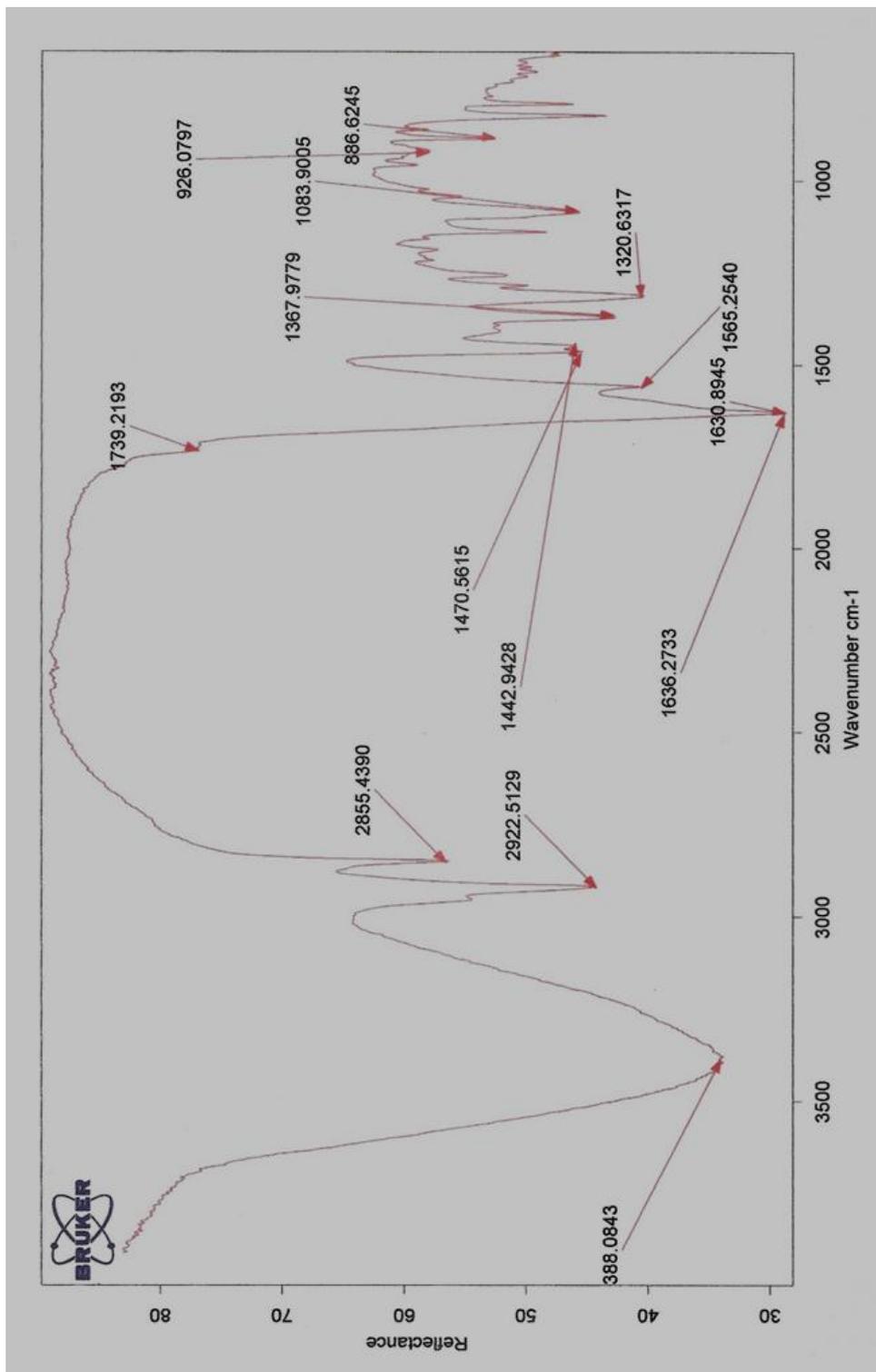
inhibición se ejerce impidiendo la interacción de proteínas del huésped que se unen al IRES y modulan la traducción del genoma viral y consecuentemente la replicación viral. La euparina por el contrario, emerge por primera vez como un inhibidor selectivo de los tres serotipos de poliovirus. La euparina actuaría como un “**inhibidor de cápside**” que inhibe la penetración/desnudamiento del virus sin afectar la adsorción del virus a la célula. En el estudio del mecanismo de acción de este compuesto se seleccionaron mutantes tanto resistentes como dependientes para la euparina. La dinámica del fenotipo de susceptibilidad a la euparina al crecer el virus en presencia y ausencia de la euparina, demuestra la capacidad de adaptación de PV a los cambios del entorno, reflejando tal vez la resistencia elevada de este virus en distintos ambientes. El desafío futuro es estudiar el fenómeno de la dependencia y la resistencia a estos inhibidores de cápside como herramientas útiles en el control de las infecciones de poliovirus y como moduladores del equilibrio de cuasiespecies presentes en la población a través del tiempo.

VI – APÉNDICE

VI – Apéndice

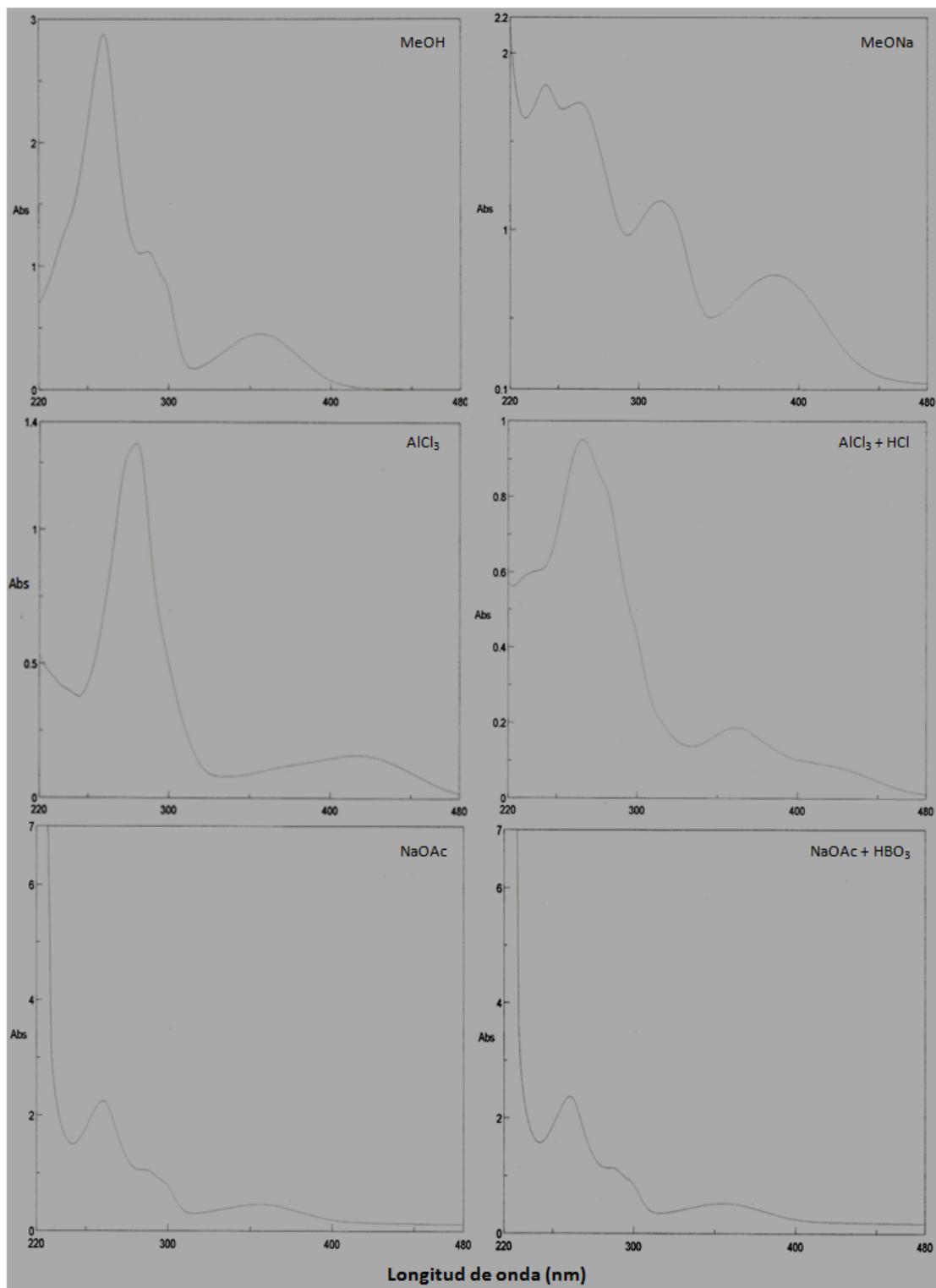
Apéndice 1

Espectro de infrarrojos de la euparina (compuesto B)



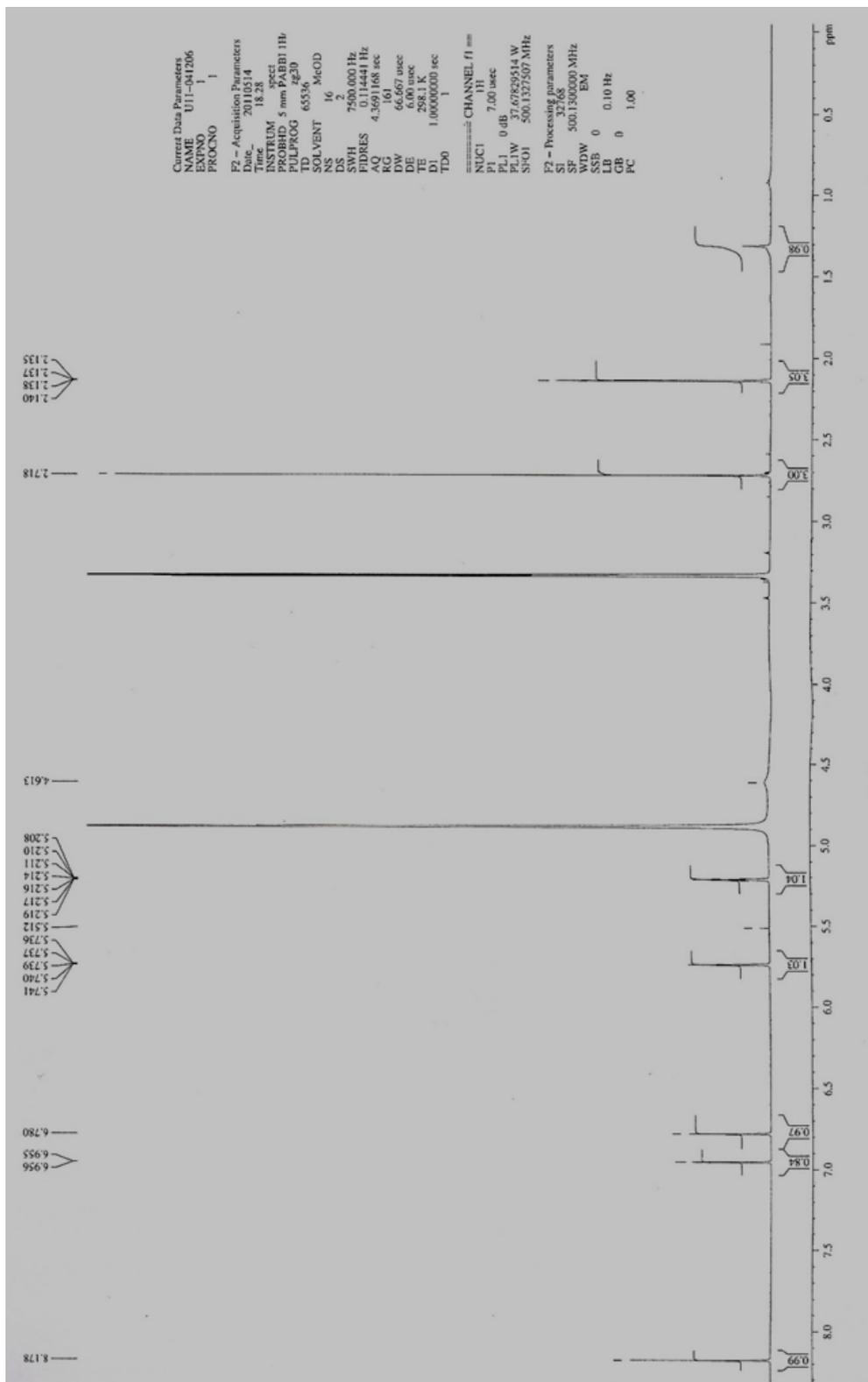
Apéndice 2

Espectro de absorción al ultravioleta de la euparina (compuesto B) y corrimientos con diferentes reactivos. MeONa: metóxido de sodio; AlCl_3 : cloruro de aluminio; HCl: ácido clorhídrico; NaOAc: acetato de sodio y HBO_3 : ácido bórico.



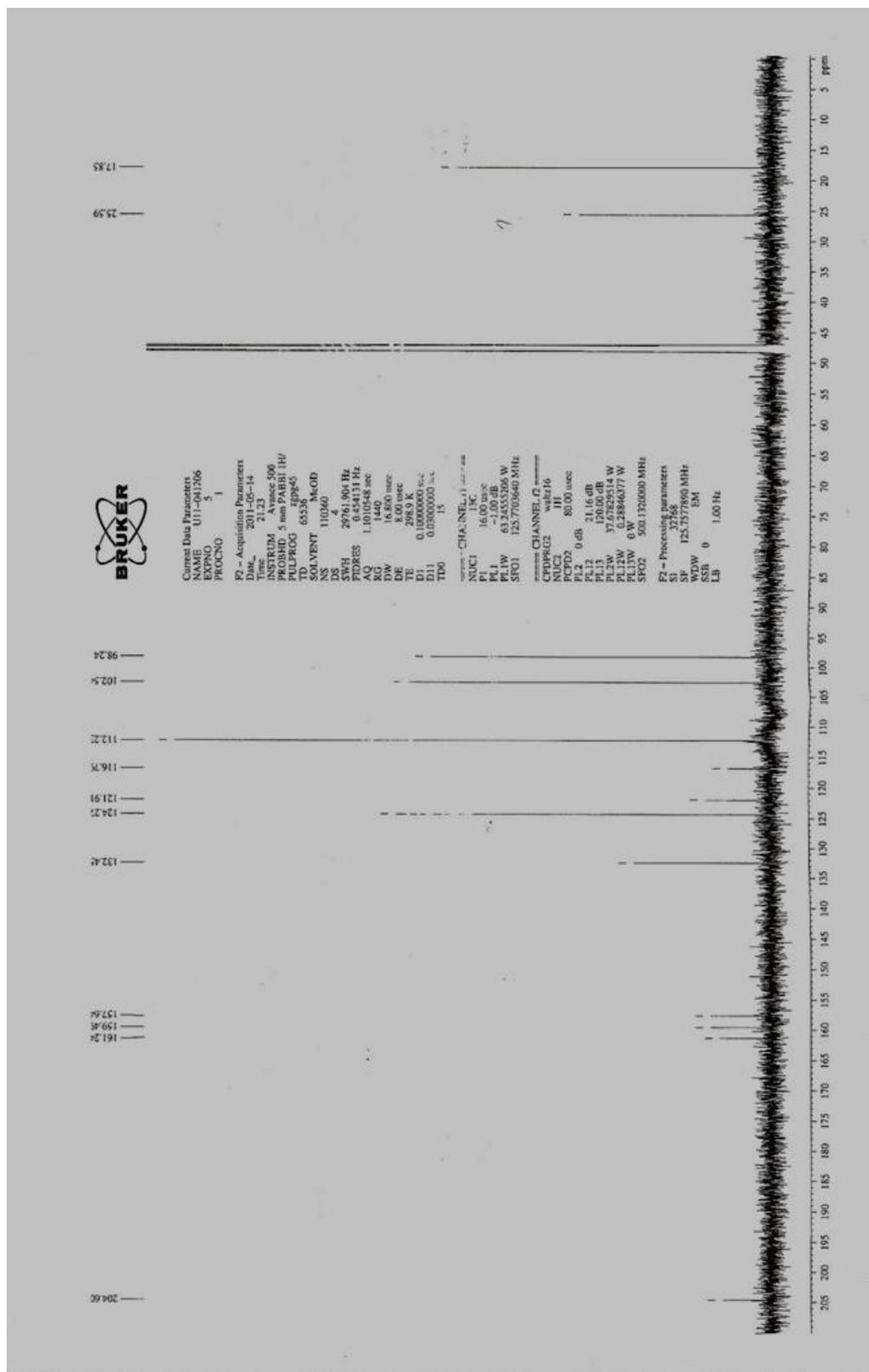
Apéndice 3

Espectro de resonancia magnética nuclear del hidrógeno (^1H -RMN) de la euparina (compuesto B).



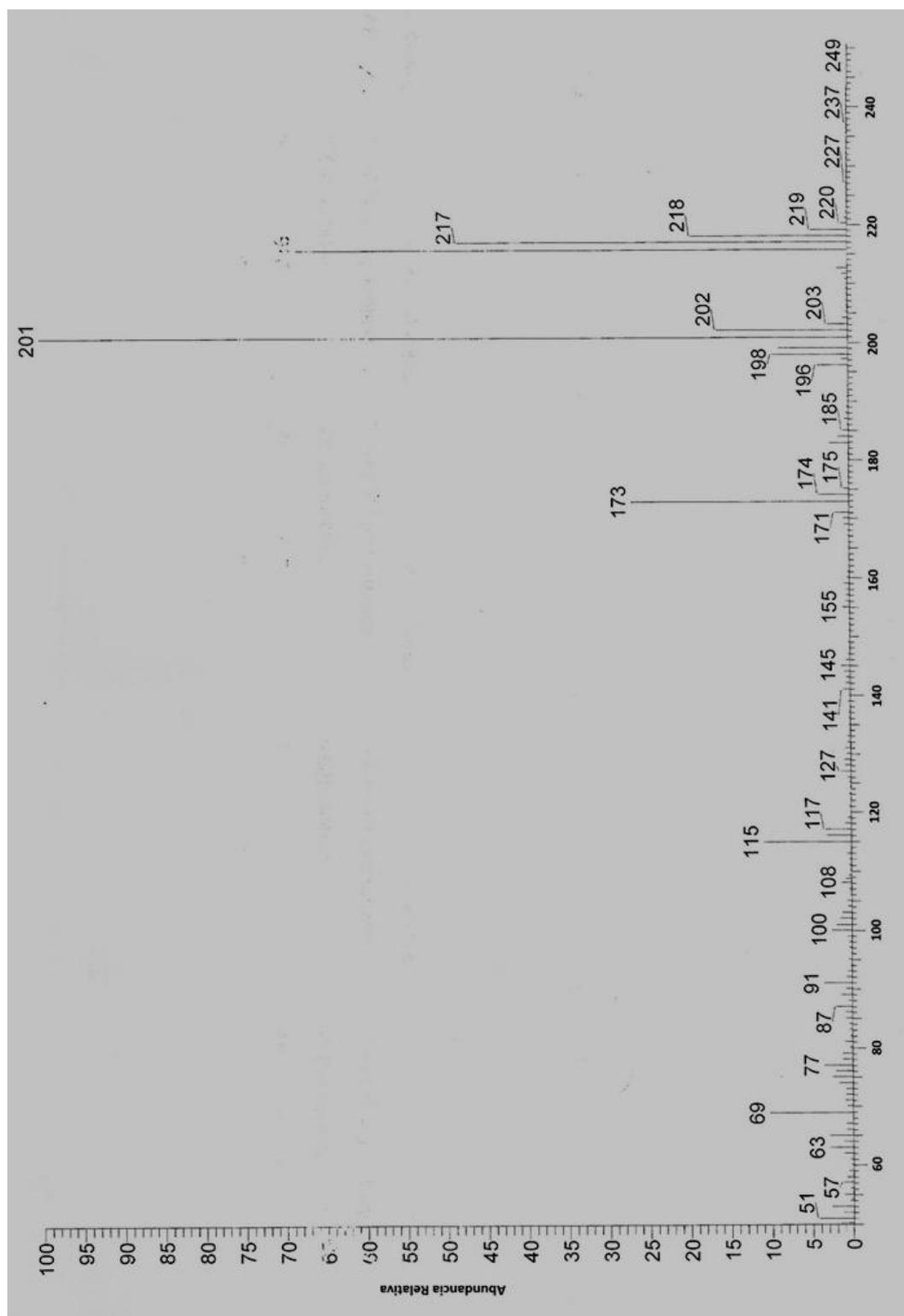
Apéndice 4

Spectro de resonancia magnética nuclear del carbono (^{13}C -RMN) de la euparina (compuesto B).



Apéndice 5

Espectro de masa de la euparina (compuesto B).



Apéndice 6

Lista de los cebadores sentido (S) y antisentido(AS) utilizados durante el desarrollo de esta tesis para las reacciones de retrotranscripción y amplificación por PCR de la región codificante de las proteínas de cápside (P1) de PV-2. Las secuencias de los cebadores se encuentran en sentido 5'-3'. Se indica la posición a la que se unen en el genoma de PV-2 cepa Sabin (GenBank accession n° X00595.1).

Cebador	Secuencia	Posición en el genoma
Reacción de RT		
Q8 (AS)	AAGAGGTCTCTRITCCACAT	3484-3503
Reacción VP4/VP2		
EV-PCR2 (S)	TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCC	446-470
2031A (AS)	GGACAACGAGAGACACAAGAT	2011-2031
Reacción VP3		
1110S (S)	TGGAATTGGCGGAAATAGAC	1898-1917
2841A (AS)	GCGTCTCAGTTGAACAGTATCTTTG	2817-2841
Reacción VP1		
Y7 (S)	GGTTTTGTGTCAGCGTGAATGA	2401-2423
Q8 (AS)	AAGAGGTCTCTRITCCACAT	3484-3503

Apéndice 7

Lista de los cebadores sentido (S) y antisentido (AS) utilizados durante el desarrollo de esta tesis para secuenciar la región codificante de las proteínas de cápside (P1) de PV-2. Las secuencias de los cebadores se encuentran en sentido 5' 3' y se indica la posición a la que se unen en el genoma de PV-2 cepa Sabin (GenBank accession n° X00595.1).

Cebador	Secuencia	Posición en el genoma
Reacción VP4/VP2		
EV-PCR2 (S)	TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCC	446-470
1018A (AS)	TTGAATTGCCAGAGTTAGCTGCA	995-1018
1493A (AS)	AAGAGGTAATCAACTGGGCAGA	1472-1493
2031A (AS)	GGACAACGAGAGACACAAGAT	2011-2031
Reacción VP3		
1110S (S)	TGGAATTGGCGGAAATAGAC	1898-1917
1898S (S)	TGGAATTGGCGGAAATAGAC	1898-1917
2031A (AS)	GGACAACGAGAGACACAAGAT	2011-2031
Y7 (S)	GGTTTTGTGTCAGCGTGTAATGA	2401-2423
2841A (AS)	GCGTCTCAGTTGAACAGTATCTTTG	2817-2841
Reacción VP1		
Y7 (S)	GGTTTTGTGTCAGCGTGTAATGA	2401-2423
2841A (AS)	GCGTCTCAGTTGAACAGTATCTTTG	2817-2841
Q8 (AS)	AAGAGGTCTCTRITCCACAT	3484-3503

Apéndice 8

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región codificante de las proteínas de la cápside (P1) de PV-2, obtenidas a partir de PV-2 wt; de la amplificación luego de tres pasajes de clonado biológico de los cuatro clones seleccionados: PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 y PV-2-R21. El punto de inicio y terminación de la región codificante se determinó según la secuencia de referencia PV-2 cepa Sabin, GenBank accession n° X00595 (Toyoda et al. 1984). Se resaltan en color verde los cambios no sinónimos asociados a la resistencia o dependencia.

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
PV-2 ref GATGTGAACAAGGTGTGAAGAGCCATTGAGCTACATAAGAGTCCGCCGCCCTGAATGCGGCCTAATCCTAACCACGGAACAGGCGGTCGCGAACCAGT
P1 PV-2 wt
P1 PV-2-D13
P1 PV-2-R17
P1 PV-2-D19
P1 PV-2-R21

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
PV-2 ref GACTGGCTTGTTCGTAACGCGCAAGTCTGTGGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTCCCTGTTATTTTTATCATGGCTGCTTATGGTGACAATCAG
P1 PV-2 wt
P1 PV-2-D13
P1 PV-2-R17
P1 PV-2-D19
P1 PV-2-R21

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
PV-2 ref AGATTGTTATCATAAAGCGAATGGATGGCCATCCGGTGAGTGTGTGTCAGGTATAACAACGTTTGTGGTGAACCACTGTGTTAGCTTACTTCTCAT
P1 PV-2 wt
P1 PV-2-D13
P1 PV-2-R17
P1 PV-2-D19
P1 PV-2-R21

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800
VP4
PV-2 ref TAACCAATTAATCAAAAACAATACGAGGATAAAAACAACAATACACAATGGGCGCCCAAGTTTCATCACAGAAAGTTGGAGCCCACGAAAAATCAAACAG
P1 PV-2 wt
P1 PV-2-D13 G
P1 PV-2-R17
P1 PV-2-D19
P1 PV-2-R21

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
PV-2 ref AGCCTATGGCGGGTCCACCATCAATTACACTACAATCAATTACTATAGGGACTCTGCAAGCAATGCAGCAAGCAAGATTTTGCACAAGATCCGTCC
P1 PV-2 wt
P1 PV-2-D13
P1 PV-2-R17
P1 PV-2-D19
P1 PV-2-R21

VP2

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
PV-2 ref AAGTTCACCGAACCCATTAAGGACGTCCTTATTAAGACCGCTCCCATGCTAAACTCCCCAAACATTGAGGCGTGTGGTTATAGTGACAGGGTAATGCAGC
P1 PV-2 wt
P1 PV-2-D13
P1 PV-2-R17
P1 PV-2-D19
P1 PV-2-R21

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
PV-2 ref TAACCTCTGGGCAATTCAACGATCACCACCCAAGAAGCGGCCAATTCCTGTTGTTGCCTACGGTAGATGGCCTGAATACATCAGAGATACCGAGGCAAATCC
P1 PV-2 wt
P1 PV-2-D13
P1 PV-2-R17
P1 PV-2-D19
P1 PV-2-R21

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
PV-2 ref TGTAGACCAACCAACCGAGCCCGATGTAGCCGCGTGCAGGTTCACACATTAGATACCGTCACCTGGCGCAAGGAGTCCAGAGGGTGGTGGTGGAAACTA
P1 PV-2 wt
P1 PV-2-D13
P1 PV-2-R17
P1 PV-2-D19
P1 PV-2-R21

	3210	3220	3230	3240	3250	3260	3270	3280	3290	3300

PV-2 ref	GGCTGTTTCGCGTGGTAAATGATCACAACCCACGCGGCTCACCTCCAAGATCAGAGTGTACATGAAGCCAAAGCATGTCAGAGTCTGGTGCCCACGACCT									
P1 PV-2 wt									
P1 PV-2-D13									
P1 PV-2-R17									
P1 PV-2-D19									
P1 PV-2-R21									

	3310	3320	3330	3340	3350	3360	3370	3380	3390	3400

									P2-3b	
									→	
PV-2 ref	CCACGAGCAGTCCCATACTTCGGACCAGGTGTTGATTATAAAGATGGGCTCACCCACTACCAGAAAAGGGATTAACGACTTATGGATTTGGACACCAA									
P1 PV-2 wt									
P1 PV-2-D13									
P1 PV-2-R17									
P1 PV-2-D19									
P1 PV-2-R21									

Apéndice 9

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región codificante de las proteínas de la cápside (P1) de PV-2, obtenida a partir de PV-2 wt; de la amplificación luego de tres pasajes de clonado biológico de los cuatro clones seleccionados: PV-2-D13, PV-2-R17, PV-2-D19 y PV-2-R21. El punto de comienzo y fin de la región codificante se determinó según lo especificado en la secuencia de referencia PV-2 cepa Sabin, GenBank accession n° X00595 (Toyoda et al. 1984). Se resaltan en color verde los cambios no sinónimos relacionados con la resistencia o la dependencia de las variantes.

VP4

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

PV-2 ref MGAQVSSQKVGAHENSNRAYGGSTINYTTINYRDSASNAASKQDFAQDPSKFTTEPIKDVLIKTA PMLNSPNIEACGYSDRVMQLTLGNSITITTEAANS

P1 PV-2 wt

P1 PV-2-D13

P1 PV-2-R17

P1 PV-2-D19

P1 Pv-2-R21

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

PV-2 ref VVAYGRWPEYIRDTEANPVDQPTPEPDVAACRFYTLDTVTWKESRGWWWKLPDALKDMGLFGQNMFYHYLGRAGYTVHVQCNAFKFHQALGVFAVPEMC

P1 PV-2 wtS.....

P1 PV-2-D13S.....

P1 PV-2-R17S.....

P1 PV-2-D19S.....

P1 Pv-2-R21S.....

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

PV-2 ref LAGDSTTHMFTKYENANPGEKGGEFKGSFTLDTNATNPARNFPCVDYLFSGVLVGNAFVYPHQIINLR TNNCATLVLPYVNSLSIDSMTKHNNWGIAIL

P1 PV-2 wt

P1 PV-2-D13

P1 PV-2-R17A.....

P1 PV-2-D19

P1 Pv-2-R21

VP3

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

PV-2 ref PLAPLDFVTESSTEIPITLTIAPMCCEFNGLRNITVPRTOQLPVLNTPGSNQYLTADNYQSPCAIPEFDVTPPIDIPGEVRNMMELAEIDTMIPLNLTSQ

P1 PV-2 wtA.....

P1 PV-2-D13A.....

P1 PV-2-R17A.....

P1 PV-2-D19A.....

P1 Pv-2-R21A.....

.....V.....

P2-3b



810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

```
PV-2 ref TEGDSLYGAASLNDFGSLAVRVVNDHNPTRLTSKIRVYMKPKHVRVWCPRPPRAVPYFGPGVDYKDGLTPLPEKGLTTYGFQHONKAVYTAGYKICNYHL
P1 PV-2 wt .....~
P1 PV-2-D13 .....~
P1 PV-2-R17 .....-
P1 PV-2-D19 .....~
P1 Pv-2-R21 .....-
```

VII – BIBLIOGRAFÍA

VII - BIBLIOGRAFÍA

Abad, M.J. et al., 2006. Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). *Journal of ethnopharmacology*, 103(3), pp.338–344.

Abad, M.J., Bermejo, P., Gonzales, E., et al., 1999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General pharmacology*, 32(4), pp.499–503.

Abad, M.J., Bermejo, P., Palomino, S.S., et al., 1999. Antiviral Activity of some South American Medicinal Plants. *Phytotherapy Research*, 13, pp.142–146.

Abad, M.J. & Bermejo, P., 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, vii, pp.76–96.

Akaike, S. et al., 2003. A New ent -Clerodane Diterpene from the Aerial Parts of *Baccharis gaudichaudiana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51(2), pp.197–199.

Almela, M.J., González, M.E. & Carrasco, L., 1991. Inhibitors of poliovirus uncoating efficiently block the early membrane permeabilization induced by virus particles. *Journal of virology*, 65(5), pp.2572–2577.

Antonelli, G. & Turriziani, O., 2012. Antiviral therapy: old and current issues. *International journal of antimicrobial agents*, 40, pp.95–102.

Astani, A., Reichling, J. & Schnitzler, P., 2011. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2011(3), p.253643.

Barboza, G.E. et al., 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34(1-2), pp.7–365.

Bergelson, J.M. & Coyne, C.B., 2013. Picornaviru Entry. In S. Pohlmann & G. Simmons, eds. *Viral Entry into Host Cells*. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 24–41.

Bourjot, M. et al., 2012. Prostratin and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate are potent and selective inhibitors of Chikungunya virus replication. *Journal of natural products*, 75(12), pp.2183–2187.

Buckwold, V.E., Beer, B.E. & Donis, R.O., 2003. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral Research*, 60(1), pp.1–15.

Búfalo, M.C. et al., 2009. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of applied microbiology*, 107(5), pp.1669–1680.

- Burgstaller Chiriani, C.H., 1999. *La vuelta a los vegetales* 16° ed., Buenos Aires, Argentina: Edicial SA.
- Cabrera, A.L. et al., 2000. *Catálogo ilustrado de las compuestas (=Asteraceae) de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, Sistemática, Ecología y Usos.pdf* C. A. Zavaro, ed.,
- Cabrera, A.L., 1978. Compositae. In *Flora de la Provincia de Jujuy*. Buenos Aires, Argentina: INTA.
- Cabrera, A.L. & Zardini, E.M., 1978. *Manual de la Flora de los Alrededores de Buenos Aires* 2° Ed., Buenos Aires, Argentina: Editorial ACME.
- Carreras, C.R., Rossomando, P.C. & Giordano, O.S., 1998. ENT-labdanes in *Eupatorium buniifolium*. *Phytochemistry*, 48(6), pp.1031–1034.
- Castrillo, J.L. & Carrasco, L., 1987. Action of 3-Methylquercetin on poliovirus RNA replication. *Journal of Virology*, 61(10), pp.3319–3321.
- Caula, S. et al., 1991. Polyphenols isolated from *Eupatorium buniifolium*. *Revista Latinoamericana de Química*, 22, pp.1–3.
- Chattopadhyay, D. et al., 2009. Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. *New biotechnology*, 25(5), pp.347–368.
- Chen, J. et al., 2011. Thymol, Benzofuranoid, and Phenylpropanoid Derivatives: Anti-inflammatory Constituents from *Eupatorium cannabinum*. *Journal of natural products*, 74, pp.1021–1027.
- Cherwa, J.E. et al., 2009. Viral adaptation to an antiviral protein enhances the fitness level to above that of the uninhibited wild type. *Journal of virology*, 83(22), pp.11746–11750.
- Chiang, L.C. et al., 2003. Anti- Herpes Simplex Virus Activity of *Bidens pilosa* and *Houttuynia cordata*. *The American Journal of Chinese Medicine*, 31(3), pp.355–362.
- Chiang, L.-C. et al., 2005. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 32(10), pp.811–816.
- Collett, M.S., Neyts, J. & Modlin, J.F., 2008. A case for developing antiviral drugs against polio. *Antiviral research*, 79(3), pp.179–187.
- Da Costa, F.B., Terfloth, L. & Gasteiger, J., 2005. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. *Phytochemistry*, 66(3), pp.345–353.
- Cotin, S. et al., 2012. Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication. *Antiviral research*, 96(2), pp.181–186.

- Cragg, G. & Newman, D.J., 2009. Biodiversidade: Um componente essencial na descoberta de fármacos. In R. Yunes & V. Filho, eds. *Química de productos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. pp. 51–81.
- Critchfield, J.W., Butera, S.T. & Folks, T.M., 1996. Inhibition of HIV Activation in Latently Infected Cells by Flavonoid Compounds. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 12(1), pp.39–46.
- Curry, S., Chow, M. & Hogle, J.M., 1996. The poliovirus 135S particle is infectious. *Journal of virology*, 70(10), pp.7125–731.
- Domingo, E., 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual review of microbiology*, 51, pp.151–178.
- Dye, C., 2014. After 2015 : infectious diseases in a new era of health and development. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 369(20130426).
- Eggers, H.J. & Tamm, I., 1963. Drug Dependence of Enteroviruses: Variants of Coxsackie A9 and ECHO 13 Viruses That Require 2-(a-Hydroxybenzyl)-benzimidazole for Growth. *Virology*, 20, pp.62–74.
- Escalante, A. et al., 2010. Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved Escherichia coli strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial Cell Factories*, 9(21), pp.1–12.
- Fernández, T. et al., 2002. Immunomodulating properties of Argentine plants with ethnomedicinal use. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 9(6), pp.546–552.
- Fullas, F. et al., 1994. Cytotoxic constituents of Baccharis gaudichaudiana. *Journal of natural products*, 57(6), pp.801–807.
- Gagey, D., 2012. *Evaluación de nuevos compuestos antivirales para el tratamiento de las infecciones por el virus de la hepatitis B (HBV)*. Universidad de Buenos Aires.
- García, C.C. et al., 2002. Evaluation of the antiviral activity against Junin virus of macrocyclic trichothecenes produced by the hypocrealean epibiont of Baccharis coridifolia. *Planta medica*, 68(3), pp.209–212.
- García, C.C. et al., 2003. Virucidal Activity of Essential Oils from Aromatic Plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Research*, 17, pp.1073–1075.
- García, G.H. et al., 1990. Antiherpetic activity of some Argentine medicinal plants. *Fitoterapia*, 41(6), pp.542–546.
- Genovese, D. et al., 1999. Isolation and biological characterization of 3(2H)-isoflavene-resistant and -dependent poliovirus type 2 Sabin mutants. *The Journal of general virology*, 80 (Pt 1), pp.157–167.

- Gilani, A.H., 2005. Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), pp.43–49.
- Gomes Rofrigues, V.E. & de Carvalho, D.A., 2001. *Plantas Mediciniais No Dominio Dos Cerrado* 1° Ed., Editora UFLA.
- Gorzalczany, S. et al., 2008. Choleric and antioxidant effect of *Eupatorium buniifolium*. *Pharmacologyonline*, 1, pp.139–147.
- Guo, Y. et al., 2007. Clerodane Diterpenoids and Flavonoids with NGF-Potentiating Activity from the Aerial Parts of *Baccharis gaudichaudiana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(10), pp.1532–1534.
- Gupta, M.P., 1995. *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas* 1° Ed. M. P. Gupta, ed., Bogotá, Colombia: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Subprograma de Química Fina Farmacéutica.
- Habtemariam, S., 2001. Antiinflammatory Activity of the Antirheumatic Herbal Drug , Gravel Root (*Eupatorium purpureum*): Further Biological Activities and Constituents. *Phytotherapy Research*, 15, pp.687–690.
- Hadaschik, D. et al., 1999. Dependence of Echovirus 9 on the Enterovirus RNA Replication Inhibitor 2-(α -Hydroxybenzyl)-Benzimidazole Maps to nonstructural protein 2C. *Journal of Virology*, 73(12), pp.10536–10539.
- Hall, T.A., 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41, pp.95–98.
- Hayashi, K. et al., 2005. Gaudichanolides A and B , Clerodane Diterpenes from *Baccharis gaudichaudiana*. *Journal of natural products*, 68, pp.1121–1124.
- Heinz, B.A. et al., 1989. Genetic and Molecular Analyses of Spontaneous Mutants of Human Rhinovirus 14 That Are Resistant to an Antiviral Compound. *Journal of virology*, 63(6), pp.2476–2485.
- Hogle, J.M., 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annual review of microbiology*, 56, pp.677–702.
- Jeong, H.J. et al., 2009. Neuraminidase inhibitory activities of flavonols isolated from *Rhodiola rosea* roots and their in vitro anti-influenza viral activities. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(19), pp.6816–6823.
- De Jesus, N.H., 2007. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virology journal*, 4, p.70.
- Johnson, H.E., Banack, S.A. & Cox, P.A., 2008. Variability in Content of the Anti-AIDS Drug Candidate Prostratin in Samoan Populations of *Homalanthus nutans*. *Journal of natural products*, 71, pp.2041–2044.

- Jones, L.R. & Weber, E.L., 2001. Application of Single-Strand Conformation Polymorphism to the Study of Bovine Viral Diarrhea Virus Isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(1), pp.50–56.
- Jose, M. et al., 2005. Biologically Active Substances from the genus *Baccharis* L. (Compositae). In Atta-ur-Rahman, ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier B.V., pp. 703–759.
- Kashman, Y. et al., 1992. The Calanolides, a Novel HIV-Inhibitory Class of Coumarin Derivatives from the Tropical Rainforest Tree, *Calophyllum lanigerum*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35, pp.2735–2743.
- Khabbaz, R.F. et al., 2014. Challenges of infectious diseases in the USA. *Lancet*, 384(9937), pp.53–63.
- Kilpatrick, D.R. et al., 2011. Poliovirus serotype-specific VP1 sequencing primers. *Journal of virological methods*, 174(1-2), pp.128–130.
- Knipe, D.M. & Howley, P.M., 2006. *Fields Virology* 6^o Edición., Filadelfia, EEUU: Lippincott Williams & Wilkins.
- Krasteva, I. et al., 2004. Phytochemical analysis of ethyl acetate extract from *Astragalus corniculatus* Bieb . and brain antihypoxic activity. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croacia)*, 54(2), pp.151–156.
- De la Torre, J.C., Wimmer, E. & Holland, J.J., 1990. Very High Frequency of Reversion to Guanidine Resistance in Clonal Pools of Guanidine-Dependent Type 1 Poliovirus. *Journal of Virology*, 64(2), pp.664–671.
- Lin, Y.-J. et al., 2012. Fisetin and rutin as 3C protease inhibitors of enterovirus A71. *Journal of virological methods*, 182(1-2), pp.93–98.
- Liu, A.-L. et al., 2008. Structure-activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(15), pp.7141–7147.
- Liu, H.-M. et al., 2012. Characterization of poliovirus variants selected for resistance to the antiviral compound V-073. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(11), pp.5568–5574.
- Liu, M.-M. et al., 2012. Discovery of flavonoid derivatives as anti-HCV agents via pharmacophore search combining molecular docking strategy. *European journal of medicinal chemistry*, 52, pp.33–43.
- Lv, X. et al., 2014. Apigenin inhibits enterovirus 71 replication through suppressing viral IRES activity and modulating cellular JNK pathway. *Antiviral research*, 109, pp.30–41.
- Mabry, T.J., Markham, K. & Thomas, M., 1970. *The systematic identification of flavonoids*, Berlin Heidelberg - New York: Springer-Verlag.

- Manvar, D. et al., 2012. Identification and evaluation of anti Hepatitis C Virus phytochemicals from *Eclipta alba*. *Journal of ethnopharmacology*, 144(3), pp.545–554.
- McKinlay, M. a et al., 2014. Progress in the development of poliovirus antiviral agents and their essential role in reducing risks that threaten eradication. *The Journal of infectious diseases*, 210(S1), pp.447–453.
- Miño, J. et al., 2005. Antinociceptive activity of *Eupatorium buniifolium* aqueous extract. *Fitoterapia*, 76, pp.100–103.
- Miño, J. et al., 2007. Neuropharmacological Activity of *Eupatorium buniifolium* Aqueous Extract in Mice. *Phytotherapy Research*, 21(anuary), pp.362–365.
- Montanha, J.A. et al., 2004. Antiviral Activity of Brazilian Plant Extracts. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23(2), pp.183–186.
- Morens, D.M., Folkers, G.K. & Fauci, A.S., 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, 430(July), pp.242–249.
- Mosser, a G., Sgro, J.Y. & Rueckert, R.R., 1994. Distribution of drug resistance mutations in type 3 poliovirus identifies three regions involved in uncoating functions. *Journal of virology*, 68(12), pp.8193–8201.
- Munding, T.A. & Efferth, T., 2008. Herpes simplex virus: Drug resistance and new treatment options using natural products (Review). *Molecular medicine reports*, 1, pp.611–616.
- Murray, M.. & Babe, L., 1999. Inhibitory effect of dibenzofuran and dibenzosuberol derivatives on rhinovirus replication in vitro; effective prevention of viral entry by dibenzosuberone. *Antiviral Research*, 44(2), pp.123–131.
- Muschietti, L. et al., 1994. 5,7,5'-trihydroxy-3,6,2',4'-tetramethoxyflavone from *Eupatorium buniifolium*. *Phytochemistry*, 36(4), pp.1085–1086.
- Muschietti, L. et al., 2005. In vitro antifungal assay of traditional Argentine medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 102(2), pp.233–238.
- Muschietti, L. V, 2002. *Estudio de la Composición Química y Actividades Biológicas de Eupatorium buniifolium Hook et Arn.* Universidad de Buenos Aires.
- Muschietti, L. V et al., 2001. Phenolic compounds with anti-inflammatory activity from *Eupatorium buniifolium*. *Planta medica*, 67(8), pp.743–744.
- Nafisi, S. et al., 2009. RNA binding to antioxidant flavonoids. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 94(1), pp.1–7.
- Newman, D.J. & Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), pp.311–335.

- Neznanov, N. et al., 2008. Quercetinase pirin makes poliovirus replication resistant to flavonoid quercetin. *DNA and cell biology*, 27(4), pp.191–198.
- De Oliveira, C.B. et al., 2013. The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in Siha cells: differences in their activity and mechanism of action. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(9), pp.11022–11032.
- Orhan, D.D. et al., 2010. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological research*, 165(6), pp.496–504.
- Ozçelik, B., Kartal, M. & Orhan, I., 2011. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical biology*, 49(4), pp.396–402.
- De Palma, A.M., Pürstinger, G., et al., 2008. Potential use of antiviral agents in polio eradication. *Emerging infectious diseases*, 14(4), pp.545–551.
- De Palma, A.M., Vliegen, I., et al., 2008. Selective Inhibitors of Picornavirus Replication. *Medicinal Research Reviews*, 28(6), pp.1–62.
- Payá, M. et al., 1996. Inhibitory Effects of Various Extracts of Argentine Plant Species on Free-radical-mediated Reactions and Human Neutrophil Functions. *Phytotherapy Research*, 10(3), pp.228–232.
- Pisonero-Vaquero, S. et al., 2014. Modulation of PI3K-LXR α -dependent lipogenesis mediated by oxidative/nitrosative stress contributes to inhibition of HCV replication by quercetin. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 94(3), pp.262–274.
- Rates, S.M., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 39(5), pp.603–613.
- Rios, J. et al., 1993. The extraction of the essential oil of Romerillo. *Valorisation de la Biomasse végétale par les Produits Naturels*, 22-25 aout(Actes du colloque de Chicoutimi), pp.111–117.
- Robinson, W.E. et al., 1996. Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, pp.6326–6331.
- Rojas Acosta, N., 1905. *Plantas Medicinales de Corrientes*, Buenos Aires, Argentina: Gadola P.
- Ryu, Y.B. et al., 2010. Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CL(pro) inhibition. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(22), pp.7940–7947.
- Saddi, M. et al., 2007. Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 6(10).
- Sagesse, D., 1959. *Yerbas Medicinales Argentinas* 10^o Ed., Rosario, Argentina.

- Salvati, A.L. et al., 2004. Mechanism of Action at the Molecular Level of the Antiviral Drug 3(2H)-Isoflavene against Type 2 Poliovirus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(6), pp.2233–2243.
- Sanchez Palomino, S. et al., 2002. Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency Virus: Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 25(9), pp.1147–1150.
- Sanchez-Duffhues, G. et al., 2011. Activation of Latent HIV-1 Expression by Protein Kinase C Agonists. A Novel Therapeutic Approach to Eradicate HIV-1 Reservoirs. *Current Drug Targets*, 12(3), pp.348–356.
- Savi, L.A. et al., 2010. Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. *Fitoterapia*, 81(8), pp.1142–1146.
- Shibata, C. et al., 2014. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. *Virology*, 462-463, pp.42–48.
- Siebertz, R. et al., 1989. Accumulation and biosynthesis of benzofurans in root cultures of *Eupatorium cannabinum*. *Phytochemistry*, 28(3), pp.789–793.
- Sithisarn, P. et al., 2013. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. *Antiviral research*, 97(1), pp.41–48.
- Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*, 30(18), pp.3268–3295.
- Streilein, J.W., Dana, M.R. & Ksander, B.R., 1997. Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunology Today*, 18(9), pp.443–449.
- Sülsen, V. et al., 2006. In vitro evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitology research*, 98, pp.370–374.
- Tait, S. et al., 2006. Antiviral activity of substituted homoisoflavonoids on enteroviruses. *Antiviral research*, 72(3), pp.252–255.
- Thompson, J.D. et al., 1997. The CLUSTAL _ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), pp.4876–4882.
- Toyoda, H. et al., 1984. Complete Nucleotide Sequences of All Three Poliovirus Serotype Genomes. *Journal of Molecular Biology*, 174, pp.561–585.
- Villafuerte, C., 1984. *Diccionario de árboles, arbustos y yuyos en el folklore argentino* 1° Ed., Buenos Aires, Argentina: Plus Ultra Editores.
- Visintini Jaime, M.F. et al., 2013. Antipoliavirus Activity of the Organic Extract of *Eupatorium buniifolium*: Isolation of Euparin as an Active Compound. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013, p.402364.

- Wang, C.Y. et al., 2013. Eupafolin and Ethyl Acetate Fraction of *Kalanchoe gracilis* Stem Extract Show Potent Antiviral Activities against Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013, p.11.
- Whitley, R.J. et al., 1982. Herpes Simplex Encephalitis. Clinical Assessment. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 247(3), pp.317–320.
- Whitley, R.J. & Gnann, J.W., 2002. Viral encephalitis: familiar infections and emerging pathogens. *Lancet*, 359(9305), pp.507–513.
- Wilson, J.N. & Cooper, P.D., 1963. Aspects of the Growth of Poliovirus As Revealed By the Photodynamic Effects of Neutral Red and Acridine Orange. *Virology*, 21, pp.135–145.
- Wilson, J.N. & Cooper, P.D., 1965. the Effect of Light on Poliovirus Grown in Neutral Red. *Virology*, 26, pp.1–9.
- Wu, Q. et al., 2010. Antiviral flavonoids from *Mosla scabra*. *Fitoterapia*, 81(5), pp.429–433.
- Xu, L. et al., 2014. Identification of luteolin as enterovirus 71 and coxsackievirus A16 inhibitors through reporter viruses and cell viability-based screening. *Viruses*, 6(7), pp.2778–2795.
- Zanon, S.M. et al., 1999. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinamericana de Microbiología*, 41(2), pp.59–62.
- Zardini, E.M., 1984. Etnobotánica de Compuestas Argentinas con especial referencia a su uso farmacológico (primera parte). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 3(1), pp.77–99.
- Zhang, M.L. et al., 2008. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Eupatorium*. *Chemistry & Biodiversity*, 5, pp.40–55.
- Zhang, Y. et al., 2010. Characterization of a rare natural intertypic type 2/type 3 pentarecombinant vaccine-derived poliovirus isolated from a child with acute flaccid paralysis. *The Journal of general virology*, 91(Pt 2), pp.421–429.