



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

# Las tesinas de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Carrera de Licenciatura en Farmacia

Actividad antiherpética in vitro de  
brassinosteroides obtenidos por síntesis  
química

Nº 18

Laura B. Talarico

Tutora: Mónica B. Wachsman

Departamento de Investigación

Fecha defensa de tesina 16 de abril de 2002



A mi papá y mi mamá

A mis hermanas

A Diego

*Por apoyarme, ayudarme y contenerme siempre*

## Agradecimientos

- A la Doctora Mónica B. Wachsman por su gran ayuda, dedicación, paciencia, excelente trato y valiosos consejos y por iniciarme en este campo de investigación. Muchas gracias, Mónica.
- A la Doctora Celia E. Coto por permitirme ingresar en el Laboratorio de Virología, por sus sinceros consejos y por su trato afectuoso.
- A todos los integrantes del laboratorio de Virología y en especial a Elsa, Carlos, Josefina, Cybele, Nelly y Luis por su gentil predisposición a ayudarme y responder mis preguntas. A Vivi, Natalia, Flavia, Andrea, Erina, Sandra, Paula y Laura por contagiarme el entusiasmo en el trabajo.



## Índice

Abreviaturas .....	6
Resumen .....	7
Abstract .....	8
Introducción .....	9
1- Antivirales .....	9
0.1- Generalidades .....	9
0.2- Búsqueda de antivirales .....	9
0.3- Requisitos de la droga ideal para el tratamiento antiviral .....	10
2- Quimioterapia antiviral .....	10
3- Herpesvirus .....	10
3.1- Estructura viral .....	10
3.2- Ciclo de replicación viral .....	11
3.3- Características de la infección herpética .....	12
3.4- Reseña histórica y situación actual de la terapia antiherpética .....	13
3.5- Compuestos naturales con actividad antiherpética .....	16
4- Brassinosteroides .....	16
4.1- Antecedentes históricos .....	17
4.2- Estructura química de los brassinosteroides .....	17
4.3- Actividades biológicas .....	18
4.4- Importancia de la síntesis química de los brassinosteroides .....	18
4.5- Estudio de las relaciones estructura química-bioactividad .....	18
Objetivos .....	19
Materiales y Método .....	19
0.1- Medio de crecimiento (MC) .....	19
0.2- Medio de mantenimiento (MM) .....	19
0.3- Medio de plaqueo .....	20
2- Células .....	20
3- Virus .....	20
3.1- Cepas .....	20
3.2- Preparación de las suspensiones virales .....	20
4- Compuestos ensayados .....	20
5- Ensayo de viabilidad celular .....	20
6- Ensayos antivirales .....	21
6.1- Titulación de la infectividad viral por el método de UFP (Unidades Formadoras de Placas) .....	21
6.2- Ensayo de reducción del número de placas virales .....	21
6.3- Ensayo de inhibición del rendimiento viral .....	21
7- Actividad virucida .....	21
8- Estudio del efecto de la adición del compuesto <b>6b</b> a distintos tiempos post-infección (p.i.) .....	21
9- Estudio del efecto del derivado <b>6b</b> en la adsorción de HSV-1 .....	21
10- Estudio del efecto del derivado <b>6b</b> en la penetración de HSV-1 .....	22
Resultados .....	22
1- Descripción de los derivados brassinosteroides .....	22
2- Evaluación de la citotoxicidad de los brassinosteroides .....	22
3- Evaluación de la actividad antiherpética de los brassinosteroides .....	22
4- Actividad virucida contra HSV-1 .....	28
5- Efecto de la adición del compuesto <b>6b</b> a distintos tiempos post-infección (p.i.) sobre la multiplicación de HSV-1 .....	29
6- Estudio del efecto del compuesto <b>6b</b> sobre las etapas tempranas de la multiplicación de HSV-1 .....	29
Discusión .....	30
Conclusión .....	32
Bibliografía .....	33

## Abreviaturas

ACV: aciclovir  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
BARC: Beltsville Agricultural Research Center  
BRSL: brassinólido  
CC<sub>50</sub>: concentración citotóxica 50%  
CE<sub>50</sub>: concentración efectiva 50%  
CMV: citomegalovirus  
DO: densidad óptica  
EBV: virus de Epstein-Barr  
FDA: Food and Drug Administration  
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana  
HSV: virus herpes simplex  
IS: índice de selectividad  
kpb: kilo pares de bases  
µg/ml: microgramo por mililitro  
µM: micromolar  
MC: medio de crecimiento  
MEM: medio mínimo esencial Eagle  
MM: medio de mantenimiento  
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio  
nm: nanometro  
p.i.: post-infección  
PBS: solución salina de fosfatos  
PM: peso molecular  
QH: queratitis herpética  
RCEA: relación cuantitativa estructura-actividad  
REA: relación estructura-actividad  
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida  
TK: timidinoquinasa  
TK<sup>+</sup>: timidinoquinasa salvaje  
TK<sup>-</sup>: timidinoquinasa deficiente  
UFP: unidades formadoras de placas  
VJ: virus Junín  
VZV: virus varicela-zoster

## Resumen

Los brassinosteroides son un grupo de esteroides que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y son esenciales para su crecimiento y desarrollo. Estos compuestos presentan un uso potencial en agricultura por su capacidad de mejorar el rendimiento y calidad del cultivo. Los brassinosteroides naturales identificados hasta ahora y sus análogos sintéticos tienen en común un esqueleto 5-?-colestano y sus variaciones estructurales se obtienen por el tipo, posición y estereoquímica de los grupos funcionales presentes en el esqueleto y la cadena lateral. Hasta hace 4 años, los brassinosteroides no habían sido informados como antivirales.

En este trabajo se realiza una recopilación y análisis de información acerca de las propiedades antiherpéticas *in vitro* de brassinosteroides obtenidos por síntesis química basándose en investigaciones recientes. En un primer estudio, se evaluó la actividad antiherpética de 12 derivados brassinosteroides (**1a - 6b**) frente a las cepas F y B 2006 del virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) utilizando el método de reducción del número de placas virales para determinar la  $CE_{50}$  (concentración efectiva antiviral 50%). Los compuestos resultaron ser igualmente activos contra ambas cepas de HSV-1. En un trabajo posterior, se investigaron otros 26 derivados brassinosteroides (**7 - 32**) contra los virus HSV-1 (cepa F) y HSV-2 (cepa G) utilizando el método de inhibición del rendimiento viral para determinar la actividad antiherpética. Además, se determinó la actividad anti-HSV-1 de los derivados **1a - 6b** y anti-HSV-2 del compuesto **6b** por este último método. El estigmasterol, esteroide natural a partir del cual se sintetizaron los brassinosteroides ensayados, y el aciclovir se incluyeron como controles. La  $CC_{50}$  (concentración citotóxica 50%) se determinó utilizando el método colorimétrico del MTT en cultivos celulares en estado estacionario. Con el cociente de los valores de  $CC_{50}$  y  $CE_{50}$  se calculó el índice de selectividad (IS). De los compuestos evaluados, los brassinosteroides **6b**, **7b** y **12b** resultaron ser en general los más activos con valores de IS de 100, 80 y 109 para HSV-1 y 71, 40 y 27 para HSV-2, respectivamente. Los resultados obtenidos en estos trabajos permitieron realizar un análisis de relación estructura - actividad (REA) para los distintos brassinosteroides frente a los virus HSV-1 y HSV-2.

El efecto antiviral de los derivados brassinosteroides ensayados no se debió a una inactivación directa, mostrando que un paso de la multiplicación viral estaba siendo afectado. Con respecto al modo de acción de los brassinosteroides, los experimentos de adsorción viral, penetración viral y agregado del compuesto **6b** a distintos tiempos post-infección con HSV-1 sugieren que un estadio tardío en la multiplicación de HSV-1 estaría siendo afectado, indicando que el mecanismo de acción sería diferente del correspondiente al aciclovir, droga activa contra HSV utilizada en la clínica.

Los brassinosteroides evaluados en este estudio representan una nueva clase de compuestos que resultó ser moderadamente activa frente a HSV-1 y HSV-2, en concentraciones que no fueron tóxicas para las células huésped. A partir de los estudios de relación estructura-actividad (REA) y relación cuantitativa estructura-actividad (RCEA), se buscará desarrollar una nueva clase de inhibidores potentes y selectivos de HSV.

## Abstract

The brassinosteroids are a group of steroids widely distributed in plants which are essential for their growth and development. These compounds have a potential use in agriculture due to their capacity to improve the yield and quality of the cultures. The natural brassinosteroids identified so far and their synthetic analogues have in common a 5- $\beta$ -cholestane skeleton and their structural variations come from the type, position and stereochemistry of functional groups present in the skeleton and the side chain. Four years ago antiviral properties of brassinosteroids were not known.

In this work we have compiled and analysed information about the antiherpetic properties *in vitro* of brassinosteroids obtained by chemical synthesis based on recent investigations. In an early study the antiherpetic activity of 12 brassinosteroid derivatives (**1a** - **6b**) was evaluated against the strains F and B 2006 of herpes simplex virus type 1 (HSV-1), employing a plaque reduction assay to determine the EC<sub>50</sub> (50% antiviral effective concentration). The compounds resulted to be equally active against both strains of HSV-1. In a later work, other 26 brassinosteroid derivatives (**7** - **32**) were evaluated against HSV-1 (strain F) and HSV-2 (strain G) via a virus yield reduction assay. Furthermore, the anti-HSV-1 activity of derivatives **1a** - **6b** and the anti-HSV-2 activity of compound **6b** were determined using the latter method. Stigmasterol, a natural sterol from which the tested brassinosteroids were derived, and acyclovir were used as controls. The CC<sub>50</sub> (50% cytotoxic concentration) values were determined by the MTT colorimetric assay using confluent non-growing cellular cultures. The selectivity indexes (SI) were calculated as the ratio CC<sub>50</sub> / EC<sub>50</sub>. Among the compounds evaluated, the brassinosteroids **6b**, **7b** and **12b** were in general the most active ones with SI values of 100, 80 and 109 for HSV-1 and 71, 40 and 27 for HSV-2, respectively. From the results obtained in these investigations, structure-activity relationship (SAR) studies could be developed for the different brassinosteroid derivatives against HSV-1 and HSV-2.

The antiviral effect of the brassinosteroid derivatives assayed was not due to direct inactivation, showing that a step in the viral replicative cycle was being altered. Concerning the action mode of brassinosteroids, the experiments of viral adsorption, viral penetration and time-of-addition of compound **6b** suggest that a late step in HSV-1 multiplication was being affected, indicating that the action mechanism would be different from that of acyclovir, active drug against HSV used in clinic.

The brassinosteroids evaluated in this study represent a new class of compounds that has been found to be moderately active against HSV-1 and HSV-2, at concentrations that were not toxic to the host cells. Based on structure-activity relationship (SAR) studies and quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies, a new class of potent and selective HSV inhibitors will be searched.



## Introducción

### 1- Antivirales

#### 1.1- Generalidades

Los antivirales son, por definición, compuestos químicos capaces de inhibir la replicación viral interfiriendo con uno o varios pasos de su multiplicación, dentro de la célula huésped en donde se lleva a cabo la infección.

Un perfecto antiviral sería un compuesto que rápidamente cure una infección viral sin producir efectos colaterales. Sin embargo, esto hasta el momento es utópico dado que los virus son parásitos intracelulares que utilizan la maquinaria celular para su replicación. La mayoría de los agentes terapéuticos producen efectos secundarios y, además, en muchas infecciones virales no se logra alcanzar la eliminación total del virus sino una disminución de la carga viral, con la consiguiente mejoría del individuo infectado.

Los efectos colaterales de los antivirales deben evaluarse dentro del contexto de la enfermedad que se está tratando, y es aceptable tenerlos si la enfermedad amenaza la vida o si el tratamiento provoca beneficios al paciente durante un episodio agudo de la enfermedad, suprimiendo la recurrencia (Darby, 1995).

Para una quimioterapia selectiva de las infecciones virales, una droga debe inhibir la replicación viral a concentraciones no tóxicas para el huésped.

La necesidad de drogas antivirales crece rápidamente, a medida que se reconocen nuevas enfermedades virales. A pesar de los miles de compuestos ensayados, sólo unos pocos son utilizados en clínica, ya que la mayoría de los compuestos promisorios *in vitro* resultan tóxicos e ineficaces *in vivo*.

#### 1.2- Búsqueda de antivirales

Los métodos utilizados para el descubrimiento de drogas antivirales han evolucionado durante los últimos cuarenta años. Las metodologías de búsqueda han avanzado hasta el punto de poder probar cientos de miles de compuestos contra un sitio blanco en particular. Una alternativa consiste en utilizar la estructura de los sustratos enzimáticos como punto de partida para el descubrimiento de las drogas. Además, se está haciendo uso de diversos estudios de morfogénesis, cristalización de las partículas virales o de complejos inhibidor-sitio blanco y su análisis por difracción con rayos X, de modo de optimizar la preparación de bibliotecas de compuestos con los cuales poder predecir y mejorar las propiedades farmacocinéticas de los antivirales. Finalmente, las nuevas propuestas de la terapia antiviral consisten en utilizar compuestos basados en oligonucleótidos, como también aquellos que puedan modular la respuesta inmune (Jones, 1998).

La contrapartida de la búsqueda al azar de antivirales consiste en el diseño racional de una droga antiviral. Si bien este método simplificaría el esfuerzo de búsqueda, podría no resultar efectivo *in vivo* o no ser aprobado finalmente para su uso clínico.

#### 1.3- Requisitos de la droga ideal para el tratamiento antiviral

Las características de la droga ideal para el tratamiento de una infección viral se enumeran a continuación:

1. Alta actividad contra el virus blanco.
2. Inhibición de un paso metabólico esencial.
3. Biodisponibilidad oral.
4. Penetración rápida en tejidos infectados.
5. Debilitamiento de cepas resistentes.
6. No tóxica para células normales.
7. No incorporable al ADN de células no infectadas.
8. Activada a la forma tóxica sólo en células infectadas.
9. Excretada sin ser metabolizada.
10. Segura tanto en administración a corto plazo como a largo plazo (ancianos y niños).
11. Baja frecuencia de administración (una o dos veces diarias).
12. Bajo costo.

Protocolos clínicos controlados han demostrado que el *aciclovir* posee la mayoría de las características de la droga ideal para el tratamiento de los herpesvirus, y por ello es el tratamiento de elección. Aunque la biodisponibilidad del aciclovir es relativamente baja, su absorción es lo suficientemente buena para permitir el control de todas las enfermedades provocadas por herpesvirus. El logro de mayor biodisponibilidad a través del uso del *valaciclovir* oral, que es rápidamente convertido a aciclovir (Darby, 1994), puede mejorar la eficacia del segundo en aquellos pacientes que continúan con nuevos brotes virales aún bajo profilaxis con el mismo.

## 2- Quimioterapia antiviral

Los principales blancos para la quimioterapia antiviral son las infecciones virales que: 1) no son controlables por medio de vacunas, 2) afectan a un número elevado de personas, 3) pueden ser diagnosticadas rápidamente, 4) son relativamente severas y 5) requieren un largo período de tratamiento (Andrei & De Clercq, 1996). Dentro de las virosis que cumplen estos requisitos y que representan en estos momentos una prioridad clínica, se encuentran las infecciones causadas por los herpesvirus, el virus de la hepatitis B y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

La clave de la quimioterapia antiviral es la inhibición de la replicación viral sin afectar el normal funcionamiento de la célula huésped. Existen evidencias de que hay varios eventos en el ciclo de replicación viral que no ocurren en las células sin infectar, o que son controlados por enzimas codificadas por los virus, que difieren estructural y funcionalmente de las correspondientes enzimas celulares. Así, por ejemplo, los tres primeros pasos del ciclo de replicación viral (adsorción, penetración y desnudamiento) son específicos de la infección viral y no ocurren en células no infectadas. Del mismo modo, algunos ejemplos de etapas del ciclo de replicación viral controladas por enzimas virales específicas son la transcripción del ARN (+) a ADN (catalizada por la transcriptasa reversa asociada a los retrovirus), la replicación del ADN a ADN (catalizada por las ADN polimerasas de los herpesvirus) y el clivaje proteolítico de las proteínas precursoras virales (catalizado por la proteasa del HIV) (Andrei & De Clercq, 1996). Todas las etapas del ciclo de replicación viral que se diferencian de los procesos normales de la célula huésped, son blancos potenciales para la quimioterapia antiviral.

Existen limitaciones inherentes a la quimioterapia antiviral (además de la limitación para el uso clínico de las drogas antivirales con efectos secundarios tóxicos). En primer lugar, cuanto más selectiva es una droga antiviral, más reducido es su espectro de acción. En segundo lugar, dado que las drogas antivirales afectan etapas de la replicación viral, la fase latente característica de algunos virus está fuera del alcance de la quimioterapia. Este hecho es particularmente importante en las infecciones con retrovirus y herpesvirus. Por consiguiente, la erradicación de las infecciones virales latentes no es factible. En tercer lugar, la quimioterapia antiviral debe iniciarse tempranamente, antes de que ocurran daños irreversibles, y para ello se requiere un diagnóstico rápido y preciso, lo cual es difícil para muchas infecciones virales.

Un problema que se presenta en la quimioterapia antiviral es la aparición de resistencia a las drogas antivirales, tal como ocurre con los antibióticos. Eso se debe a mutaciones del genoma viral que permiten el escape a la acción del inhibidor, seleccionándose el virus mutante. La resistencia se ha observado en pacientes inmunocomprometidos y muy raramente en personas inmunocompetentes (Bean, 1992). Por tal motivo se buscaron antivirales con mecanismos de acción diferentes a los análogos de nucleósidos, de manera de frenar a los virus que escaparon a la acción de los primeros. La terapia combinada ha permitido enfrentar dos problemas centrales en el uso de antivirales: la toxicidad y la aparición de resistencia.

En el caso de los análogos de nucleósidos, existen dos tipos de toxicidad: inmediata y a largo plazo. La primera es debida a la interferencia con los procesos de síntesis de ácidos nucleicos celulares. A largo plazo, la posible incorporación de los análogos de nucleósidos al ADN celular acarrea la aparición de mutaciones, produciendo daños irreversibles. Por tal motivo, la terapia antiviral se encuentra aún en pleno desarrollo, buscando solucionar los problemas de toxicidad que plantea el uso de antivirales.

## 3- Herpesvirus

### 3.1- Estructura viral

La familia *Herpesviridae* comprende tres grandes grupos o subfamilias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* (Murphy, 1996), con ocho miembros que son patógenos para el hombre: los virus herpes simplex (HSV) tipos 1 y 2, el virus varicela-zoster (VZV), el citomegalovirus humano (CMV), el virus de Epstein-Barr (EBV), y los herpesvirus humanos 6, 7 y 8. La característica principal de todos ellos es su capacidad de persistir en el huésped infectado por el resto de la vida, estableciendo "latencia"; de ahí que el gran problema sea la reactivación o "recurrencia" de la enfermedad por períodos variables (De Cristóforo y col., 1996).

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

El genoma está en el centro del *core* y tiene el aspecto de un ovillo de lana, con un ADN doble cadena lineal de 150-229 kpb con regiones de secuencias repetidas características del género, asociado a proteínas centrales fibrilares.

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

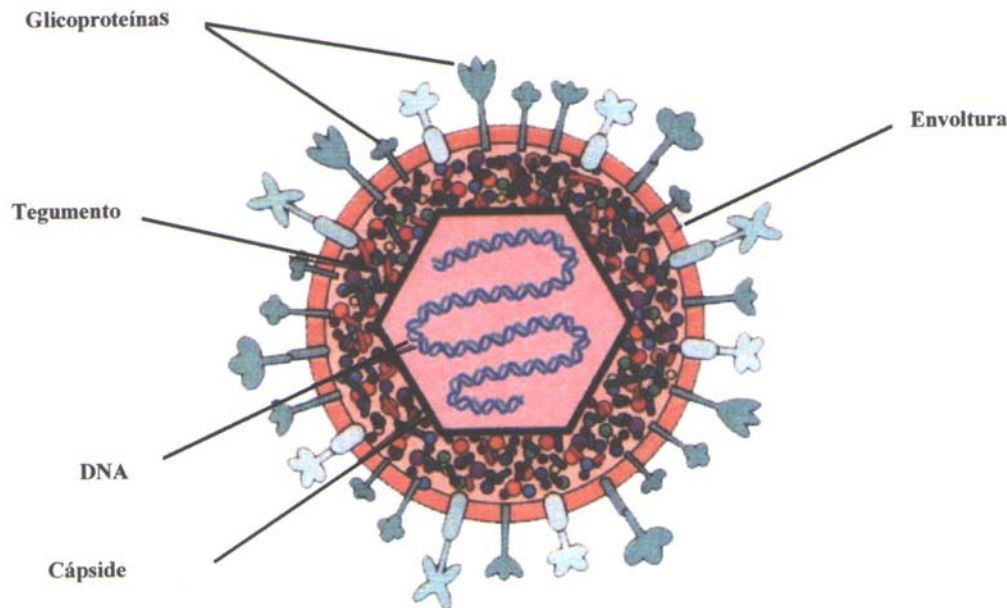
Rodeando la cápside se localiza una capa de material globuloso conocida como tegumento, formado por

lipoproteínas, glicoproteínas, proteínas fosforiladas y proteínas con actividad enzimática tales como ATPasas y proteinquinasas.

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

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

**Figura 1. Partícula viral extracelular madura**



### 3.2. Ciclo de replicación viral

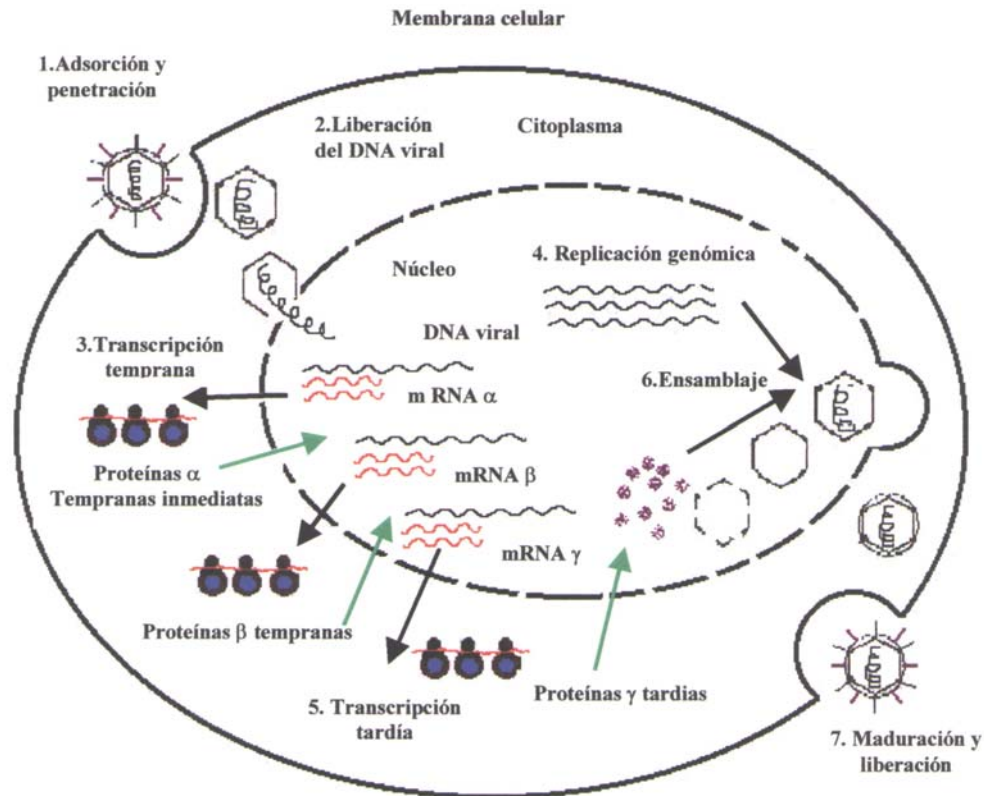
El virión de HSV se une por medio de la envoltura viral a través de la glicoproteína C (gC) al receptor heparan sulfato que forma parte de los proteoglicanos de la superficie celular (Herold y col., 1994; Aguilar y col., 1999). La penetración o entrada al citoplasma requiere de las glicoproteínas virales gB, gD, gH y gL para que ocurra la fusión de la envoltura con la membrana plasmática, independiente del pH. Las proteínas del tegumento son liberadas en la célula y una de ellas produce la detención de la síntesis de proteínas celulares, y la nucleocápside es transportada a través del citoesqueleto hacia los poros de la membrana nuclear, el ADN viral entra al núcleo y se circulariza (Figura 2) (Roizman & Sears, 1996).

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

en la fusión celular, pueden actuar como receptores Fc (unen partículas que han sido recubiertas por anticuerpos producidos en respuesta a una infección) y posibles blancos para la citólisis inmune.

Estas infecciones productivas son líticas como resultado de la inhibición de la síntesis de macromoléculas celulares inducida por el virus, observándose redondeamiento y desprendimiento de las células.

Figura 2. Ciclo de replicación viral



### 3.3. Características de la infección herpética

Los virus HSV-1 y HSV-2, pertenecientes al género *Simplex* de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae*, se diferencian en el laboratorio por poseer distintos serotipos neutralizantes. Además, aunque los genomas de HSV-1 y HSV-2 comparten genes altamente conservados entre los herpesvirus y son 50 % homólogos, poseen características diferenciales. HSV-1 presenta un tropismo por la mucosa oral, en tanto que HSV-2 prefiere la mucosa genital. La infección con un serotipo puede proveer protección cruzada contra el otro. Por lo general, el HSV-1 se adquiere previamente al HSV-2, por la tendencia de los individuos de tener distintos virus en la mucosa oral, y por el hecho de que HSV-2 se transmite por contacto sexual. Como consecuencia, los individuos que escapan a la infección por HSV-1 y contraigan infección primaria con HSV-2, podrían ser atacados severamente con complicaciones clínicas. Aún en los casos de inmunidad previa al HSV-1, pueden presentarse síntomas severos por la infección con el serotipo 2, por la adquisición de un inóculo viral mayor al estándar. Los herpesvirus simplex son agentes infecciosos exitosos ya que por lo general son transmitidos por individuos aparentemente saludables (Griffiths, 1995).

La reactivación de los herpesvirus de la latencia requiere que la información del genoma viral (150-229 kpb) sea expresada activamente, y que la célula provea las enzimas esenciales y moléculas precursoras. Dado que el genoma viral es grande, la disponibilidad de nucleótidos trifosfato es limitante para la reactivación de la latencia. La latencia del HSV se lleva a cabo en las neuronas que se encuentran diferenciadas y por lo tanto son incapaces de dividirse, por lo que no se encuentran nucleótidos trifosfato en altas concentraciones. Para facilitar el proceso de reactivación, los herpesvirus han evolucionado para codificar enzimas que incrementen la disponibilidad de moléculas precursoras para un virus a ADN, tales como la timidinquinasa (TK), que fosforila nucleósidos a su forma monofosfato.

La infección herpética por HSV-1 y HSV-2 está distribuida mundialmente y no tiene ningún reservorio fuera del hombre, aun cuando todos los animales de laboratorio resultan susceptibles a ambos virus.

Las fuentes corrientes de infección son las secreciones provenientes de las vesículas (etapa de mayor capacidad infectiva) y de las úlceras (concentración viral mínima o nula).

El mecanismo de transmisión es por contacto íntimo de tejidos no lesionados con mucosas, epitelios, piel con secreciones de lesiones activas. La transmisión sexual de las infecciones genitales está comprobada.

En las lesiones simples superficiales, especialmente en lo referente a las recurrencias, el individuo experimenta con varias horas de anticipación en la región donde luego aparecen las vesículas, sensaciones de ardor, picazón o entumecimiento.

A diferencia de otros virus de la familia *Herpesviridae*, el HSV tiene la capacidad de adsorberse y penetrar en casi todas las células de mamíferos estudiadas *in vitro*. Debido a la actividad del virus sobre la síntesis de macromoléculas celulares y a la presencia de proteínas virales, se producen alteraciones metabólicas y morfológicas en las células infectadas (redondeamiento celular y formación de sincicios) (De Cristóforo y col., 1996).

### 3.4- Reseña histórica y situación actual de la terapia antiherpética

La búsqueda de quimioterápicos contra las infecciones por herpesvirus se remonta a los años cincuenta, cuando la creciente necesidad por desarrollar compuestos antitumorales hizo que se dirigiera todo el esfuerzo hacia los análogos de nucleósidos. El razonamiento fue simple: el desarrollo tumoral involucra un descontrolado crecimiento celular y la división celular estaría precedida por una duplicación del ADN. Por lo tanto, los análogos de nucleósidos serían potencialmente inhibidores de la progresión tumoral y podría esperarse un bloqueo en la síntesis del ADN. En rigor, los propios nucleósidos no son bloqueadores. La ADN polimerasa usa desoxinucleósidos trifosfatados que son incorporados en el ADN naciente como monofosfatos, y para interferir en este proceso los análogos de nucleósidos deben ser primero activados por fosforilación.

Los mismos argumentos anteriores pueden ser aplicados a la replicación del ADN viral. Así es como surge el primer compuesto antiherpético, la *idoxiuridina* (5-iodo-2'-desoxiuridina, IDU), sintetizada por Prusoff (1959). Kaufman (1962) demostró que tenía efectos curativos frente a la queratitis herpética (QH) en ratones y en humanos, y ese mismo año fue aprobada en Estados Unidos para terapia tópica. Dos años más tarde, la *trifluridina* (5-trifluoro-2'-desoxitimidina, TFF) fue incorporada al tratamiento de la queratitis herpética, y en 1972 se aprobó también para ese uso la *vidarabina* (arabinósido de adenina, Ara-A). Sin embargo, todos estos análogos de nucleósidos no podían utilizarse en tratamientos sistémicos por su baja selectividad, ya que ejercían su efecto tanto sobre la ADN polimerasa viral como celular (Flint y col., 2000).

Se puede considerar que la quimioterapia antiviral alcanzó la "mayoría de edad" en 1977 con la llegada del *aciclovir* (9-(2-hidroxietoximetil)guanina, ACV), el primer agente antiviral verdaderamente específico. El compuesto actúa como un inhibidor de la replicación de HSV, esencialmente al ser fosforilado por la timidinoquinasa (TK) viral para pasar a la forma ACV-monofosfato, que es el paso que confiere selectividad a esta droga. La TK viral reconoce un rango de sustratos mucho más amplio que la enzima codificada por la célula, de modo que la droga puede ser reconocida por la enzima viral, no siendo activada en células no infectadas. La di- y tri-fosforilación es efectuada por enzimas celulares. El ACV-trifosfato actúa como inhibidor y sustrato de la ADN polimerasa viral con mayor efectividad que sobre la ADN polimerasa celular, y por su estructura es un terminador de cadena, ya que carece de un grupo hidroxilo en el extremo 3', necesario para la formación del enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido (Figura 3). El ACV ha demostrado un excepcional perfil de seguridad y una buena tolerancia. El mayor efecto adverso del ACV sería la alteración de la función renal cuando se lo aplica en altas dosis.

Uno de los problemas cruciales de la actual terapia antiviral es el fenómeno de resistencia, es decir, la aparición de variantes virales resistentes por tratamiento prolongado con una droga. Esto ocurre especialmente en el caso de las infecciones herpéticas en pacientes inmunocomprometidos tratados con ACV (Crumpacker, 1989; Cohen Stuart y col., 1998; Balfour, 1999). La potente inhibición de la replicación viral exhibida por los análogos de nucleósidos produce una presión de selección tan fuerte sobre la enzima fosforilante y la ADN polimerasa, que conduce al surgimiento de cepas resistentes. Para HSV se conocen distintos fenotipos de resistencia al ACV, siendo las cepas timidinoquinasa deficientes (TK<sup>-</sup>) las más frecuentes en la práctica médica. Estas cepas mutantes, que han perdido la proteína funcional debido a un codón de terminación prematuro, presentan problemas de replicación y habilidad reducida para establecer latencia, no pudiendo reactivarse de la misma. En pacientes con inmunidad normal no representan un problema clínico, pero en los individuos inmunocomprometidos estos virus debilitados pueden por sí mismos causar la muerte.

Por este motivo se ha continuado en la búsqueda de compuestos más eficaces que el ACV para uso alternativo, ensayando diferentes derivados del mismo. En la actualidad hay tres derivados de ACV aprobados para uso clínico: *ganciclovir* (9-(1,3-dihidroxi-2-propoxi)metilguanina), *famciclovir* (diacetil-6-dioxi-penciclovir) y *valaciclovir* (valil éster del aciclovir) (Flint y col., 2000). El ganciclovir tiene su mayor aplicación en el tratamiento de infecciones con CMV; el famciclovir es efectivo contra infecciones de herpes genital y herpes zoster; el valaciclovir actúa también en infecciones causadas por herpes simplex y varicela-zoster y, en forma profiláctica, es efectivo contra CMV (Balfour, 1999). El *penciclovir* (9-(4-hidroxi-3-hidroximetil-1-

butil)guanina) ha sido aprobado sólo como una formulación tópica para el tratamiento de herpes labial, mientras que su prodroga, el famciclovir, fue desarrollada mejorando su absorción oral. Tanto el ganciclovir como el *cidofovir* ((S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina) y el *foscarnet* (fosfonoformato, PFA) fueron autorizados para el tratamiento de retinitis por CMV en pacientes con SIDA (De Clercq, 1996; Whitley & Griffiths, 1997; Cohen Stuart y col., 1998).

En la Tabla 1 se presentan las drogas actualmente aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration, USA) para el tratamiento de las infecciones herpéticas y los efectos colaterales descritos; en la Figura 4 se muestran las estructuras de algunas de estas drogas. Considerando los efectos secundarios adversos para la salud que en general presentan los análogos de nucleósidos y también la necesidad de combatir la resistencia a las drogas, se llega a la conclusión de que las futuras drogas antiherpéticas deberían tender a expandirse en el área de los no-nucleósidos. Sin embargo, hasta la fecha ha sido escaso el real progreso en su desarrollo. Una excepción es el foscarnet, análogo de pirofosfato e inhibidor de la ADN polimerasa viral, que está aprobado para el tratamiento de las infecciones con CMV, HSV y VZV resistentes al ACV. Aunque este compuesto no es un nucleósido, comparte como blanco una enzima en común con los análogos de nucleósidos, la ADN polimerasa, y se ha observado resistencia cruzada (Balfour, 1999; Cohen Stuart y col., 1998; Mertz, 1997; Crumpacker, 1989).

Actualmente no existe ninguna vacuna aprobada que presente un balance positivo daño-beneficio. Las vacunas completas o atenuadas (conteniendo ADN viral), basadas en algunas de las glicoproteínas de envoltura, se encuentran en desarrollo.

**Figura 3. Mecanismo de acción del aciclovir**

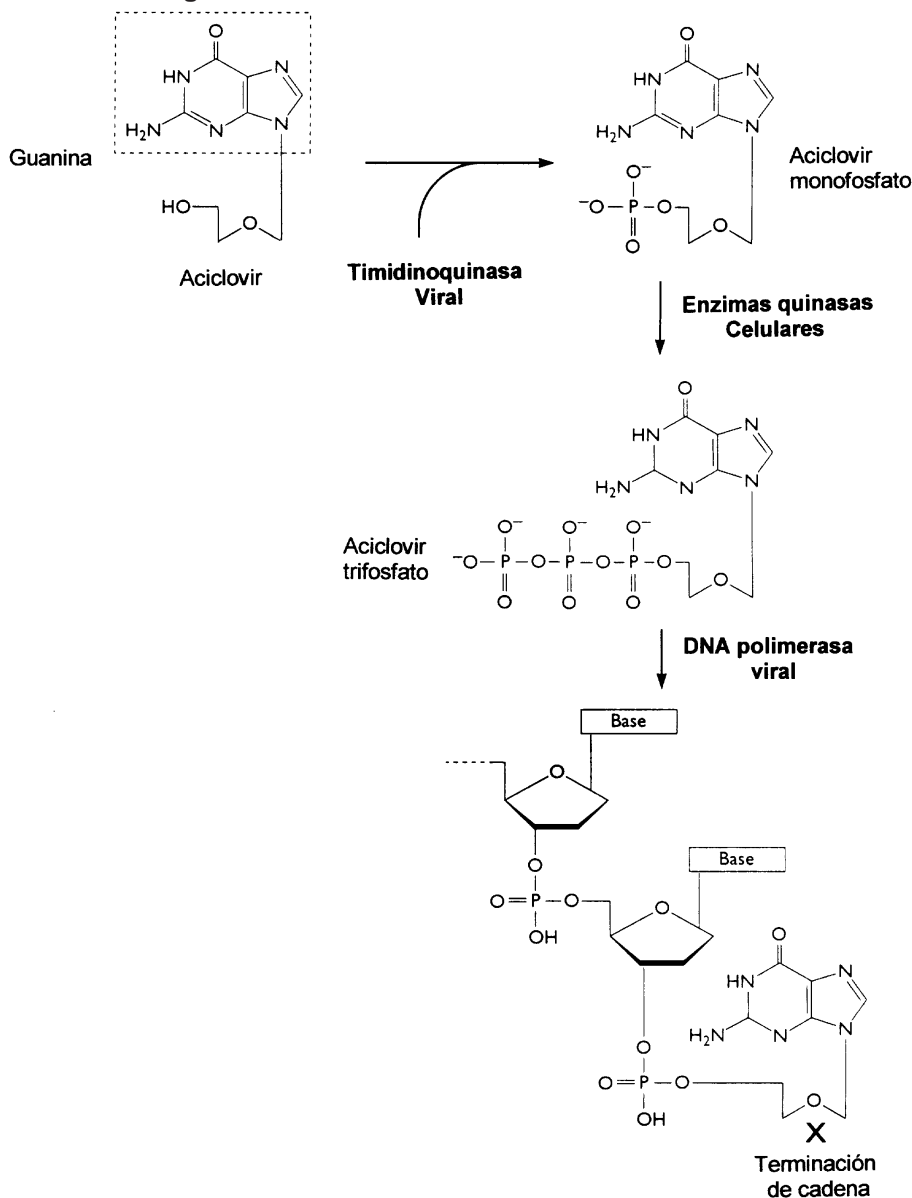


Figura 4. Fórmulas estructurales de drogas antiherpéticas

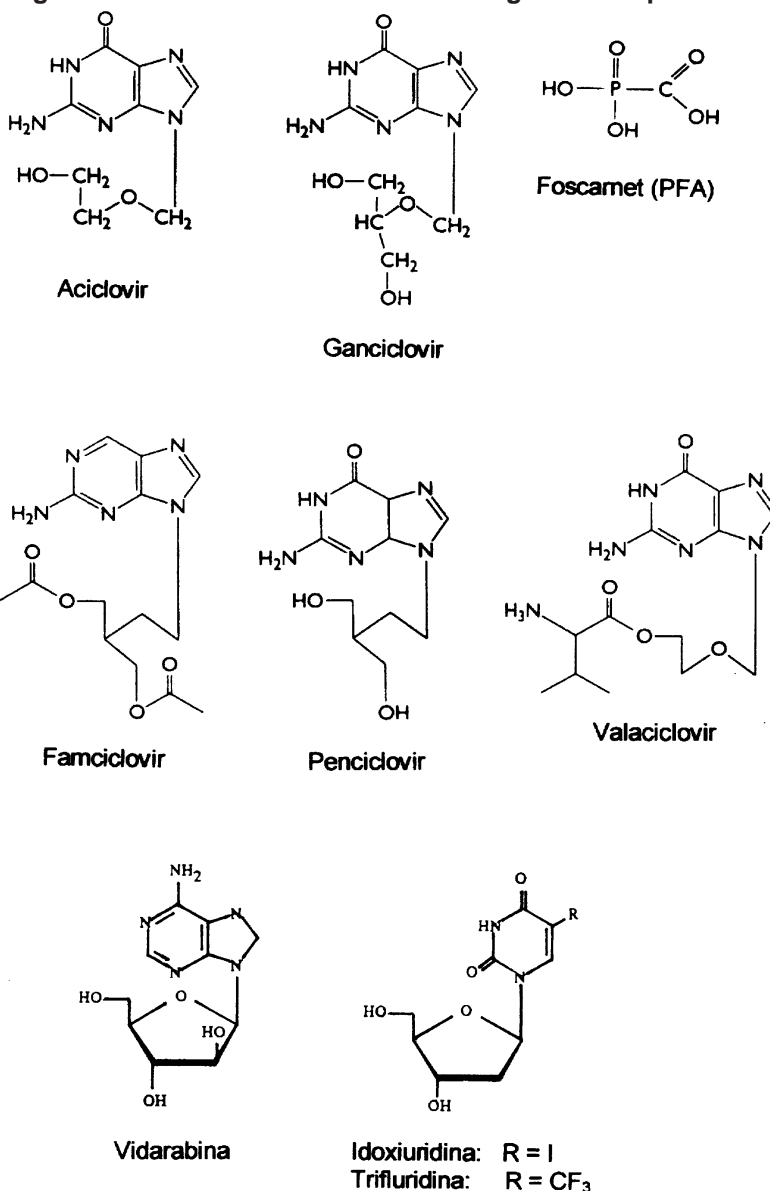


Tabla 1. Drogas aprobadas para el tratamiento de las infecciones herpéticas

Droga antiviral	Aplicación	Efectos colaterales
<b>Idoxuridina (1962)*</b>	Tópico HSV	-
<b>Trifluridina (1964)</b>	Tópico HSV	-
<b>Vidarabina (1972)</b>	Tópico y sistémico HSV (en desuso)	-
<b>Aciclovir (1983)</b>	Tópico y sistémico HSV-VZV	Nefropatías reversibles, trastornos gastro intestinales, encefalitis, flebitis, erupción, cefaleas
<b>Ganciclovir (1989)</b>	Sistémico CMV	Supresión medular (granulocitopenia), insuficiencia renal
<b>Foscarnet (1991)</b>	HSV y VZV resistencia a aciclovir; CMV retinitis	Insuficiencia renal, hipocalcemia, náuseas, vómitos
<b>Cidofovir (1996)</b>	Sistémico CMV retinitis	Nefrotoxicidad
<b>Penciclovir (1996)</b>	Tópico HSV	-
<b>Famciclovir (1997)</b>	Sistémico HSV-VZV	Cefaleas, náuseas, vómitos
<b>Valaciclovir (1997)</b>	Sistémico HSV-VZV, profilaxis contra CMV	Idem ACV

\*( ) Año de aprobación por FDA de la droga.

### 3.5- Compuestos naturales con actividad antiherpética

La búsqueda de nuevas sustancias antivirales que mejoren la acción de las ya conocidas ha llevado en los últimos años a una creciente cantidad de ensayos de productos naturales. Se ha informado acerca de numerosos compuestos naturales con actividad antiherpética: flavonas y flavonoides (Amoros y col., 1992), biflavonoides (Hayashi y col., 1992), taninos (Fukuchi y col., 1989), alcaloides (Renard-Nozaki y col., 1989; Montanha y col., 1995) y péptidos (Baghian & Kousoulas, 1993; Wachsmann y col., 1999), entre otros.

En particular, una de las fuentes para la búsqueda de compuestos con actividad antiviral es el mar. A partir de los años ochenta el potencial oceánico se puso en evidencia con el hallazgo de sustancias bioactivas extraídas de plantas marinas y animales invertebrados (Scheuer, 1989, 1995; Beutler y col., 1993).

Las algas han sido utilizadas para el aislamiento de sustancias bioactivas, siendo los polisacáridos sulfatados, constituyentes de la pared celular, los compuestos extraídos con mayor frecuencia. Los polisacáridos son un grupo complejo de moléculas que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza con diferentes aplicaciones en el campo de la medicina y farmacología. Han mostrado ser útiles por su actividad inmunomoduladora y antitumoral, por su interferencia en el sistema de coagulación y en procesos inflamatorios, en dermatología, en programas dietarios (disminuyen el colesterol y glucemia plasmática), además de afectar el crecimiento viral (Wong y col., 1994; Franz, 1989; Baba y col., 1988a).

*Se han aislado diferentes clases de polisacáridos antivirales según el tipo de alga estudiado. En las algas rojas predominan galactanos y mananos sulfatados, los que a su vez pueden diferir en el tipo de unión, el peso molecular, el grado y tipo de sulfatación y la presencia de cadenas laterales de otros azúcares. Se han aislado galactanos sulfatados activos contra HIV, HSV y otros virus envueltos a partir de las algas rojas Schizymenia dubyi (Bourgougnon y col., 1993) y Aghardiella tenera (Witvrouw y col., 1994). En los últimos años en el laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires se han estudiado diversos tipos de polisacáridos sulfatados extraídos de algas sudamericanas: xilomananos y xilogalactanos obtenidos a partir de Nothogenia fastigiata (Damonte y col., 1994, 1996), galactanos extraídos de Pteroclovia capillacea (Pujol y col., 1996) y de Bostrychia montagnei (Duarte y col., 2001), carragenanos aislados de Gigartina skottsbergii (Carlucci y col., 1997, 1999), fucanos presentes en Leathesia difformis (Feldman y col., 1999) y DL-galactanos híbridos aislados de Gymnogongrus torulosus (Pujol y col., 2002), entre otros. Todos estos compuestos mostraron distinto grado de efectividad como inhibidores de la multiplicación de herpesvirus in vitro. La presencia de grupos sulfato en las moléculas resultó ser imprescindible para la actividad antiviral ya que la misma se perdió en los derivados desulfatados de los compuestos (Damonte, 1996).*

El efecto inhibitorio de los polisacáridos sulfatados es temprano y se debe a la interferencia que producen en la interacción iónica entre regiones con carga positiva de la glicoproteína viral de envoltura y la superficie celular cargada negativamente (receptor heparan sulfato), que va a conducir a la unión y posterior entrada del virus (Baba y col., 1988b; Neyts y col., 1992). Los polisacáridos sulfatados, que presentan una alta densidad de carga negativa en su molécula por la presencia de los residuos sulfato, protegen los aminoácidos cargados positivamente de la envoltura viral impidiendo su interacción con la célula (Schols y col., 1990). Las etapas tempranas del ciclo viral, que comprenden la adsorción del virus en la célula, la entrada y el desnudamiento del genoma viral, son blancos atractivos para el diseño de antivirales. Estos procesos presentan rasgos específicos que permiten lograr una inhibición del virus sin afectar la viabilidad celular.

### 4- Brassinosteroides

Los brassinosteroides son productos naturales que promueven el crecimiento vegetal y son clasificados como hormonas de plantas. A partir de estudios de genética molecular, del metabolismo y de la vía de biosíntesis de los brassinosteroides (Yokota, 1997) se ha confirmado que son esenciales para el crecimiento normal de las plantas. Se encuentran distribuidos en bajas concentraciones en: polen, semillas, frutos, raíces, hojas y flores a lo largo de todo el reino vegetal. Los brassinosteroides son esteroides polihidroxilados, similares en estructura a hormonas esteroides de animales e insectos (Mandava, 1988), que constituyen un nuevo grupo de productos naturales vegetales, con potente actividad biológica. Promueven distintos efectos fisiológicos como: elongación celular, expansión celular, germinación, gravitropismo, retardo en pérdida de hojas, diferenciación del xilema, aumento de la resistencia al stress por congelamiento, daño herbicida y enfermedad, y aumento de la productividad de cultivos (Cutler, 1994).

Existen cuarenta brassinosteroides naturales, de los cuales treinta y dos han sido aislados de angiospermas, cuatro de gimnospermas, y cuatro de otro tipo (Fujioka & Sakurai, 1997). El primer compuesto aislado de una fuente natural fue el brassinólido (BRSL), en 1979.



#### 4.1- Antecedentes históricos

El descubrimiento de los brassinosteroides tuvo lugar en Japón y Estados Unidos casi simultáneamente. Investigadores japoneses que trabajaban con un árbol perenne, *Distylium racemosum* Sieb et Zucc., observaron que el ataque del pulgón *Neothoracaohis yanonis* durante la primavera, inducía la formación de agallas en hojas jóvenes y yemas. Se encontró una fracción activa a partir del extracto metanólico de agallas. La sustancia activa no sólo estaba presente en el tejido de la agalla sino también en las hojas sanas del árbol (Abe & Marumo, 1991).

En 1970 un grupo de investigadores, trabajando en el Beltsville Agricultural Research Center (BARC), aisló una fracción sumamente activa de un extracto etéreo de polen de nabo silvestre, *Brassica napus* L., que denominó brassinas. Estas sustancias actuaban como promotores del crecimiento. En 1974 se logró identificar el componente activo de las brassinas. Se trató de una lactona esteroide (22R,23R,24S)-24-metil-22,23,2?,3?-tetrahidroxi-B-homo-7-oxa-5?-colestano-6-ona, que llamaron brassinólido (BRSL) por brassina y ólido porque resultó ser una lactona (ver fórmula estructural en la Figura 5). La concentración del compuesto en el polen de *B. napus* es de 0,1 mg/kg (Grove y col., 1979).

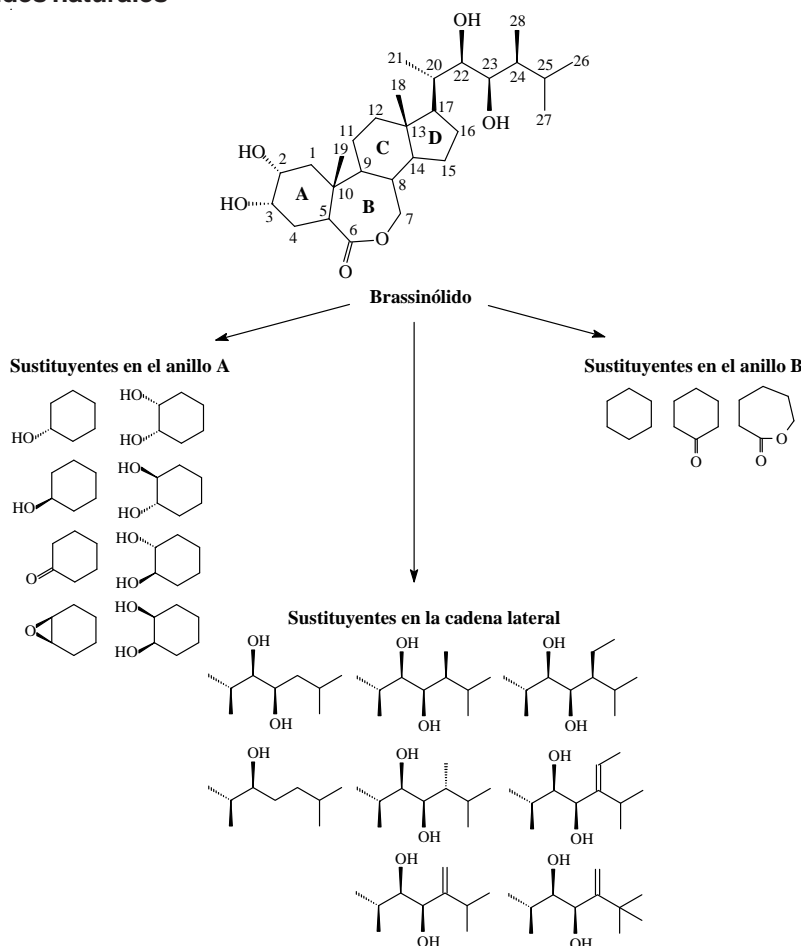
Los factores de crecimiento de *Distylium racemosum* fueron reinvestigados y resultaron ser una mezcla del brassinólido y otros análogos naturales (Abe & Marumo, 1991).

#### 4.2- Estructura química de los brassinosteroides

Los brassinosteroides son polihidroxiesteroides derivados del esqueleto esteroide 5?-colestano. Su variación estructural proviene de diferentes sustituyentes en los anillos A/B y en la cadena lateral. Estas modificaciones se producen por reacciones de oxidación y reducción durante la biosíntesis (Figura 5).

En el anillo A puede haber uno o dos OH en posición ? o ?, un grupo cetona o un grupo epoxi. Con respecto a los grupos oxigenados en el anillo B, los brassinosteroides se clasifican en 6-deoxo (sin oxígeno) y 6-oxo (cetona o lactona). La actividad como promotores del crecimiento aumenta en ese orden. En la cadena lateral todos los brassinosteroides tienen OH vecinales en posición C22 y C23, siendo la configuración natural 22R, 23R (Yokota y col.,1991).

**Figura 5. Variedad de sustituyentes en los anillos A y B y en la cadena lateral de brassinosteroides naturales**



### 4.3- Actividades biológicas

Los brassinosteroides presentan diferentes actividades biológicas: promueven alargamiento del tallo, crecimiento del tubo polínico, curvatura foliar, desenrollamiento foliar, inhibición de la raíz (Mandava, 1988; Schmidt y col., 1997), xilogénesis (Clouse & Zurek, 1991). El amplio espectro de actividades biológicas se comprende teniendo en cuenta el descubrimiento realizado en *Arabidopsis thaliana*. Se observó que los brassinosteroides alteraron el patrón de expresión de genes, tanto en tejidos del tallo como de toda la planta. Cuando se aisló ARNm en plantas tratadas con brassinosteroides y en plantas controles, se detectaron variaciones en los niveles de distintos ARNm, por lo que se postula que estas fitohormonas afectan la expresión de genes vía células blanco, actuando a través de mecanismos similares a las hormonas esteroides animales (Clouse y col., 1993).

### 4.4- Importancia de la síntesis química de los brassinosteroides

La identificación del brassinólido en los laboratorios del BARC en 1979 permitió vislumbrar que los brassinosteroides constituirían una nueva clase de fitohormonas (McMorris y col., 1991). Poco tiempo después de establecerse la estructura del brassinólido, se sintetizaron los primeros análogos de brassinosteroides.

La síntesis de compuestos análogos con actividad brassina confirmó la estructura del núcleo esteroidal y permitió preparar cantidades suficientes de estos compuestos para los estudios fisiológicos y de su acción agrícola potencial. También permitió confirmar y demostrar que la actividad biológica se debe exclusivamente al compuesto que se pone a prueba y que no es consecuencia de alguna otra sustancia presente en la fracción ensayada. Además, las sustancias sintéticas facilitan el estudio de la relación estructura-actividad, al permitir disponer de una mayor variedad de compuestos.

Los brassinosteroides son activos en muy bajas concentraciones, intervienen en procesos metabólicos y de crecimiento, e incrementan la productividad de las plantas. Estas características indujeron a grupos científicos de países como Estados Unidos, Japón, Italia y Argentina, entre otros, a elaborar esquemas para la síntesis de brassinosteroides, dado que su obtención de fuentes naturales es extremadamente dificultosa. Los brassinosteroides se consideran inextractables por encontrarse en cantidades menores a 1 mg/kg de peso fresco, lo que determina que su aislamiento a partir de fuentes naturales sea muy costoso.

Por ello, la síntesis química de los brassinosteroides es de suma importancia, ya que permite disponer de cantidades de material suficientes para: a) confirmar las estructuras asignadas por métodos físicos y espectroscópicos de los distintos compuestos; b) demostrar que el brassinosteroide solo produce la actividad biológica observada, y no las trazas de otras sustancias presentes en el material extraído; c) establecer relaciones estructura-actividad para el brassinólido y los compuestos estructuralmente relacionados con él; d) posibilitar la producción económica de brassinosteroides y la distribución a investigadores de brassinólido y sus análogos; e) ensayar la utilización de estos compuestos para incrementar los rendimientos agrícolas y hortícolas.

Con fines comerciales se trata de encontrar análogos que sean capaces de aumentar significativamente la producción agrícola, que se obtengan con bajos costos y con una mayor eficiencia de síntesis.

### 4.5- Estudio de las relaciones estructura química-bioactividad

El campo del diseño racional de fármacos ha avanzado mucho en dos tipos de metodologías: aquéllas que parten del conocimiento del receptor, basándose en un aislamiento y cristalización de la porción proteica con el ligando unido al sitio activo, y aquéllas que, sin conocer al receptor, consideran la forma de los ligandos que se unen al sitio de interés y determinan sus características comunes.

La primera metodología se basa en un conocimiento de las interacciones ligando-receptor empleando fundamentalmente mecánicas moleculares y bases de datos. Cuando el sitio receptor no se conoce, se examinan comparativamente las estructuras de los compuestos activos y no activos buscando los requerimientos estructurales necesarios para la actividad, mediante una combinación de aspectos de síntesis orgánica, determinaciones estructurales (cristalografía de rayos X, etc.), determinación de la actividad biológica, cálculos computacionales y estadística en análisis REA (relaciones estructura-actividad) y RCEA (relaciones cuantitativas estructura-actividad).

El análisis REA se fundamenta en estudios de semejanza estructural de compuestos activos y no activos, con el fin de identificar porciones estructurales comunes a ellos (farmacóforos), responsables de la bioactividad. El conocimiento del farmacóforo se emplea luego para iniciar el modelado del receptor, empleando metodologías de construcción sobre la base de fragmentos que puedan interactuar con el farmacóforo, satisfaciendo los requerimientos por él impuestos (Balbes y col., 1994).

El análisis RCEA conduce a relaciones cuantitativas que vinculan la actividad biológica de las moléculas activas con algunos de sus parámetros estructurales y/o electrónicos, calculados y/o determinados experi-

mentalmente, que se denominan descriptores moleculares. El conocimiento de dichos descriptores permite predecir la actividad de eventuales nuevas estructuras; estas moléculas modificadas por diseño racional se sintetizan químicamente y se ensaya su bioactividad. De esta manera se pone a prueba la eficiencia de los descriptores moleculares como indicadores de actividad y se corrobora su aplicabilidad a la búsqueda de nuevas drogas.

Con el fin de estudiar relaciones de estructura química-bioactividad se comenzaron a sintetizar brassinosteroides análogos a los naturales y no naturales, con modificaciones en el anillo A, en la estructura del anillo B y en la cadena lateral.

Para estudiar la relación estructura-bioactividad de los brassinosteroides es imprescindible contar con un bioensayo sensible y reproducible, capaz de medir la bioactividad de todos los análogos a las respectivas dosis en que sean inoculados. Particularmente, al evaluar la actividad promotora del crecimiento, también se debe utilizar una misma especie y variedad vegetal (Brosa, 1997). Actualmente la mayoría de los estudios se efectúan en invernaderos y en pequeñas superficies de campo, y se ha visto que las mediciones de bioactividad de los brassinosteroides llevadas a cabo en condiciones experimentales de laboratorio no siempre son extrapolables a campo en cuanto a la capacidad de crecimiento y de productividad de las plantas (Mandava, 1988).

Actualmente, las propiedades terapéuticas de cientos de miles de sustancias fitoquímicas se encuentran en investigación. Particularmente, el desarrollo de compuestos antivirales ha sido siempre un campo de interés, hoy en día en expansión debido al incremento de la cantidad de pacientes inmunocomprometidos (por efectos de enfermedades como el SIDA, o por trasplantes) muchos de los cuales han desarrollado resistencia a los agentes antivirales utilizados en terapias prolongadas. Los brassinosteroides, obtenidos por síntesis química, podrían ser una buena fuente de agentes antivirales, que tienen el potencial de ser modificados y convertirse en derivados más efectivos que el compuesto original.

## Objetivos

El objetivo del presente trabajo consiste en recopilar y analizar información acerca de las propiedades antiherpéticas *in vitro* de brassinosteroides obtenidos por síntesis química basándose en estudios recientemente realizados (Wachsman y col., 2000; Wachsman y col., 2002b; Talarico y col., 2002, 2003).

En la investigación se desarrollan los siguientes puntos:

- Evaluación de la citotoxicidad de los brassinosteroides.
- Análisis de la actividad antiviral de los brassinosteroides frente a virus Herpes.
- Determinación del posible paso de la replicación viral afectado por los compuestos con mayor efecto inhibitor seleccionados en la etapa anterior.
- Búsqueda de alguna relación entre la estructura molecular y la actividad antiviral de los compuestos ensayados, con el propósito de realizar modificaciones a la molécula original que maximicen su actividad biológica y disminuyan su citotoxicidad.

## Materiales y métodos

Los materiales y la metodología utilizada en los trabajos se indican a continuación.

### 1- Medios de cultivo

Se utilizó medio de cultivo marca Gibco que se esterilizó por filtración. Se disolvió en agua bidestilada y se preparó 10X. Los medios utilizados fueron:

#### 1.1- Medio de crecimiento (MC)

Medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado con 5% de suero de ternera inactivado, 50 µg/ml de gentamicina y se llevó a pH 7,2 con bicarbonato 7,5%. Cuando los cultivos se incubaron en estufa con 4% de CO<sub>2</sub> el medio se suplementó con 20 mM de buffer HEPES.

#### 1.2- Medio de mantenimiento (MM)

Medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado con 1,5% de suero de ternera inactivado, 50 µg/ml de gentamicina y se llevó a pH 7,2 con bicarbonato 7,5%. Cuando los cultivos se incubaron en estufa con 4% de CO<sub>2</sub> el medio se suplementó con 20 mM de buffer HEPES.

### 1.3- Medio de plaqueo

MEM en doble concentración (MEM 2X) suplementado con 4% de suero de ternera inactivado, 100 µg/ml de gentamicina, 20 µM de buffer HEPES y se llevó a pH 7,2 con bicarbonato. En el momento de utilizarse se mezclaron iguales volúmenes de este medio y metilcelulosa 1,4% obteniéndose medio semisólido.

## 2- Células

Se utilizó la línea celular Vero, proveniente de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*. La misma fue crecida en monocapa en MC a 37°C y mantenida en MM.

## 3. Virus

### 3.1- Cepas

Se utilizó la cepa F de HSV-1 (Wachsmann y col., 2000; Wachsmann y col., 2002b; Talarico y col., 2002, 2003), la cepa B 2006, TK<sup>-</sup>, de HSV-1 (Wachsmann y col., 2000) y la cepa G de HSV-2 (Talarico y col., 2002, 2003). Las mismas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, USA). La cepa B 2006 de HSV-1 fue un obsequio del Prof. Dr. E. De Clercq (Rega Institute, Leüven, Bélgica).

### 3.2- Preparación de las suspensiones virales

Los stocks de HSV-1 y HSV-2 se propagaron en células Vero, infectando con una multiplicidad de infección de 0,1 UFP/célula. Se dejó adsorber por 1 hora a 37°C. Luego se procedió a retirar el inóculo y se cubrieron las células con MM. Transcurridas 24 horas de incubación a 37°C, se lisaron las células mediante ciclos de congelamiento y descongelamiento. Se almacenó el sobrenadante a -70°C para su posterior uso.

El título de los stocks en células Vero fue del orden de 10<sup>8</sup> UFP/ml para HSV-1 y 10<sup>7</sup> UFP/ml para HSV-2.

## 4- Compuestos ensayados

Los compuestos ensayados son derivados brassinosteroides que fueron sintetizados en el laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, por el grupo de la Dra. Lydia Galagovsky. Los compuestos se sintetizaron a partir del estigmasterol de acuerdo con McMorris y col. (1994); Teme Centurion & Galagovsky (1998) y Ramirez y col. (2000a y b).

Los brassinosteroides se disolvieron en etanol a una concentración de 3 a 5 mg/ml. En el momento de utilizarlos, se efectuaron diluciones de los mismos en medio de cultivo MM. La concentración final de etanol en la solución más concentrada de los compuestos ensayados fue de 16 mg/ml. La CC<sub>50</sub> (concentración citotóxica 50%) del etanol, para las células Vero luego de 72 horas de contacto, es de 360 mg/ml (Wachsmann y col., 2000).

El aciclovir (9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina) (GlaxoWellcome) se solubilizó en dimetil-sulfóxido (DMSO) y se diluyó con MM a una concentración final de 1 mg/ml (Talarico y col., 2002, 2003).

## 5- Ensayo de viabilidad celular

Para determinar la citotoxicidad de los brassinosteroides estudiados se utilizó el ensayo colorimétrico del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio) (Sigma Chemical Co. St. Louis). Este compuesto es clivado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa para dar un compuesto azul (formazan) (Denizot & Lang, 1986).

Monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 96 cavidades, se trataron con diluciones seriadas al medio de los compuestos, por duplicado, durante 24 o 72 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se agregaron 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) en cada cavidad y se incubó a 37°C durante 2 horas. Seguidamente se descartaron los sobrenadantes y los cristales de formazan se disolvieron en 200 µl de etanol. Se determinó la densidad óptica (DO), utilizando un lector de microplacas Eurogenetis P-ri, a una longitud de onda de trabajo de 570 nm (Wachsmann y col., 2000; Talarico y col., 2002, 2003).

Se calculó el porcentaje de viabilidad celular como

$$100 \times \frac{(D.O._{570})_{tratado}}{(D.O._{570})_{control}}$$

considerando como control las células tratadas sólo con el disolvente de los compuestos. Se determinó la concentración del compuesto que reduce el 50% de la viabilidad celular (CC<sub>50</sub>), de la regresión lineal de gráficos del porcentaje de viabilidad celular como función de la concentración del compuesto (Lawetz & Liuzzi, 1998).

## 6- Ensayos antivirales

### 6.1- Titulación de la infectividad viral por el método de UFP (Unidades Formadoras de Placas)

Diluciones seriadas al décimo, por duplicado, del stock viral (100  $\mu$ l de inóculo) se plaquearon en monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades. Se dejó adsorber el virus durante 1 hora a 37°C y se cubrieron las células con medio semisólido. Las microplacas se incubaron durante 48-72 horas a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se fijaron las células en formol 10 % por 15-30 minutos y se revelaron las placas agregando cristal violeta al 1%. Se determinó el título viral según la fórmula:

$$\text{UFP/ml} = n^{\circ} \text{ promedio de placas} / (\text{dilución utilizada} \times \text{volumen de inóculo})$$

### 6.2- Ensayo de reducción del número de placas virales

Monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con 100 UFP de HSV-1 cepa F y B 2006. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo residual y se lo reemplazó por medio semisólido conteniendo diluciones seriadas del brassinosteroide ensayado. Luego de 48-72 horas de incubación en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, se fijaron las células con formol 10% y se revelaron las placas agregando cristal violeta al 1%.

Se determinó la concentración de compuesto que produce un 50% de inhibición en el número de placas virales con respecto al control (CE<sub>50</sub>), extrapolando su valor de la regresión lineal de gráficos del número de placas contadas como función de las distintas concentraciones del derivado (Wachsman y col., 2000).

### 6.3- Ensayo de inhibición del rendimiento viral

Monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con los virus HSV-1 cepa F y HSV-2 cepa G, a una multiplicidad de infección de 1. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C, las células se cubrieron con MM conteniendo diluciones seriadas al medio del brassinosteroide testado. Luego de 24 horas de incubación a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub>, se realizaron ciclos de congelamiento y descongelamiento y los sobrenadantes resultantes se cosecharon y titularon por el método de unidades formadoras de placas (UFP).

Se calculó para los distintos derivados ensayados la concentración efectiva que produce un 50% de inhibición del rendimiento viral respecto del control (CE<sub>50</sub>), extrapolando su valor de la regresión lineal de gráficos del número de placas contadas como función de las distintas concentraciones del derivado (Talarico y col., 2002, 2003).

## 7- Actividad virucida

Se estudió la inactivación directa de HSV-1 cepa F por los compuestos (Wachsman y col., 2000). Se mezclaron 10<sup>6</sup> UFP (100  $\mu$ l) del virus con igual volumen de MM (control) o con MM conteniendo el derivado 1a en dos concentraciones (42 y 420  $\mu$ M), ajustándose el volumen final a 200  $\mu$ l. Se incubaron las muestras a 37°C, durante 0, 30, 60 y 90 minutos. A los tiempos indicados, las muestras se congelaron y posteriormente se estudió la supervivencia viral por el método de UFP.

Se graficó el logaritmo del título viral como función del tiempo de incubación de los tratamientos.

### 8- Estudio del efecto de la adición del compuesto 6b a distintos tiempos post-infección (p.i.)

Monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con el virus HSV-1 cepa F (multiplicidad de infección = 1). Luego de 1 hora de adsorción a 37°C (considerada hora 0 p.i.), se cubrieron las células con MM. A distintas horas p.i. (0, 2, 4, 6, 8 horas) se agregó el compuesto 6b a una concentración 55  $\mu$ M. Las microplacas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C.

Para la determinación del virus extracelular, los sobrenadantes de las células infectadas se cosecharon a las 24 horas p.i. y posteriormente se titularon.

Para la determinación del virus total, otro set de células infectadas y tratadas con el compuesto a distintas horas p.i. se incubó durante 24 horas a 37°C. Luego de realizar ciclos de congelamiento y descongelamiento, se obtuvo el sobrenadante total que se tituló de igual modo que el extracelular (Wachsman y col., 2002b).

### 9- Estudio del efecto del derivado 6b en la adsorción de HSV-1

Para determinar el efecto del compuesto 6b en la adsorción viral, 100 UFP de HSV-1 cepa F se adsorbieron durante 1 hora a 4°C en células Vero confluentes crecidas en microplacas de 24 cavidades en presencia o en ausencia de una concentración 111  $\mu$ M del brassinosteroide. Transcurrido este tiempo, las monocapas se lavaron con solución salina de fosfatos (PBS) y se cubrieron con MM conteniendo 0,7% de metilcelulosa para cuantificar el virus adsorbido. El número de placas se determinó después de 72 horas de incubación a 37°C (Wachsman y col., 2002b).

### 10- Estudio del efecto del derivado **6b** en la penetración de HSV-1

Para determinar el efecto del compuesto **6b** en la penetración viral, 100 UFP de HSV-1 cepa F se adsorbieron durante 1 hora a 4°C en células Vero confluentes crecidas en microplacas de 24 cavidades en presencia o en ausencia de una concentración 111  $\mu$ M del brassinosteroide. Transcurrido este tiempo, la temperatura de incubación se elevó a 37°C. A 0, 15, 30, 45 y 60 minutos las monocapas se lavaron con PBS y se trataron por 1 minuto con buffer citrato (pH 3) para inactivar el virus adsorbido que no entró. Las monocapas se lavaron nuevamente con PBS y se cubrieron con MM conteniendo 0,7% de metilcelulosa. El número de placas se determinó después de 72 horas de incubación a 37°C (Wachsman y col., 2002b).

## Resultados

### 1- Descripción de los derivados brassinosteroides

La estructura de los derivados brassinosteroides ensayados en los trabajos (Wachsman y col., 2000; Wachsman y col., 2002b; Talarico y col., 2002, 2003) se muestra en la Figura 6. La estructura **a** presenta la configuración R,R en los carbonos 22 y 23, mientras que la estructura **b** presenta la configuración S,S en dichos carbonos.

El peso molecular de los compuestos oscila entre 410 y 558 (Tabla 2).

### 2- Evaluación de la citotoxicidad de los brassinosteroides

Como paso previo al estudio de la actividad antiviral de los compuestos, fue importante conocer la citotoxicidad de los mismos en cultivos de células Vero. Con este propósito, se investigó la concentración de compuesto que reduce la viabilidad celular en un 50 % ( $CC_{50}$ ), luego de 24 o 72 horas de incubación a 37°C. El estado de los cultivos fue observado al microscopio óptico y la evaluación cuantitativa de la viabilidad se realizó, según se indica en Materiales y Métodos, por el ensayo del MTT.

Los valores de  $CC_{50}$  que se muestran en la Tabla 2 corresponden a un período de incubación de 24 horas a 37°C. La mayoría de los derivados presentó valores de  $CC_{50}$  mayores que 100  $\mu$ M, con excepción de los compuestos **1a**, **6a**, **12a**, **17b**, **18a**, **26a** y **32b**, que presentaron mayor toxicidad con valores de  $CC_{50}$  de 63, 37, 100, 43, 42, <108 y 33  $\mu$ M, respectivamente (Talarico y col., 2002, 2003). Además, se observa que la estructura **b** de los compuestos resulta menos tóxica que la del respectivo isómero **a**, con excepción de los compuestos **3b**, **17b** y **32b**. Cuando se empleó un período de incubación de 72 horas para los compuestos **1a - 6b** (Wachsman y col., 2000), se obtuvieron valores de  $CC_{50}$  en general menores que los correspondientes a un tiempo de incubación de 24 horas.

Para valorar el efecto de los compuestos sobre la multiplicación viral se utilizó un rango de concentraciones por debajo de la  $CC_{50}$ .

### 3- Evaluación de la actividad antiherpética de los brassinosteroides

Primeramente se estudió la actividad antiherpética de 12 derivados brassinosteroides (**1a - 6b**) frente a las cepas F y B 2006 de HSV-1 utilizando el método de reducción del número de placas virales (Tabla 3) (Wachsman y col., 2000). En un trabajo posterior, se investigaron otros 26 derivados brassinosteroides (**7 - 32**) contra los virus HSV-1 (cepa F) y HSV-2 (cepa G) utilizando el método de inhibición del rendimiento viral para determinar la actividad antiherpética. Además, se determinó la actividad anti-HSV-1 de 11 derivados **1a - 6b** y anti-HSV-2 del compuesto **6b** por este último método (Tablas 4 y 5) (Talarico y col., 2002, 2003). Con un propósito comparativo, se incluyeron en el estudio otros dos compuestos: estigmasterol y aciclovir. El estigmasterol es un esteroide natural (ver fórmula estructural en la figura 6) a partir del cual se sintetizaron los brassinosteroides estudiados. El aciclovir, droga activa contra HSV (Elion, 1982), se utilizó como control positivo.

Se determinó la concentración efectiva 50% ( $CE_{50}$ ) como la concentración de compuesto que inhibe la replicación viral en un 50% respecto del control sin tratar.

Para relacionar el valor de  $CE_{50}$  obtenido con la  $CC_{50}$ , se utilizó el índice de selectividad (IS), que se define como la razón  $CC_{50} / CE_{50}$ . El valor de IS permite evaluar la verdadera efectividad antiviral de los compuestos ensayados.

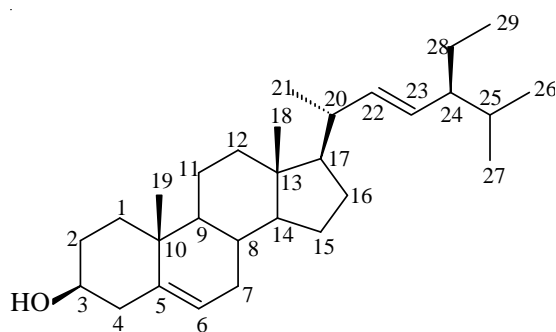
Se observa que los compuestos **1a - 6b** son igualmente activos contra las cepas TK<sup>+</sup> (cepa F) y TK<sup>-</sup> (cepa B 2006) de HSV-1 (Tabla 3). Los valores de IS obtenidos son en general similares para ambas cepas.

A partir de los datos mostrados en las Tablas 4 y 5 se concluye que todos los derivados brassinosteroides resultaron ser considerablemente menos activos que el aciclovir. Los compuestos más activos contra HSV-1 fueron **6b**, **7b** y **12b** que presentaron IS de 100, 80 y 109, respectivamente. Los derivados que

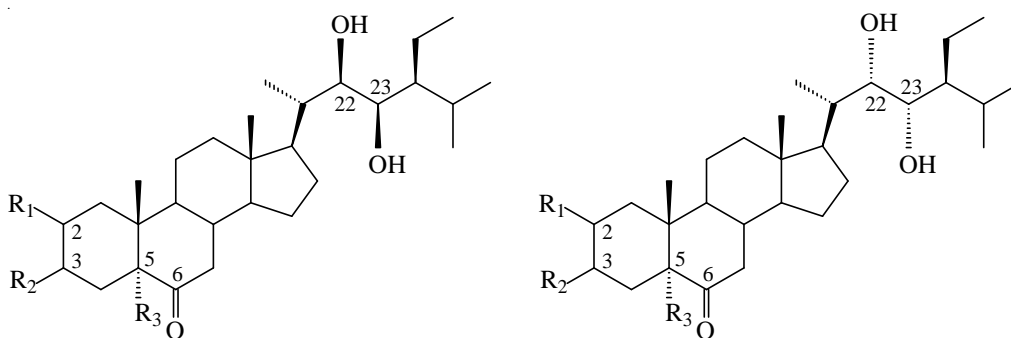
mostraron mayor efecto inhibitorio contra HSV-2 fueron **6b**, **7a**, **7b** y **30a** que presentaron IS de 71, 63, 40 y 39, respectivamente. Es interesante destacar que la mayoría de los derivados brassinosteroides presentó IS, tanto para HSV-1 como para HSV-2, mayores que el estigmasterol (IS = 2 para HSV-1 y HSV-2).

Comparando los valores de  $CE_{50}$  de los compuestos **1a** - **6b** contra HSV-1 (cepa F) obtenidos por los dos métodos de determinación de la actividad antiviral (Tablas 3 y 4), se observa que al utilizar el método de reducción del número de placas virales se obtienen, en general, valores de  $CE_{50}$  mayores que al emplear el método de inhibición del rendimiento viral.

**Figura 6. Fórmulas estructurales de los brassinosteroides ensayados**



estigmasterol



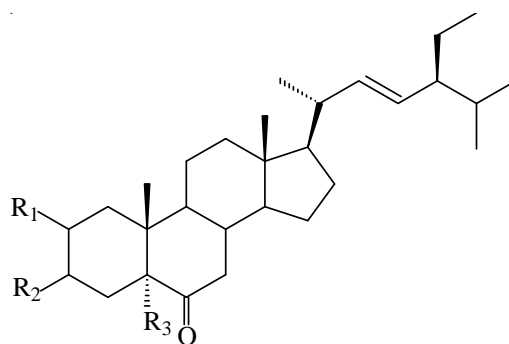
Estructura a (22R, 23R)

Estructura b (22S, 23S)

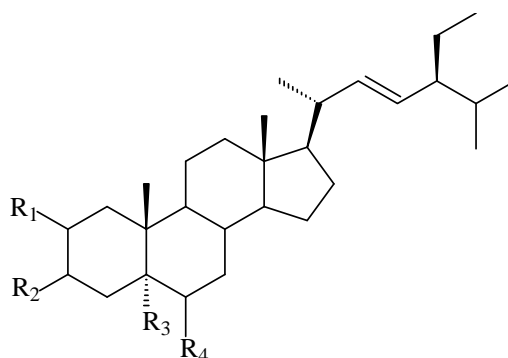
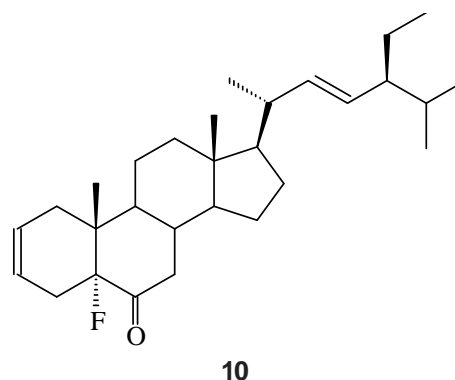
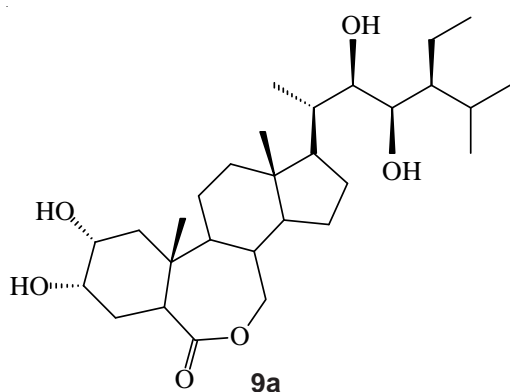
Compuesto	R1	R2	R3
<b>1a</b>	?OH	?OH	H
<b>2a</b>	?OH	?OH	OH
<b>3a</b>	H	?AcO	H
<b>4a</b>	H	?AcO	OH
<b>5a</b>	H	?Br	H
<b>6a</b>	H	?Br	OH
<b>7a</b>	H	?OH	OH
<b>12a</b>	H	?OH	F
<b>17a</b>	H	?F	H
<b>18a</b>	H	?F	OH
<b>22a</b>	H	?F	H
<b>26a</b>	H	?OH	H
<b>30a</b>	H	?OH	H

Compuesto	R1	R2	R3
<b>1b</b>	?OH	?OH	H
<b>2b</b>	?OH	?OH	OH
<b>3b</b>	H	?AcO	H
<b>4b</b>	H	?AcO	OH
<b>5b</b>	H	?Br	H
<b>6b</b>	H	?Br	OH
<b>7b</b>	H	?OH	OH
<b>12b</b>	H	?OH	F
<b>17b</b>	H	?F	H
<b>18b</b>	H	?F	OH
<b>29b</b>	?OH	?OH	F
<b>31b</b>	H	?OH	OH

Figura 6. Fórmulas estructurales de los brassinosteroides ensayados (cont.)



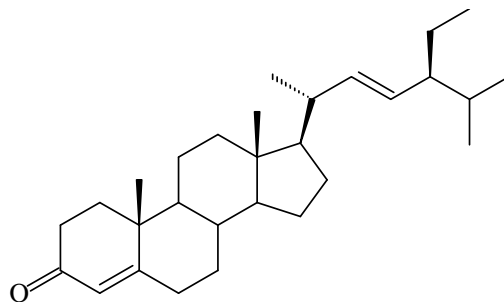
Compuesto	R1	R2	R3
<b>8</b>	H	?OH	OH
<b>11</b>	H	?F	Cl
<b>14</b>	?OH	?OH	H
<b>15</b>	H	?Br	OH



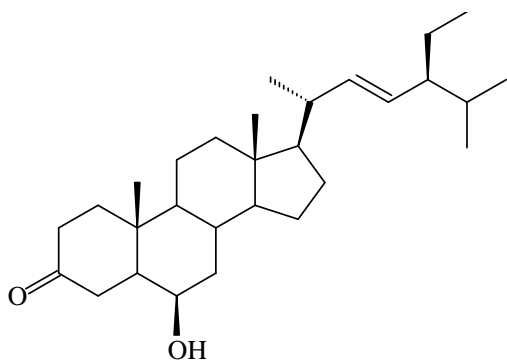
Compuesto	R1	R2	R3	R4
<b>23</b>	H	?Br	Cl	?OH
<b>25</b>	?OH	?OH	H	?F



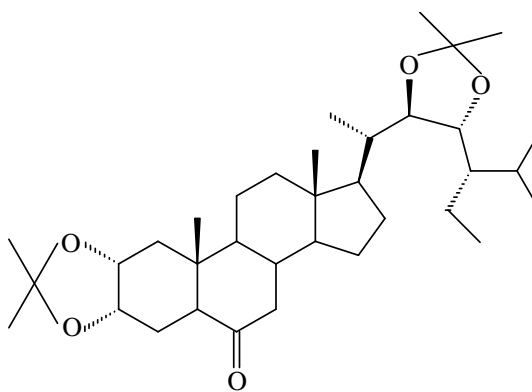
Figura 6. Fórmulas estructurales de los brassinosteroides ensayados (cont.)



24



27



28a

Compuesto	C <sub>2</sub> , C <sub>23</sub>
<b>32a</b>	22R, 23R
<b>32b</b>	22S, 23S

Tabla 2. Citotoxicidad de los compuestos estudiados

Compuesto	Nombre IUPAC	PM	CC50 <sup>†</sup> (μM)
<b>Estigmasterol</b>	(22E)-3?-hidroxiestigmasta-5,22-dieno	412	479
<b>Aciclovir</b>	9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina	225	280
<b>1a</b>	(22R,23R)-2?,3?,22,23-tetrahidroxi-5?-estigmastan-6-ona	478	63
<b>1b</b>	(22S,23S)-2?,3?,22,23-tetrahidroxi-5?-estigmastan-6-ona	478	259
<b>2a</b>	(22R,23R)-2?,3?,5?,22,23-pentahidroxiestigmastan-6-ona	494	263
<b>2b</b>	(22S,23S)-2?,3?,5?,22,23-pentahidroxiestigmastan-6-ona	494	502
<b>3a</b>	(22R,23R)-3?-acetoxi-22,23-dihidroxi-5?-estigmastan-6-ona	504	270
<b>3b</b>	(22S,23S)-3?-acetoxi-22,23-dihidroxi-5?-estigmastan-6-ona	504	226
<b>4a</b>	(22R,23R)-3?-acetoxi-5?,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona	520	230
<b>4b</b>	(22S,23S)-3?-acetoxi-5?,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona	520	462
<b>5a</b>	(22R,23R)-3?-bromo-22,23-dihidroxi-5?-estigmastan-6-ona	525	114
<b>5b</b>	(22S,23S)-3?-bromo-22,23-dihidroxi-5?-estigmastan-6-ona	525	152
<b>6a</b>	(22R,23R)-3?-bromo-5?,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona	541	37
<b>6b</b>	(22S,23S)-3?-bromo-5?,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona	541	277
<b>7a</b>	(22R,23R)-3?,5?,22,23-tetrahidroxiestigmastan-6-ona	478	819
<b>7b</b>	(22S,23S)-3?,5?,22,23-tetrahidroxiestigmastan-6-ona	478	1044
<b>8</b>	(22E)-3?,5?-dihidroxiestigmast-22-en-6-ona	444	901
<b>9a</b>	(22R,23R)-2?,3?,22,23-tetrahidroxi-B-homo-7-oxa-estigmastan-6-ona	494	427
<b>10</b>	(22E)-5?-fluoroestigmasta-2,22-dien-6-ona	428	935
<b>11</b>	(22E)-3?-fluoro-5?-cloroestigmast-22-en-6-ona	465	858
<b>12a</b>	(22R,23R)-5?-fluoro-3?,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona	480	100
<b>12b</b>	(22S,23S)-5?-fluoro-3?,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona	480	160
<b>14</b>	(22E)-2?,3?-dihidroxi-5?-estigmast-22-en-6-ona	444	158
<b>15</b>	(22E)-3?-bromo-5?-hidroxiestigmast-22-en-6-ona	507	139
<b>17a</b>	(22R,23R)-3?-fluoro-22,23-dihidroxi-5?-estigmastan-6-ona	464	215
<b>17b</b>	(22S,23S)-3?-fluoro-22,23-dihidroxi-5?-estigmastan-6-ona	464	43

Tabla 2. Citotoxicidad de los compuestos estudiados (cont.)

Compuesto	Nombre IUPAC	PM	CC50 <sup>†</sup> (μM)
<b>18a</b>	(22R,23R)-3?-fluoro-5?,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona	480	42
<b>18b</b>	(22S,23S)-3?-fluoro-5?,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona	480	250
<b>22a</b>	(22R,23R)-3?-fluoro-22,23-dihidroxi-5?-estigmastan-6-ona	464	301
<b>23</b>	(22E)-3?-bromo-5?-cloro-6?-hidroxiestigmast-22-eno	528	>890
<b>24</b>	(22E)-estigmasta-4,22-dien-3-ona	410	520
<b>25</b>	(22E)-2?,3?-dihidroxi-6?-fluor-5?-estigmast-22-eno	448	>848
<b>26a</b>	(22R,23R)-3?,22,23-trihidroxi-5?-estigmastan-6-ona	462	<108
<b>27</b>	(22E)-6?-hidroxi-5?-estigmast-22-en-3-ona	428	1313
<b>28a</b>	2,3,22,23-bisacetiliden-(22R,23R)-2?,3?,22,23-tetrahidroxi-5?-estigmastan-6-ona	558	1259
<b>29b</b>	(22S,23S)-2?,3?,22,23-tetrahidroxi-5?-fluoroestigmastan-6-ona	496	322
<b>30a</b>	(22R,23R)-3?,22,23-trihidroxi-5?-estigmastan-6-ona	462	1621
<b>31b</b>	(22S,23S)-3?,5?,22,23-tetrahidroxiestigmastan-6-ona	478	254
<b>32a</b>	(22R,23R)-22,23-dihidroxi-estigmasta-4,22-dien-3-ona	444	130
<b>32b</b>	(22S,23S)-22,23-dihidroxi-estigmasta-4,22-dien-3-ona	444	33

†, concentración citotóxica 50 %, o concentración de compuesto requerida para reducir la viabilidad de células Vero no infectadas un 50 %, luego de 24 horas de incubación a 37°C; los datos son el promedio de duplicados.

**Tabla 3. Actividad antiviral de los derivados 1a - 6b contra HSV-1 cepas F y B 2006**

Compuesto	HSV-1 cepa F		HSV-1 cepa B 2006	
	CE50 <sup>†</sup> ( $\mu$ M)	IS <sup>††</sup>	CE50 ( $\mu$ M)	IS
1a	41	5	65	3
1b	23	17	42	9
2a	>40	<1	>40	<1
2b	162	2	92	4
3a	22	11	15	16
3b	>40	<4	>40	<4
4a	58	4	94	2
4b	107	4	174	3
5a	53	5	48	5
5b	30	11	43	8
6a	18	1	13	2
6b	19	15	54	5
Aciclovir	0,3	933	5	52

† concentración efectiva antiviral 50 %, o concentración de compuesto requerida para reducir el número de placas virales en un 50 %; los datos son el promedio de duplicados.

††, índice de selectividad o razón  $CC_{50}/CE_{50}$ , calculado empleando los valores de  $CC_{50}$  determinados con un tiempo de incubación de 72 horas a 37°C.

**Tabla 4. Actividad antiviral contra HSV-1 cepa F**

Compuesto	CE <sub>50</sub> <sup>†</sup> ( $\mu$ M)	IS <sup>††</sup>	Compuesto	CE50 ( $\mu$ M)	IS
Estigmasterol	234	2	12b	1,5	109
Aciclovir	0,3	933	14	79	2
1a	42	2	15	4,9	28
1b	10	26	17a	54	4
2b	32	16	17b	5,5	8
3a	26	11	18a	3,7	11
3b	24	10	18b	16	16
4a	14	17	22a	19	16
4b	27	17	23	>89	10
5a	29	4	24	81	7
5b	27	6	25	>85	10
6a	6,5	6	26a	29	<4
6b	2,8	100	27	58	23
7a	13	63	28a	67	19
7b	13	80	29b	30	11
8	28	32	30a	42	39
9a	15	28	31b	34	8
10	88	11	32a	20	7
11	129	7	32b	2,4	14
12a	37	3			

†, concentración efectiva antiviral 50 %, o concentración de compuesto requerida para inhibir la replicación viral en un 50 %; los datos son el promedio de duplicados.

††, índice de selectividad o razón  $CC_{50}/CE_{50}$ , calculado empleando los valores de  $CC_{50}$  que figuran en la Tabla 2.

Tabla 5. Actividad antiviral contra HSV-2 cepa G

Compuesto	CE50 <sup>†</sup> (μM)	IS <sup>††</sup>	Compuesto	CE50 (μM)	IS
Estigmasterol	234	2	18a	3,8	11
Aciclovir	0,6	467	18b	16	16
6b	3,9	71	22a	19	16
7a	13	63	23	>89	10
7b	26	40	24	>81	<7
8	28	32	25	85	10
9a	30	14	26a	24	<5
10	88	11	27	62	21
11	536	2	28a	44	29
12a	75	1	29b	15	22
12b	5,8	27	30a	41	39
14	79	2	31b	25	10
15	10	14	32a	12	11
17a	108	2	32b	2,9	11
17b	22	2			

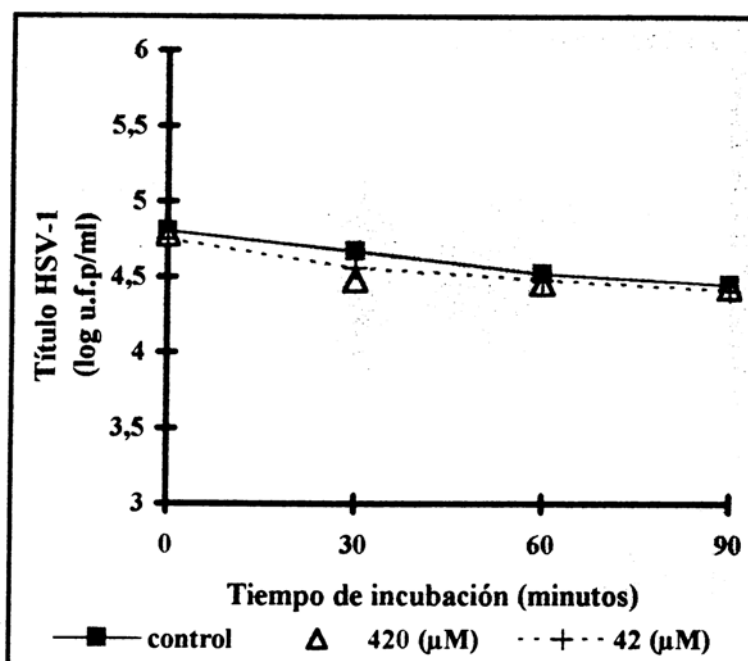
<sup>†</sup>, concentración efectiva antiviral 50 %, o concentración de compuesto requerida para inhibir la replicación viral en un 50 %; los datos son el promedio de duplicados.

<sup>††</sup>, índice de selectividad o razón  $CC_{50}/CE_{50}$ , calculado empleando los valores de  $CC_{50}$  que figuran en la Tabla 2.

#### 4. Actividad virucida contra HSV-1

Para establecer si los brassinosteroides producen un efecto virucida, inactivando al virus por contacto, se procedió a realizar un ensayo in vitro (Wachsman y col., 2000). Como se observa en la Figura 7, no existen diferencias en los títulos virales de HSV-1 (cepa F) entre las muestras tratadas con concentraciones 42 y 420 μM del compuesto 1a y los controles virales sin tratar. Esto indicaría que el derivado 1a no es virucida para el virus HSV-1. En este experimento se utilizó una concentración del compuesto más alta (420 μM) que la empleada en el ensayo de actividad antiviral para descartar un posible efecto virucida. Además, se utilizó una concentración de etanol (disolvente del compuesto) en la cual éste no ejerce efecto virucida o citotóxico. Se trabajó con una concentración de etanol de 2 % v/v.

Figura 7. Estudio del efecto virucida del compuesto 1a sobre HSV-1



10<sup>6</sup> UFP de HSV-1 cepa F se incubaron a 37°C con concentraciones 42 o 420 μM del compuesto 1a durante 0, 30, 60 y 90 min. A los tiempos indicados, los cultivos se congelaron y posteriormente se estudió la infectividad viral remanente por el método de UFP. Cada valor es el promedio de duplicados.

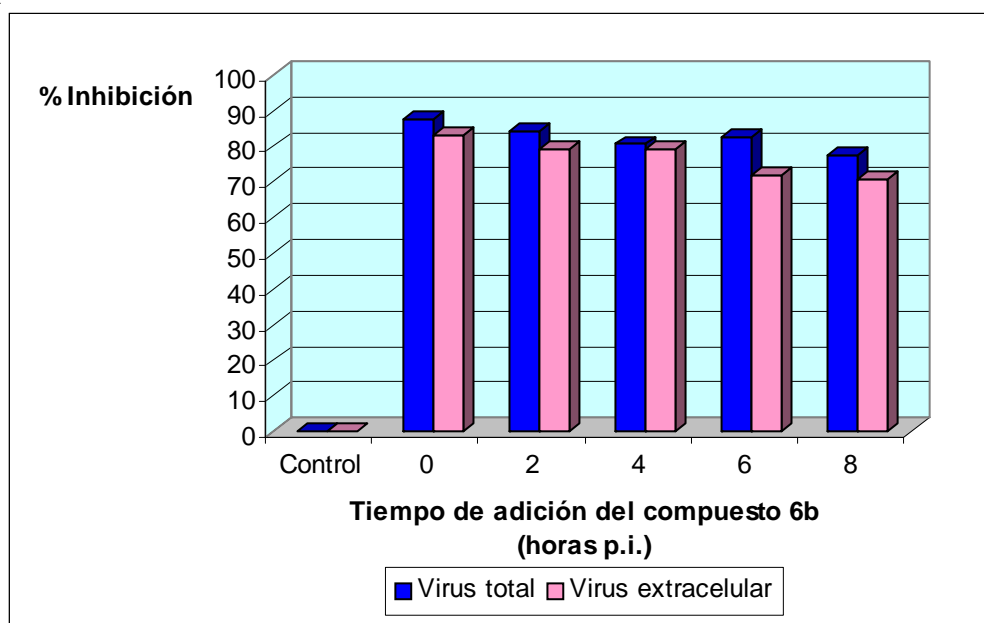
### 5. Efecto de la adición del compuesto 6b a distintos tiempos post-infección (p.i.) sobre la multiplicación de HSV-1

Con el propósito de investigar el momento del ciclo de multiplicación de HSV-1 en el que interfiere el compuesto **6b** (seleccionado por ser uno de los más activos frente a los virus HSV-1 y HSV-2), se examinó la dependencia del efecto inhibitorio de este compuesto con el tiempo de su adición (Wachsman y col., 2002b).

En el experimento se agregó el brassinosteroide, en una concentración 55  $\mu$ M, a distintos tiempos post-infección en células infectadas con HSV-1 cepa F. A las 24 horas p.i., se determinaron los títulos del virus extracelular y del virus total (extracelular y asociado a células).

En la Figura 8 se observa un elevado porcentaje de inhibición del virus extracelular y total cuando el tratamiento con el compuesto **6b** fue comenzado hasta 8 horas después de la infección con el virus, manteniendo el compuesto en el cultivo hasta el final del experimento (24 horas p.i.).

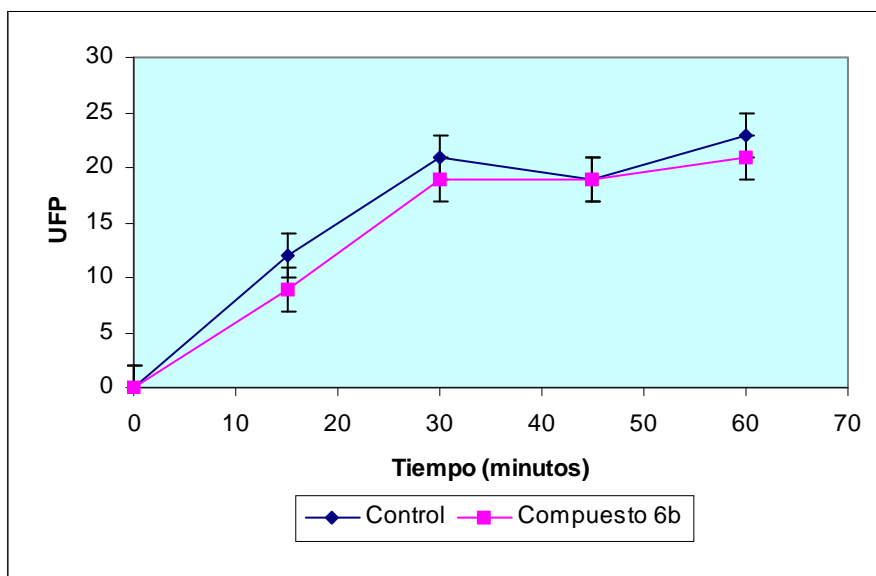
Figura 8. Efecto del tiempo de adición del compuesto 6b sobre la multiplicación de HSV-1 cepa F



El compuesto **6b** (55  $\mu$ M) se adicionó a HSV-1 cepa F a distintos tiempos post-infección. A las 24 horas p.i. se determinaron los títulos del virus extracelular y del virus total (extracelular y asociado a células) para cultivos tratados o control, utilizando un ensayo de placas.

### 6. Estudio del efecto del compuesto 6b sobre las etapas tempranas de la multiplicación de HSV-1

Para determinar si una etapa temprana del ciclo de multiplicación viral se veía afectada por los brassinosteroides, se estudió el efecto del compuesto **6b** sobre la adsorción y la penetración de HSV-1 cepa F (Wachsman y col., 2002b). Se determinó que la adsorción viral no estaba inhibida en presencia de una concentración 111  $\mu$ M del brassinosteroide 6b. Tampoco se obtuvo efecto inhibitorio en la penetración viral en presencia de la misma cantidad del compuesto 6b y no se observó diferencia en la cinética de penetración en presencia y en ausencia del brassinosteroide (Figura 9).

**Figura 9. Cinética de penetración de HSV-1 en ausencia y en presencia del compuesto 6b**

100 UFP de HSV-1 cepa F se adsorbieron por 1 hora a 4°C en presencia o en ausencia de una concentración 111  $\mu$ M del compuesto 6b y luego la temperatura se elevó a 37°C. A los tiempos indicados en el gráfico las monocapas se lavaron con PBS y se trataron por 1 min. con buffer citrato pH 3, se lavaron con PBS nuevamente y se cubrieron con MM conteniendo 0,7 % de metilcelulosa. El número de placas se determinó después de 72 horas de incubación a 37°C. Cada valor es el promedio de duplicados.

## Discusión

La búsqueda de nuevos fármacos es un área de investigación actualmente en expansión, por cuanto el bienestar de los seres humanos mediante la curación y prevención de enfermedades es una de las mayores prioridades de la sociedad en su conjunto. El primer paso en la determinación del potencial biológico de un compuesto es realizar una evaluación preliminar que permita identificar si el mismo presenta algún grado de actividad. Hasta hace 4 años, no se habían informado en la bibliografía datos de actividad antiviral de los brassinosteroides.

Los brassinosteroides, reguladores naturales del crecimiento vegetal, se ensayaron como hormonas promotoras del crecimiento de las plantas en más de 20 bioensayos típicos para fitohormonas como las auxinas, giberelinas o citoquinas (Brosa, 1997). A partir de datos bibliográficos que incluyen estudios sobre la actividad antiviral de esteroides vegetales sulfatados (Roccatagliata y col., 1996), la acción inhibitoria *in vitro* de derivados oxigenados del colesterol frente a los virus HIV-1 y HIV-2 (Moog y col., 1998) y teniendo en cuenta la similitud química entre los brassinosteroides y las hormonas esteroideas animales (Mandava, 1988) se emprendió una evaluación de la actividad antiviral de los brassinosteroides frente a una serie de virus de distinta composición genómica. Se incluyeron en el estudio los virus herpes simplex tipo 1 TK<sup>+</sup> y TK<sup>-</sup> (TK, timidinoquinasa), Junín (VJ) y Tacaribe (Wachsman y col., 2000). Los compuestos ensayados (1-6) inhibieron la multiplicación de los Arenavirus (Junín y Tacaribe) *in vitro* con buenos índices de selectividad (IS comprendidos entre 18 y 692), así como también ejercieron una acción moderada en la multiplicación de los virus de la familia *Herpesviridae* (IS > 10 para algunos derivados, ver Tabla 3). Teniendo en cuenta estos resultados, se continuó la investigación evaluando la actividad antiviral de los derivados brassinosteroides frente al virus Sarampión. Los 27 brassinosteroides testeados (1-22) mostraron IS comprendidos entre 1 y 60 (Wachsman y col., 2002a). También se siguió con el estudio de la actividad antiherpética, evaluando la actividad anti-HSV-1 y HSV-2 de 26 nuevos derivados (Tablas 4 y 5) (Talarico y col., 2002, 2003).

En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antiherpética de los derivados brassinosteroides (Wachsman y col., 2000; Wachsman y col., 2002b; Talarico y col., 2002, 2003).

La infección por HSV se caracteriza por una enfermedad aguda primaria, seguida por el desarrollo de una infección latente que convierte a los individuos en reservorios susceptibles de presentar nuevos episodios por reactivación del virus asentado en las neuronas de los ganglios sensoriales. El HSV-1 es la causa más

común de encefalitis en los Estados Unidos. Con respecto a las infecciones del tracto genital por HSV-2, éstas producen lesiones dolorosas y ulcerosas que frecuentemente son recurrentes en el paciente normal y pueden ser particularmente severas en pacientes inmunocomprometidos (Kern, 1997). Las terapias habituales para el tratamiento de las infecciones por HSV se basan predominantemente en análogos de nucleósidos como el aciclovir, los cuales ejercen un efecto antiviral selectivo basándose en las diferencias entre las maquinarias de replicación viral y celular. Como consecuencia del uso de estos antivirales en tratamientos prolongados, aún en los casos de gran especificidad y escasa toxicidad, aparecen mutantes resistentes a las drogas (Damonte, 1996). Es por este motivo que no ha cesado la búsqueda de compuestos con actividad antiherpética.

Los índices de selectividad (IS) de los brassinosteroides ensayados por Talarico y col. (2002, 2003) oscilan entre 2 y 109 para HSV-1 (F) y 1 y 71 para HSV-2 (G). Todos los derivados brassinosteroides presentaron valores de IS, tanto para HSV-1 como para HSV-2, menores que el del aciclovir (IS = 933 para HSV-1 y 467 para HSV-2). Sin embargo, los índices de selectividad obtenidos son similares al del foscarnet, que es un antiviral usado en tratamiento clínico (Beadle y col., 1998). Además, los resultados obtenidos en este trabajo permitieron realizar un análisis de relación estructura - actividad (REA) para los distintos brassinosteroides frente a los virus HSV-1 y HSV-2 (Talarico y col., 2002, 2003).

A partir de la estructura química de los compuestos (Figura 6), se observa que la estereoquímica de la cadena lateral parece jugar un rol importante en la citotoxicidad, ya que la mayoría de los brassinosteroides con configuración 22S,23S (estructura **b**) resultó ser menos citotóxica que los que presentan la configuración 22R,23R (estructura **a**), con excepción de los compuestos **3**, **17** y **32** (Tabla 2). La presencia de un grupo  $\beta$ -hidroxi en el C3 (anillo A) también se relaciona con una baja citotoxicidad, como puede observarse en los compuestos **7a**, **7b**, **8** y **30a** que presentan valores de CC<sub>50</sub> de 819, 1044, 901 y 1621  $\mu$ M, respectivamente. Asimismo, se encontró que los compuestos **8**, **10**, **11**, **23**, **24**, **25** y **27**, que contienen un doble enlace entre los carbonos 22 y 23, presentan baja citotoxicidad, con valores de CC<sub>50</sub> de 901, 935, 858, >894, 520, >848 y 1313  $\mu$ M, respectivamente. Además, se observa que el compuesto **28a**, que presenta el grupo isopropiliden en C22, C23, posee baja citotoxicidad. Estos resultados sugieren que la presencia del grupo dihidroxi en C22, C23 contribuye a aumentar la citotoxicidad.

Al comparar los pares de compuestos **7a** con **12a**, **7b** con **12b** y **2b** con **29b** se observa que el reemplazo del grupo 5 $\beta$ -hidroxi por 5 $\beta$ -fluor aumenta la citotoxicidad, aunque la sola presencia del grupo 5 $\beta$ -fluor no es suficiente para producir una citotoxicidad alta (compuesto **10**). En general, los derivados brassinosteroides halogenados en C-3 (compuestos **5a**, **5b**, **17b**, **6a**, **18a**, **6b** y **18b**) son más citotóxicos que los análogos con un grupo acetoxi en la misma posición (**3a**, **3b**, **4a** y **4b**).

Con respecto a la actividad antiviral, en el caso del virus HSV-1 (cepa F) los índices de selectividad mayores se correlacionan con compuestos de estructura **b**, excepto para los compuestos **3** y **4** (Tablas 3 y 4). Tanto para los virus HSV-1 (F) como HSV-2 (G), la presencia de un doble enlace entre C22 y C23, así como la protección del grupo dihidroxi en dichos carbonos por un grupo isopropiliden conduce, en general, a una CE<sub>50</sub> alta y, a pesar de que la CC<sub>50</sub> es alta, se obtiene un IS bajo (ver compuestos **10**, **11**, **14**, **23**, **24**, **25**, **27**, **28a** y el estigmasterol) (Tablas 4 y 5). Además, comparando el compuesto **6b** con el **15**, los compuestos **7a** y **7b** con el **8** y el derivado **1b** con el **14**, se observa que la presencia de un doble enlace entre los carbonos 22 y 23 disminuye el IS con respecto a los compuestos que presentan el grupo dihidroxi. Este efecto sobre el IS se observa para HSV-1 y HSV-2 en los dos primeros casos, y para HSV-1 en el último caso.

Comparando las estructuras y los índices de selectividad de los compuestos **3a**, **3b**, **5a**, **5b**, **17a**, **17b** y **30a** con los correspondientes a los derivados **4a**, **4b**, **6a**, **6b**, **18a**, **18b** y **7a** se observa que una sustitución en C5 generalmente aumenta el índice de selectividad para HSV-1, con excepción de los compuestos **1b** y **2b**.

De los compuestos evaluados, los brassinosteroides **6b**, **7b** y **12b** muestran en general la mejor relación estructura – actividad, con valores de IS de 100, 80 y 109 para HSV-1 y 71, 40 y 27 para HSV-2, respectivamente.

Con referencia al efecto antiviral de los derivados brassinosteroides, al ensayar el compuesto **1a** frente a HSV-1 se observó que la acción inhibitoria no se debió a una inactivación directa (Figura 7), indicando que un paso de la multiplicación viral estaría siendo afectado (Wachsman y col., 2000). Con respecto al modo de acción de los derivados brassinosteroides, el alto porcentaje de inhibición obtenido al agregar el compuesto **6b** hasta 8 horas post-infección con HSV-1 (Figura 8) y la ausencia de efecto inhibitorio de **6b** en la adsorción y la penetración viral (Figura 9) (Wachsman y col., 2002b) sugieren que uno de los estadios que está alterado en la multiplicación de HSV-1 podría ser tardío, indicando que el mecanismo de acción diferiría del correspondiente al aciclovir (Elion, 1982). Estudios complementarios que incluyen la inhibición de la síntesis y expresión de proteínas virales tardías (Wachsman y col., 2002b) refuerzan estos resultados.

Actualmente, se está analizando la actividad antiviral de varias combinaciones del compuesto **6b** y el aciclovir *in vitro*, con el objeto de identificar aquellas combinaciones que puedan presentar una mayor actividad antiviral contra HSV-1 (Wachsman & Talarico, resultados no publicados). El tratamiento con combinaciones de drogas antivirales que actúan sobre distintas etapas del ciclo de multiplicación viral ha sido propuesto como una de las posibles alternativas para intentar reducir la probabilidad de aparición de mutantes virales resistentes a los compuestos de uso clínico. Además, aquellas combinaciones que exhiben interacciones sinérgicas aumentan la eficacia de la actividad antiviral y disminuyen la citotoxicidad al reducirse las dosis terapéuticas requeridas de cada droga (Schinazi y col., 1986). La aparición de variantes virales resistentes por tratamiento prolongado con una droga ha sido observada en el caso de las infecciones herpéticas en pacientes inmunocomprometidos tratados con aciclovir, siendo la cepa timidinoquinasa deficiente (TK<sup>-</sup>) la más frecuente en la clínica (Crumpacker, 1989; Cohen Stuart y col., 1998; Balfour, 1999). Los derivados brassinosteroides **1-6** han mostrado ser activos frente a la cepa TK<sup>-</sup>, como se observa en la Tabla 3 (Wachsman y col., 2000).

Dado el grado de avance logrado en las investigaciones *in vitro* acerca de la actividad antiviral de los brassinosteroides, se abordaron simultáneamente estudios *in vivo*, tendientes a evaluar eventuales aplicaciones farmacológicas de estos compuestos. Se evaluó la actividad antiviral *in vivo* de los derivados **6b**, **12b** y **32b**, utilizando un modelo experimental de queratitis herpética (QH) estromal murina (Alché y col., 2002). La QH es una respuesta inflamatoria crónica que ocurre como secuela de la infección con HSV-1, siendo la primera causa de ceguera en los países industrializados. Esta enfermedad ha sido reproducida y caracterizada a través de la infección corneal de ratones con HSV-1. Los resultados de los ensayos muestran que los compuestos **12b** y **32b** no presentarían un efecto antiviral *in vivo*, sino que estarían actuando como inmunosupresores cuando son aplicados en el momento de la aparición de los primeros signos clínicos de la QH.

## Conclusión

Los resultados presentados en este trabajo marcan el camino para continuar con los estudios de actividad antiherpética y citotoxicidad de las combinaciones de los brassinosteroides bioactivos con el aciclovir frente a las cepas F y TK<sup>-</sup> de HSV-1, como así también frente a HSV-2. Resulta muy alentadora la posibilidad de encontrar combinaciones que potencien los efectos del aciclovir sobre cepas mutantes resistentes, teniendo en cuenta la alta tasa de selección de dichas mutantes en pacientes con SIDA.

El conocimiento de los mecanismos de acción antiviral de los brassinosteroides podrá permitir, más adelante, analizar por química computacional la interacción sustrato-sitio activo, constituyendo este tipo de estudios una de las fronteras del desarrollo científico en Química Medicinal.

Los brassinosteroides evaluados en este estudio representan una nueva clase de compuestos que resultó ser moderadamente activa frente a HSV-1 y HSV-2, en concentraciones que no fueron tóxicas para las células huésped. Este conjunto de compuestos servirá como punto de partida de los estudios teóricos de estructura-actividad (RCEA), que permitirán delinear el diseño racional de nuevos análogos. A partir de los estudios de relación estructura-actividad (REA) y RCEA se buscará desarrollar una nueva clase de inhibidores potentes y selectivos de HSV.



## Bibliografía

- Abe H., Marumo S. *Brassinosteroids in leaves of Dystilyum racemosum Sieb et Zucc.: The beginning of brassinosteroid research in Japan.* En: Cutler H.G., Yokota T., Adam G. (eds.). *Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications.* ACS Symposium Series N° 474, American Chemical Society, Washington DC, 1991: 18-23.
- Aguilar J.S., Rice M., Wagner E.K. *The Polysulfonated Compound Suramin Blocks Adsorption and Lateral Diffusion of Herpes Simplex Virus Type-1 in Vero Cells.* *Viol.* (1999); **258**: 141-151.
- Alché L., Pifarré P., Berra A., Wachsmann M., Ramirez J., Galagovsky L. *Efecto de brassinosteroides obtenidos por síntesis química sobre el desarrollo de la queratitis herpética murina.* VII Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires, 23-25 de septiembre de 2002: P 23.
- Amoros M., Simoes C.M.O., Girre L., Sauvager F., Cormier M. *Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis.* *J. Nat. Prod.* (1992); **55** (12): 1732-1740.
- Andrei G., De Clercq E. *Quimioterapia de las infecciones virales.* En: Basualdo J.A., Coto C.E., de Torres R.A. (eds.). *Microbiología biomédica*, 1ª ed. Editorial Atlante S.R.L., Buenos Aires, 1996: 616-625.
- Baba M., Snoeck R., Pauwels R., De Clercq E. *Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus and human immunodeficiency virus.* *Antimicrob. Agents Chemother.* (1988a); **32**: 1742-1745.
- Baba M., Pauwels R., Balzarini J., Arnout J., Desmyter J., De Clercq E. *Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988b); **85**: 6132-6136.
- Baghian A., Kousoulas K.G. *Role of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> pump in the herpes simplex type 1 – induced cell fusion: melittin causes specific reversion of syncytial mutants with the syn 1 mutation to Syn+ (wild-type) phenotype.* *Viol.* (1993); **196**: 548-556.
- Balbes L.M., Mascarella S.W., Boyd D.B. *A Perspective of Modern Methods in Computed Aided Drug Design.* En: Lipkowitz K., Boyd D. (eds.). *Reviews in Computational Chemistry* **5**, cap. 8, 1994.
- Balfour H.H. *Antiviral Drugs.* *Drug Therapy* (1999); **340** (16): 1255-1268.
- Beadle J.R., Kini G.D., Aldern K.A., Gardner M.F., Wright K.N., Richman D.D., Hostetler K.Y. *Alkylthioglycerol prodrugs of foscarnet: synthesis, oral bioavailability and structure-activity studies in human cytomegalovirus, herpes simplex virus type 1-infected cells.* *Antiviral Chem. Chemother.* (1998) **9**: 33-40.
- Bean B. *Antiviral Therapy: Current Concepts and Practices.* *Clin. Microbiol. Rev.* (1992); **5** (2): 146-182.
- Beutler J.A., McKee T.C., Fuller R.W., Tischler M., Cardellina II J.H., Snader K.M., McCloud T.G., Boyd M.R. *Frequent occurrence of HIV-inhibitory sulphated polysaccharides in marine invertebrates.* *Antiviral Chem. Chemother.* (1993); **4** (3): 167-172.
- Bourgougnon N., Lahaye M., Chermann J.C., Kornprobst J.M. *Composition and antiviral activities of a sulfated polysaccharide from Schizymenia dubyi (Rhodophyta, Gigartinales).* *Bioorg. Med. Chem. Letts.* (1993); **3**: 1141-1146.
- Brosa C. *Biological Effects of Brassinosteroids.* En: Parish E.J., Nes D. (eds.). *Biochemistry and Functions of Sterols.* CRC Press, Boca Raton, 1997.
- Carlucci M.J., Pujol C.A., Ciancia M., Nosedá M., Matulewicz M.C., Damonte E.B., Cerezo A.S. *Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed Gigartina skottsbergii and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity.* *Int. J. Biol. Macromol.* (1997); **20**: 97-105.
- Carlucci M.J., Ciancia M., Matulewicz M.C., Cerezo A.S., Damonte E.B. *Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types.* *Antiviral Res.* (1999); **43**: 93-102.
- Clouse S.D., Zurek, D. *Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development.* En: Cutler H.G., Yokota T., Adam G. (eds.). *Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications.* American Chemical Society Symposium Series N° 474, American Chemical Society, Washington DC, 1991: 122-140.
- Clouse S.D., Hall A.F., Langford M., McMorris T.C., Baker M.E. *Physiological and molecular effects of brassinosteroids on Arabidopsis thaliana.* *J. Plant Growth Regul.* (1993); **12**: 61-66.
- Cohen Stuart J.W., Boucher C.A.B., Cooper D.A., Galasso G.J., Richman D.D., Thomas H.C., Whitley R.J. *Summary of the III International Consensus Symposium on Combined Antiviral Therapy.* *Antiviral Res.* (1998); **38**: 75-93.
- Crumpacker C.S. *Molecular Targets of Antiviral Therapy.* *The New England J. Medicine* (1989); **321** (3): 163-172.

- Cutler H.G. *Advances in the Use of Brassinosteroids*. En: *Natural and engineered pest management agents*, Chapter 7, American Chemical Society, 1994: 85-102.
- Damonte E.B., Neyts J., Pujol C.A., Snoeck R., Andrei G., Ikeda S., Witvrouw M., Haines H., Matulewicz M.C., Cerezo A., Coto C.E., De Clercq E. *Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata**. *Biochem. Pharmacol.* (1994); **47**: 2187-2192.
- Damonte E.B., Matulewicz M.C., Cerezo A.S., Coto C.E. *Herpes simplex virus inhibitory sulfated xylogalactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata**. *Chemother.* (1996); **42**: 57-64.
- Damonte E.B. *Agentes antivirales que actúan en las etapas tempranas del ciclo viral*. *Revista Argentina de Microbiología* (1996); **28**: 204-216.
- Darby G. *A history of antiherpes research*. *Antiviral Chem. Chemother.* (1994); **5**, Supplement 1: 3-9.
- Darby G. *In search of the perfect antiviral*. *Antiviral Chem. Chemother.* (1995); **6**, Supplement 1: 54-63.
- De Clercq E. *Therapeutic potential of Cidofovir (HPMPC, Vistide) for the treatment of DNA virus infections*. Uit"verhandelingen van de Koninklijke Academie Voor Geneeskunde Van België" (1996); **58**: 19-49.
- De Cristófano M.A., Livellana B.I., de Torres R.A. *Herpes Virus*. En: Basualdo J.A., Coto C.E., de Torres R.A. (eds.). *Microbiología biomédica*, 1ª ed. Editorial Atlante S.R.L., Buenos Aires, 1996: 655-690.
- Denizot F., Lang R. *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival*. *J. Immunol. Methods* (1986); **89**: 271-277.
- Duarte M.E.R., Nosedá D.G., Nosedá M.D., Tulio S., Pujol C.A., Damonte E.B. *Inhibitory effect of sulfated galactans from the marine alga *Bostrychia montagnei* on herpes simplex virus replication in vitro*. *Phytomedicine* (2001); **8** (1): 53-58.
- Elion G.B. *Mechanism of action and selectivity of acyclovir*. *American Journal of Medicine* (1982); **73**, Supplement 1A: 7-13.
- Feldman S.C., Reynaldi S., Stortz C.A., Cerezo A.S., Damonte E.B. *Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis**. *Phytomedicine* (1999); **6** (5): 335-340.
- Flint S.J., Enquist L.W., Krug R.M., Rocaniello V.R., Skalka A.M. *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. Asm. Press, Washington, 2000: 662-714.
- Franz G. *Polysaccharides in Pharmacy: Current Applications and Future Concepts*. *Planta Med.* (1989); **55**: 493-497.
- Fujioka S., Sakurai A. *Brassinosteroids*. *Natural Product Reports* (1997); **14**: 1-10.
- Fukuchi K., Sakagami H., Okuda T., Hatano T., Tanuma S., Kitajima K., Inoue Y., Inoue S., Ichikawa S., Nonoyama M., Konno K. *Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds*. *Antiviral Res.* (1989); **11**: 285-298.
- Griffiths P.D. *Progress in the clinical management of herpesvirus infections research*. *Antiviral Chem. Chemother.* (1995); **5**, Supplement 1: 3-9.
- Grove M.D., Spencer G.F., Rohweadder W.K., Mandava N, Worlwy J.F., Warthen J.D., Steffens G.Z., Flippen-Anderson J.L., Cook J.C. Jr. *Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen*. *Nature* (1979); **281**: 21-217.
- Hayashi K., Hayashi T., Morita N. *Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginkgetin*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1992); **36** (9): 1890-1893.
- Herold B.C., Visalli R.J., Susmarski N., Brandt C.R., Spear G. *Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B*. *J. Gen. Virol.* (1994); **75**: 1211-1222.
- Jones P.S. *Strategies for antiviral drug discovery*. *Antiviral Chem. Chemother.* (1998); **9**: 283-302.
- Kern E.R. *Preclinical Evaluation of Antiviral Agents*. En: Galasso G.J., Whitley R.J., Merigan T.C. *Antiviral Agents and Human Viral Diseases*, 4th edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997.
- Lawetz C., Liuzzi M. *The antiviral activity of the ribonucleotide reductase inhibitor BILD 1351 SE in combination with acyclovir against HSV type-1 in cell culture*. *Antiviral Res.* (1998); **39**: 35-46.
- Mandava N.B. *Plant growth-promoting brassinosteroids*. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (1988); **39**: 23-52.
- McMorris T.C., Donaubauer J.R., Silveira M.H., Molinsky T.F. *Synthesis of brassinolide*. En: Cutler H.G., Yokota T., Adam G. (eds.). *Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. ACS Symposium Series N° 474, ACS, Washington DC, 1991: 36-42.
- McMorris T.C., Patil T.A., Chavez R.G., Baker M.E., Clouse S.D. *Synthesis and biological activity of 28-homobrassinolide and analogs*. *Phytochem.* (1994) **36**: 585-589.
- Mertz G.J. *Herpes Simplex Virus Infections*. En: Galasso G.J., Whitley R.J., Merigan T.C. *Antiviral Agents and Human Viral Diseases*, 4th edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997: 305-341.
- Montanha J.A., Amorós M., Boustie J., Girre L. *Anti-herpes virus activity of Aporphine Alkaloids*. *Planta Med.* (1995); **61**: 419-424.

- Moog C., Aubertin A.M., Kim A., Luu B. Oxysterols, but not cholesterol, inhibit human immunodeficiency virus replication in vitro. *Antiviral Chem. Chemother.* (1998); **9**: 491-496.
- Murphy F.A. Virus Taxonomy. En: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). *Fundamental Virology*, 3<sup>rd</sup> edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996: 15-57.
- Neyts J., Snoeck R., Schols D., Balzarini J., Eska J.D., Schepdael A.V., De Clercq E. Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate. *Viol.* (1992); **189**: 48-58.
- Pujol C.A., Errea M.I., Matulewicz M.C., Damonte E.B. Antiherpetic activity of S1, an algal derived sulfated galactan. *Phytotherapy Res.* (1996); **10**: 410-413.
- Pujol C.A., Estevez J.M., Carlucci M.J., Ciancia M., Cerezo A.S., Damonte E.B. Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. *Antiviral Chem. Chemother.* (2002); **13**: 83-89.
- Ramirez J.A., Gros E.G., Galagovsky L.R. Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogues. *Steroids* (2000a); **65**: 329-337.
- Ramirez J.A., Gros E.G., Galagovsky L.R. Synthesis of analogues of 28-homocastasterone, 28-homotyphasterol and 28-homoteasterone. Effects of heteroatom substituents at C-5 on bioactivity. *Tetrahedron* (2000b); **56**: 6171-6180.
- Renard-Nozaki J., Kim T., Imakura Y., Kihara M., Kobayashi S. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on herpes simplex virus. *Res. Virol.* (1989); **140**: 115-128.
- Roccatagliata A.J., Maier M.S., Seldes A.M., Pujol C.A., Damonte E.B. Antiviral sulfated steroids from the ophiuroid *Ophioplocus januarii*. *J. Nat. Prod.* (1996); **59**: 887-890.
- Roizman B., Sears A.E. Herpes Simplex Viruses and Their Replication. En: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds.). *Fundamental Virology*, 3<sup>rd</sup> edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996: 1043-1107.
- Scheuer P.J. *Marine Natural Products and Biomedicine*. *Med. Res. Reviews* (1989); **9** (4): 535-545.
- Scheuer P.J. *Marine Natural Products Research: a look into the dive bag*. *J. Nat. Prod.* (1995); **58** (3): 335-343.
- Schinazi R.F., Chou T.C., Scott R.T., Yao X., Nahmias A.J. Delayed treatment with combinations of antiviral drugs in mice infected with Herpes simplex virus and application of the median effect method analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1986); **30**: 491-498.
- Schmidt J., Altmann T., Adam G. Brassinosteroids from seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem.* (1997); **45**: 1325-1327.
- Schols D., Pauwels R., Desmutter J., De Clercq E. Dextran sulfate and other polyanionic anti-HIV compounds specifically interact with the viral gp120 glycoprotein expressed by T-cells persistently infected with HIV-1. *Viol.* (1990); **175**: 556-561.
- Talarico L.B., Ramirez J., Galagovsky L.R., Wachsman M.B. Estudios de relación estructura-actividad de distintos brassinosteroides obtenidos por síntesis química frente a los virus herpes simplex tipo 1 y tipo 2. VII Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires, 23-25 de septiembre de 2002: P 24.
- Talarico L.B., Ramirez J.A., Galagovsky L.R., Wachsman M.B. Structure-activity relationship studies in a set of new brassinosteroid derivatives assayed against herpes simplex virus type 1 and 2 in cell cultures (enviado a *Medical Chemistry Research*, 2003).
- Teme Centurión O.M., Galagovsky L.R. Alternative synthesis of 24(S)-homoethylcastasterone from stigmasterol. *Anales de la Asociación Química Argentina* (1998); **86**: 104-109.
- Wachsman M.B., Fariás M.E., Takeda E., Sesma F., de Ruiz Holgado A.P., de Torres R.A., Coto C.E. Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. *Int. J. Antimicrob. Agents* (1999); **12**: 293-299.
- Wachsman M.B., López E.M.F., Ramirez J.A., Galagovsky L.R., Coto C.E. Antiviral effect of brassinosteroids against herpes virus and arenaviruses. *Antiviral Chem. Chemother.* (2000); **11**: 71-77.
- Wachsman M.B., Ramirez J.A., Galagovsky L.R., Coto C.E. Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against Measles virus in cell cultures. *Antiviral Chem. Chemother.* (2002a); **13**: 61-66.
- Wachsman M.B., Castilla V., Talarico L.B., Ramirez J., Galagovsky L.R., Coto C.E. Estudio de la actividad antiherpética del compuesto (22S,23S)-3?-bromo-5?,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona in-vitro. VII Congreso Argentino de Virología, Buenos Aires, 23-25 de septiembre de 2002 (b): CO 25.
- Whitley R.J., Griffiths P.D. Cytomegalovirus Infections in the Immunocompromised Host. En: Galasso G.J., Whitley R.J., Merigan T.C. *Antiviral Agents and Human Viral Diseases*, 4<sup>th</sup> edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997: 257-278.
- Witvrouw M., Este J.A., Quinones Mateu M.E., Reymen D., Andrei G., Snoeck R., Ikeda S., Pauwels R., Vittori Bianchini N., Desmyter J., De Clercq E. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Antiviral Chem. Chemother.* (1994) **5**: 297-303.

- Wong C.K., Leung K.N., Fung K.P., Choy Y.M. Immunomodulatory and Anti-tumor Polysaccharides from Medical Plants. *J. Inter. Med. Res.* (1994); **22**: 299-312.
- Yokota T., Ogino Y., Suzuki H., Takahashi N., Saimoto H., Fujioka S., Sakurai A. Metabolism and biosynthesis of brassinosteroids. En: Cutler H.G., Yokota T., Adam G. (eds.). *Brassinosteroids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. American Chemical Society, Washington DC, 1991: 86-96.
- Yokota T. The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Science* (1997); **2**: 137-143.