



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR MÉDICA**

---

**“ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ESTEROIDES DE SÍNTESIS QUÍMICA  
FRENTE A INFECCIONES CAUSADAS POR VIRUS DE  
IMPORTANCIA EN LA SALUD HUMANA”**

**REALIZADO POR: María José Gallardo**

**Trabajo de tesis para optar por el título de Magister en Biología Molecular Médica**

**DIRECTORA:** Dra. Laura Edith Alché

**DIRECTORA ADJUNTA:** Dra. Flavia Mariana Michelini

**LUGAR DE TRABAJO:** Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Virología: agentes antivirales y citoprotectores, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN)

**2016**

## **Actividad biológica de esteroides de síntesis química frente a infecciones causadas por virus de importancia en la salud humana**

Más del 90% de todas las enfermedades humanas son causadas por infecciones virales para la mayoría de las cuales no existen vacunas profilácticas. Para los Adenovirus (AdV), que producen infecciones agudas respiratorias y queratoconjuntivitis, entre otras, no existen antivirales específicos y la ribavirina se utiliza sólo en situaciones clínicas específicas. Otro virus de importancia clínica es el Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), causante de infecciones oro-faciales, queratitis estromal y encefalitis. Si bien el tratamiento de elección para el HSV-1 es el aciclovir, presenta la limitación terapéutica de la aparición de cepas mutantes resistentes a dicho antiviral. Los azasteroides son análogos de esteroides para los que se han descrito interesantes propiedades biológicas, como anticancerígena, antifúngica y antibacteriana. Algunos análogos azasteroides evaluados en nuestro laboratorio presentan actividad antiviral de amplio espectro. Los objetivos del presente trabajo son evaluar la actividad antiviral de nuevos azasteroides frente a AdV y HSV-1, investigar la etapa del ciclo de multiplicación viral en la que actúan los compuestos activos y analizar su actividad inmunomoduladora/antiinflamatoria.

Los azasteroides de la serie U-20 mostraron actividad antiviral frente a AdV y HSV-1. Dicha actividad inhibitoria no se debe a una acción virucida. Los compuestos no afectan la adsorción ni la internalización de las partículas virales, sino que estarían inhibiendo etapas tempranas y tardías de la multiplicación viral, incluyendo la síntesis de proteínas. Asimismo, el compuesto U20-1 es capaz de modular la secreción de citoquinas proinflamatorias.

En conclusión, los nuevos azasteroides sintéticos analizados presentan una doble actividad como antivirales e inmunomoduladores, lo cual los hace candidatos ideales para tratar inmunopatologías de origen viral como la queratoconjuntivitis adenoviral y la queratitis estromal herpética.

**Palabras claves:** azasteroides, antiviral, inmunomodulador, AdV, HSV-1, inmunopatologías.

## **Biological activity of synthetic steroids against infections caused by virus of human health importance**

More than 90% of all human diseases are caused by viral infections for most of which no prophylactic vaccines exist. There are no specific antivirals for Adenoviruses (AdV), which produce acute respiratory infections and keratoconjunctivitis, among others, and ribavirin is used only in specific clinical situations. Another virus of clinical importance is Herpes simplex type 1 (HSV-1), which causes oral-facial infections, stromal keratitis and encephalitis. Although the treatment of choice against HSV-1 is acyclovir, it presents the therapeutic limitation of the appearance of mutant strains resistant to this antiviral. Azasteroids are steroid analogues for which interesting biological properties have been described, such as anticancer, antifungal and antibacterial. Some azasteroid analogs evaluated in our laboratory have broad spectrum antiviral activity. The aim of this work is to evaluate the antiviral activity of new azasteroids against AdV and HSV-1, to investigate the stage of the viral multiplication cycle in which the active compounds act and to analyze their immunomodulatory/anti-inflammatory activity.

U-20 series azasteroids showed antiviral activity against AdV and HSV-1. Such inhibitory activity is not due to a virucidal action. The compounds do not affect the adsorption or internalization of the viral particles, but they would be inhibiting early and late stages of viral multiplication, including protein synthesis. Also, compound U20-1 is able to modulate the secretion of pro-inflammatory cytokines.

In conclusion, the synthetic azasteroids analyzed have a dual activity as antivirals and immunomodulators, which make them ideal candidates for treating immunopathologies of viral origin such as adenoviral keratoconjunctivitis and herpetic stromal keratitis.

**Key words:** azasteroids, antiviral, immunomodulator, AdV5, HSV-1, immunopathologies.

*A mis padres*

## AGRADECIMIENTOS

A Laura y Flavia por guiarme durante el proceso de este trabajo, por enseñarme con mucha paciencia y aconsejarme para tomar las mejores decisiones. Muchas gracias.

A Carlitos, por toda la ayuda brindada y por resolver más de una duda.

A Nadia, por ser más que mi amiga, por su preocupación y compañía, por todos los momentos compartidos y las charlas interminables.

A Maxi, por ponerle toda la buena onda a qb18.

A Guille, por sus consejos y buen sentido del humor en los almuerzos.

A todos quienes forman parte del Viro Team: Erina, Susana, Andrea, Lau, Ceci, Sandra, Cybele, Neli, July, Carlos, José, Fede, Lua, Clau, Vivi, Luis, Elsa, Nieves, Ema, Verito, Josefina y Diana.

A mi papá y mamá por todo su esfuerzo, su apoyo y motivación para cumplir una meta más, por su confianza y sobre todo por su amor incondicional.

A mi familia, especialmente a Diego, Lady, Gabriel, Alfonso y María por estar siempre al pendiente de mí.

A Carito y Andre que a pesar de la distancia siempre estuvieron cuando las necesité.

A todas las lindas amistades que hice en este hermoso país, por hacerme sentir como en casa.

A todos quienes me dieron ánimos desde Ecuador.

<b>ABREVIATURAS</b> .....	iii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Virus de importancia en la salud humana.....	3
1.2. Adenovirus.....	5
1.2.1. Ciclo de replicación viral .....	7
1.3. Herpes simplex tipo 1.....	11
1.3.1. Ciclo de replicación viral .....	13
1.3.2. Latencia .....	15
1.4. Antivirales.....	16
1.4.1. Antivirales de amplio espectro .....	19
1.4.2. Análogos de esteroides - Azasteroides .....	21
<b>HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>OBJETIVOS</b> .....	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
4.1. Células .....	28
4.2. Virus.....	29
4.3. Compuestos.....	29
4.4. Ensayo de Citotoxicidad .....	30
4.5. Ensayo de Proliferación Celular.....	31
4.6. Ensayo de inhibición del rendimiento viral .....	31
4.7. Titulación por el método de formación de placas (UFP).....	32
4.8. Mecanismo de Acción .....	32
4.8.1. Acción Virucida.....	32
4.8.2. Ensayo de Adsorción .....	33
4.8.3. Ensayo de Internalización .....	33
4.9. Ensayo de agregado de compuesto a distintos tiempos post-infección.....	33

4.10.	Imunofluorescencia Indirecta (IFI).....	34
4.11.	Western Blot (WB).....	35
4.12.	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) directo.....	35
4.13.	Análisis estadístico.....	36
<b>RESULTADOS</b> .....		<b>37</b>
5.1.	Efecto de los compuestos sobre las células .....	38
5.1.1.	Citotoxicidad .....	39
5.1.2.	Efecto de los azasteroides sobre la proliferación celular .....	41
5.2.	Actividad antiviral.....	42
5.2.1.	Efecto de los compuestos sobre la multiplicación viral .....	42
5.2.2.	Actividad virucida de los azasteroides sintéticos.....	45
5.2.3.	Efecto de los azasteroides sobre la adsorción viral .....	46
5.2.4.	Efecto de los azasteroides en la internalización del virus .....	47
5.2.5.	Efecto de los azasteroides agregados a distintos tiempos p.i. ....	49
5.2.6.	Efecto del compuesto U20-1 sobre la expresión y localización intracelular de las proteínas virales.....	50
5.3.	Actividad inmunomoduladora.....	57
5.3.1.	Efecto del compuesto U20-1 sobre la secreción de IL-8 en células A549 infectadas con AdV5.....	57
5.3.2.	Efecto de U20-1 sobre la secreción de citoquinas en células inflamatorias activadas.....	58
<b>DISCUSIÓN</b> .....		<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....		<b>70</b>

## **ABREVIATURAS**

**ACP:** Acción citopática

**ACV:** Aciclovir

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AdV:** Adenovirus

**AdV5:** Adenovirus humano tipo 5

**ANOVA:** Análisis de varianza

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**ATP:** Trifosfato de adenosina

**BRs:** Brassinosteroides

**BSAA:** Agentes antivirales de amplio espectro

**CAR:** Coxsackie B adenovirus receptor

**CC:** Control celular

**CC<sub>50</sub>:** Concentración citotóxica 50

**CE<sub>50</sub>:** Concentración efectiva 50

**CMV:** Citomegalovirus

**CPN:** Complejo de poro nuclear

**CV:** Control virus

**DHEA:** Dehidroepiandrosterona

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DO:** Densidad óptica

**EA:** Epiandrosterona

**EBV:** Virus de Epstein-Barr

**ECP:** Efecto citopático

**ELISA:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

**FCV:** Famciclovir

**FDA:** Agencia de drogas y alimentos

**FOS:** Foscarnet

**GTPasa:** Guanosina trifosfatasa

**h:** horas

**Ha:** Hipótesis alternativa

**hAdV:** Adenovirus humanos

**HBV:** Virus de la hepatitis B

**hCMV:** Citomegalovirus humano

**HCV:** Virus de la hepatitis C

**HHV:** Herpesvirus humano

**HIV:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**Ho:** Hipótesis nula

**h.p.i.:** Horas post-infección

**HSV:** Virus Herpes simplex

**ICP:** Proteína de la célula infectada

**IFI:** Inmunofluorescencia indirecta

**IFIT:** Proteína inducida por interferón con repeticiones tetratricopeptídicas

**IFITM:** Proteína transmembrana inducida por interferón

**Ig:** Inmunoglobulinas

**IMPDH:** Inosina monofosfato deshidrogenasa

**IRA:** Infecciones respiratorias agudas

**IS:** Índice de selectividad

**kDa:** KiloDaltons

**Kpb:** Kilopares de bases

**LATs:** Transcritos asociados a latencia

**m.i.:** Multiplicidad de infección

**MDa:** MegaDaltons

**MEM:** Medio esencial mínimo

**MHC-I:** Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I

**MM:** Medio de mantenimiento

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio

**ND:** No determinado

**nm:** Nanómetros

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**p.i.:** Post-infección

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Buffer fosfato salino

**PCV:** Penciclovir

**PK:** Proteína quinasa

**PKA:** Proteína quinasa A

**PKC:** Proteína quinasa C

**PM:** Peso molecular

**PMA:** Forbol 12-miristato 13-acetato

**PMN:** Polimorfonucleares

**PN:** Poros nucleares

**PT:** Proteína terminal

**PVDF:** Fluoruro de polivinilideno

**QCA:** Queratoconjuntivitis adenoviral

**QEH:** Queratitis estromal herpética

**RMC:** Reacciones de múltiples componentes

**rpm:** Revoluciones por minuto

**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute

**RSV:** Virus sincicial respiratorio

**SDRA:** Síndrome de dificultad respiratoria aguda

**SFB:** Suero fetal bovino

**SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia humana

**SNC:** Sistema nervioso central

**SNP:** Sistema nervioso periférico

**TLR:** Receptor tipo Toll

**U-4CR:** Reacción de Ugi de 4 componentes

**UFP:** Unidad formadora de placa

**VACV:** Valaciclovir

**VZV:** Virus varicela zóster

**WB:** Western Blot

**μM:** Micromolar

# INTRODUCCIÓN

---

La virología ha tenido una historia notable, a pesar de que no fue sino hasta fines de 1880 que se determinó la existencia de los virus, a los que se les atribuye una gran variedad de enfermedades. Por lo que sabemos, todos los organismos vivos están infectados por virus. Estos microorganismos tienen la capacidad de producir cambios significativos sobre todo ser viviente, incluidos ellos mismos (Knipe & Howley, 2013). Más del 90% de todas las enfermedades humanas pueden ser causadas por infecciones virales entre las cuales los resfríos comunes, gripe, diversas enfermedades debidas a los virus herpes (herpes labial, genital, mononucleosis infecciosa, varicela y el herpes zóster), neumonías virales, hepatitis, fiebre amarilla, dengue, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y algunos tipos de cáncer son las más destacadas. De hecho, prácticamente cada parte de nuestro cuerpo es susceptible a infecciones causadas por virus, desde la cabeza (meningitis y encefalitis virales) hasta la planta de los pies (verrugas plantares) (Norkin, 2010).

Los virus son una de las principales causas no sólo de enfermedad sino también de muerte en todo el mundo. A pesar de las medidas de Salud Pública y las vacunas, que son las formas más efectivas para la prevención y eliminación de estas enfermedades, aún hay muchas que no se pueden prevenir. Es por ello que para estas enfermedades se han desarrollado drogas antivirales. Varios de estos fármacos han tenido un gran éxito en salvar vidas y aliviar el sufrimiento, transformando una enfermedad mortal progresiva en una condición manejable.

A pesar de estos éxitos, son relativamente pocas las enfermedades para las cuales se han desarrollado medicamentos antivirales eficaces. Esto se debe a que los blancos farmacológicos virales son muy específicos (como las polimerasas de virus) y sólo unos pocos fármacos antivirales desarrollados contra un virus determinado han resultado efectivos frente a otros. Algunos virus establecen infecciones latentes, como los herpesvirus, otros establecen infecciones persistentes, como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), razón por la cual el tratamiento de estas infecciones en su fase activa no alcanza para curar al paciente. Los virus respiratorios pueden causar síntomas similares, por lo que el diagnóstico es difícil y los tratamientos poco beneficiosos. A veces las infecciones virales son controladas rápidamente por la respuesta inmune del hospedador y otras, hasta el momento, son incurables (Knipe & Howley, 2013).

En ciertos casos, la respuesta inmune del hospedador puede agravar el curso de la enfermedad provocando severos daños en el tejido infectado como en el caso de la queratoconjuntivitis adenoviral (QCA) causada por Adenovirus (AdV) (González-López *et al.*, 2013) y la queratitis estromal herpética (QEH) producida por

el virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), haciendo que el tratamiento se enfoque no solo en la eliminación del virus sino también en la regulación del sistema inmune (Alejandre-Alba *et al.*, 2008).

### 1.1. Virus de importancia en la salud humana

Uno de los virus de importancia en la salud humana es el AdV. Puede infectar y replicar en varios sitios del tracto respiratorio, así como también en el tracto gastrointestinal, los ojos y la vejiga. A veces puede causar enfermedad en el Sistema Nervioso Central (SNC). En general, las infecciones son autolimitadas y sus características dependen del hospedador y del serotipo involucrado (Carballal & Oubiña, 2015).

Los cuadros de faringitis por AdV se presentan especialmente en niños pequeños, y se caracterizan por fiebre, tos, congestión nasal, amigdalitis y garganta inflamada. Los AdV también causan laringitis, bronquiolitis, crup y SDRA (síndrome de dificultad respiratoria aguda) (Norkin, 2010). La mayoría de las infecciones primarias por AdV se producen durante los primeros 5 años de vida debido a la falta de inmunidad humoral. En los niños las infecciones por AdV representan hasta el 15% de las infecciones de vías respiratorias superiores y aproximadamente hasta el 5% de las enfermedades inflamatorias del tracto respiratorio inferior (Hong *et al.*, 2001).

Los AdV pueden infectar el tracto digestivo ya que son resistentes a su bajo pH, a las proteasas gastrointestinales y a la acción emulsionante de los detergentes biliares. Están presentes en el 15% de todos los pacientes hospitalizados con gastroenteritis. En el caso de las infecciones oculares, existen dos síndromes clínicos bien definidos de la QCA: la fiebre faringoconjuntival y la queratoconjuntivitis epidémica (Ghebremedhin, 2014). El 70% de las consultas oftalmológicas se deben a la QCA, altamente contagiosa y fácilmente diseminable en instalaciones comunales como piscinas o lugares públicos. La transmisión se da de persona a persona, por fomites, la inoculación directa a través de instrumentos, los dedos y soluciones (Romero *et al.*, 2010). En la población pediátrica presenta relevante importancia (Ghebremedhin, 2014). La afección viral causada en la córnea por estas infecciones puede llegar a desencadenar daños importantes como fotofobia y pérdida de agudeza visual. La QCA se caracteriza por tener un cuadro de inicio lento y predominantemente unilateral, aunque puede hacerse bilateral hasta en un 70% de

los casos. En el curso de la infección se observa enrojecimiento y quemosis conjuntival, petequias e incluso verdaderas hemorragias subconjuntivales. El cuadro inflamatorio dura entre 1 y 4 semanas. Entre las complicaciones más frecuentes se encuentran: la aparición de pseudomembranas (coágulos de exudados que se adhieren a las conjuntivas), infiltrados subepiteliales y precipitados queráticos (células inflamatorias adheridas al endotelio de la córnea). Se cree que son debidos a una respuesta inmunitaria celular frente a antígenos del AdV (González-López *et al.*, 2013; Tsagakataki *et al.*, 2013).

Los AdV también se han asociado con las infecciones urogenitales, provocan cervicitis, uretritis, y cistitis. Establecen comúnmente infecciones persistentes en el riñón y el virus puede ser eliminado a través de la orina durante meses o años (Norkin, 2010). En ocasiones, estos virus también pueden causar enfermedades en otros órganos como el páncreas, miocardio y el SNC donde pueden estar implicados en meningoencefalitis (Knipe & Howley, 2013).

Otro virus de importancia en Salud Humana es el Herpesvirus (HSV). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), los virus Herpes infectan al 90 % de la población, siendo el más frecuente el HSV- 1. A diferencia de los virus que se propagan por vía respiratoria o fecal-oral, la propagación del HSV-1 depende del contacto humano estrecho e incluso íntimo. El virus puede ser transmitido por besar o compartir utensilios o toallas. La infección primaria puede ser leve o inaparente y cuando la enfermedad se produce, por lo general es de carácter benigno (Norkin, 2010).

Las infecciones oro-faciales primarias aparecen entre 2 y 20 días después del contacto con una persona infectada. Las lesiones de la boca consisten en vesículas dolorosas sobre una base roja, hinchada, en los labios, encías, paladar o lengua. Las lesiones se ulceran y el dolor puede ser intenso. Normalmente se curan en un lapso de 10 a 14 días. HSV viaja desde la piel durante la infección primaria al ganglio trigémino, donde establece latencia. Puede reactivarse debido a diversos estímulos tales como el estrés, la fiebre, la exposición al sol, temperaturas extremas, la inmunosupresión o trauma (Usatine & Tinitigan, 2010).

En la infección ocular sucede de manera similar, después de la infección primaria en los ojos el virus multiplica en el epitelio de la córnea, viaja al ganglio trigémino y allí establece la infección latente. Las infecciones recurrentes ocurren en la edad adulta y pueden dar origen a la QEH, causando discapacidad visual y ceguera infecciosa (Bauer *et al.*, 2002). La QEH tiende a ser más grave en países en desarrollo, donde la desnutrición, otras enfermedades y la falta de acceso al

tratamiento afectan el curso de la enfermedad (Kaye & Choudhary, 2006). La incidencia de la QEH es de aproximadamente 40.000 nuevos casos al año produciendo deficiencia visual y ceguera monocular grave (Faroog & Shukla, 2012). Los síntomas más comunes son dolor en los ojos, sensibilidad a la luz y la sensación arenosa en el ojo. Sin un tratamiento rápido puede ocurrir la cicatrización de la córnea (Usatine & Tinitigan, 2010). La patogénesis de las lesiones se debe sobre todo a la intervención del sistema inmune (Alejandre-Alba *et al.*, 2008). La presencia persistente de HSV-1 en la córnea proporciona una fuente continua de antígenos virales que estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias, quemoquinas, factores de crecimiento y la invasión de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en la córnea. Este proceso es responsable de la cicatrización, el adelgazamiento y la neovascularización corneal (Kaye & Choudhary, 2006). El HSV-1 tiene la capacidad de establecer infecciones latentes también en la córnea, generándose así una fuente de infección en los bancos de ojos y trasplantes de córnea (Faroog & Shukla, 2012).

Además, el HSV-1 es la causa de la encefalitis viral no epidémica más común, con una incidencia de 2 o 3 casos en un millón al año sin ninguna variación estacional. Se han descrito casos de encefalitis por HSV-1 posterior a neurocirugías para tratar la epilepsia no controlada (Monteiro de Almeida *et al.*, 2015).

Es importante destacar que las infecciones causadas tanto por AdV como por HSV-1 agravan la situación de pacientes inmunocomprometidos especialmente en aquellos infectados por el HIV (Munawwar & Singh, 2016; Cohen *et al.*, 2016; Hoeben & Uil, 2013).

### 1.2. Adenovirus

Los AdV fueron observados por primera vez en 1953 como producto de una investigación en busca del agente causal del catarro común. Se aislaron de adenoides y amígdalas de niños y de reclutas militares con enfermedad respiratoria febril aguda. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Pertenecen a la Familia *Adenoviridae* e infectan tanto humanos como animales y se subdividen en cuatro Géneros: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Mastadenovirus* y *Siadenovirus*. El género *Mastadenovirus* infecta mamíferos incluyendo humanos, simios, bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caninos y murinos. Tiene al menos 19 subtipos pero solamente 7 de ellos (A-G) se asocian con infecciones en humanos. Los adenovirus humanos (HAdV) son una causa importante de infecciones en individuos

inmunocompetentes e inmunodeprimidos (Lion, 2015; Carballal & Oubiña, 2015). Dentro de estos subgrupos se identifican actualmente 67 distintos serotipos de virus (70 de acuerdo con el genbank: <http://hadvwg.gmu.edu/>), los cuales son identificados basándose en su capacidad de hemaglutinación y neutralización serológica (Ghebremedhin, 2014).

Los AdV persisten en los individuos infectados y se reactivan en niños y adultos inmunocomprometidos conduciendo a enfermedades graves (Norkin, 2010). En Argentina los AdV son el segundo patógeno viral de importancia después del virus sincicial respiratorio (RSV) en las infecciones agudas del tracto respiratorio inferior en niños menores de 5 años. Aunque pueden presentar índices de mortalidad superiores a los observados para infecciones con otros virus, la mayoría de los pacientes se recuperan de las infecciones respiratorias agudas (IRA) bajas que provocan.

Los AdV poseen genoma ADN doble cadena, lineal y no segmentado, de 30.000 a 45.000 pb y con un peso molecular (PM) que oscila entre los 20 y 30 MDa, que presenta repeticiones nucleotídicas terminales invertidas de aproximadamente 100 pb. En el extremo 5' de cada cadena se encuentra una proteína de 55 kDa unida covalentemente que cumple la función de cebador para el inicio de la replicación viral (Carballal & Oubiña, 2015).

Son virus sin envoltura con un diámetro entre 70 y 100 nm, estructura icosaédrica con 252 capsómeros (240 hexones y 12 pentones) y, hacia el extremo de cada pentámero, se encuentran proteínas alargadas denominadas fibras. El dominio en el extremo C-terminal de la fibra se une al receptor de las células hospedadoras (Lion, 2015).

Los polipéptidos estructurales del virión se designan con números romanos: el hexón, pentón y fibra (polipéptidos II, III y IV) son los constituyentes principales de la cápside. Cada hexón está constituido por tres cadenas idénticas de polipéptido II, y cada fibra por tres unidades idénticas de polipéptido IV (Carballal & Oubiña, 2015). Los polipéptidos IIIa, VI, VIII, y IX se unen a hexones y pentones para ayudar a estabilizar el virión (Mangel & San Martín, 2014). Dentro del núcleo, el genoma viral se condensa en asociación con las proteínas V, VII y X, y el extremo 5' del ADN está unido covalentemente a la proteína terminal (PT) (Jason *et al.*, 2010).

Los genes de todos los AdV codifican para tres proteínas virales necesarias para la replicación del ADN: la PT, ADN polimerasa viral y la proteína de unión al ADN de simple cadena. Además presenta seis unidades de transcripción temprana

(E1A, E1B, E2A, E2B, E3, y E4), cuatro unidades de transcripción intermedias transcritas en el inicio de la replicación del ADN viral (IX, IVa2, L4 intermedio y E2 tardía), y una unidad de transcripción tardía que se procesa para generar cinco familias de los ARNm tardíos (L1-L5) (Knipe & Howley, 2013).

### 1.2.1. Ciclo de replicación viral

El AdV al igual que otros virus respiratorios, ingresa al tracto respiratorio en forma de aerosol generado por tos o estornudos o por medio de la saliva (Norkin, 2010).

El ciclo de replicación se divide por convención en dos fases que se separan por el inicio de la replicación del ADN viral. La primera etapa (etapa temprana) comienza tan pronto como el virus infectante interactúa con la célula hospedadora e incluye la adsorción, penetración, el movimiento de partículas de virus parcialmente sin revestir a un complejo del poro nuclear (CPN), el transporte de ADN viral a través del CPN, y la expresión de un conjunto inicial de genes. Por ejemplo, en las células HeLa infectadas con una multiplicidad de 10 unidades formadoras de placas (UFP) por célula, la primera fase dura 6 horas, después de lo cual se detecta la primera replicación del ADN viral.

Concomitantemente con el inicio de la replicación del ADN viral se inicia la segunda etapa (etapa tardía) del ciclo de replicación con la expresión de genes virales tardíos y el ensamblaje de los viriones. La duración de un ciclo infeccioso completo en células HeLa dura entre 24 y 36 horas, al final del cual se generan 105 partículas de virus por célula, junto con la síntesis de proteínas y ADN virales en exceso que no se ensamblan (Knipe & Howley, 2013).

Los AdV utilizan distintos receptores celulares para la unión, adsorción e internalización en la célula hospedadora. Así, los subtipos de AdV A, C, D, E y F (pero no el subtipo B) median la unión de la fibra viral con la proteína transmembrana de alta afinidad CAR (Coxsackie B Adenovirus Receptor). CAR es un receptor de células epiteliales perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y se expresa abundantemente en corazón, páncreas, SNC y sistema nervioso periférico (SNP), próstata, testículo, pulmón, hígado e intestino delgado. Tiene una muy baja o nula expresión en tejido hematopoyético.

La estructura cristalina de HAdV-12 obtenida mediante rayos X muestra la unión del complejo entre la fibra de HAdV-12 y el dominio (D1) N-terminal de CAR, observándose que tres moléculas CAR se unen a tres monómeros de fibras en la misma superficie. La interacción fibra-CAR tiene dos funciones: la unión inicial de los viriones a las células hospedadoras durante la infección y la diseminación de los viriones progenie hacia células no infectadas. Los AdV-2 se unen al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y los AdV-5 se unen a la integrina  $\alpha_M\beta_2$ . La unión de diferentes serotipos a CAR, o MHC-I, o  $\alpha_M\beta_2$  no es suficiente para promover la entrada de los AdV: la mayoría necesitan la unión a correceptores, tales como la vitronectina  $\alpha_v$ , integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ .

Mientras CAR, MHC-I o la integrina  $\alpha_M\beta_2$  sirven para capturar al virus, los correceptores activan la endocitosis para su entrada en la célula hospedadora. Esta endocitosis es mediada por clatrina y requiere de guanosina trifosfatasa (GTPasa) y el complejo proteico adaptador de clatrina AP2.

El subtipo B de AdV, en contraste con los demás, une sus fibras a los receptores celulares primarios CD46, y entra en las células a través de una interacción de la base pentón con las integrinas  $\alpha_v$  que estimula una vía alternativa independiente de clatrina, un mecanismo de endocitosis llamado macropinocitosis.

La cápside viral se modifica por disminución del pH debido a la fusión con los lisosomas, hay ruptura de la vesícula endocítica y liberación de los componentes virales en el citoplasma incluyendo las proteínas IIIa, VIII, IX, la base de penton, algunas de las proteínas de hexones y activación de la cistein proteasa p23. Cuando se produce el desnudamiento, el genoma viral unido a la proteína del core VII es importado hacia el núcleo. La proteína VI promueve la permeabilización de la membrana endosomal, mecanismo independiente del pH a diferencia del desmontaje de las proteínas virales.

Las partículas de subviriones liberados en el citosol se transportan al núcleo a través de microtúbulos. La motilidad ocurre por la activación transitoria de la proteína quinasa A (PKA) mediante la integrina de señalización y la activación de la p38 MAP quinasa y su diana MAP quinasa activada por la proteína quinasa 2 (MK2).

La cápside sufre su desmontaje final en el CPN y el genoma viral entra en el núcleo. El desmontaje final es necesario ya que las cápsides adenovirales miden de 70 a 100 nm de diámetro y son considerablemente grandes respecto a otras entidades que son importadas a través de CPN (39 nm de diámetro). La liberación de la proteína VII al núcleo facilita la transcripción del genoma viral infectante.

La expresión génica temprana de AdV desencadena 3 efectos. El primero es el de inducir a la célula hospedadora a entrar en la fase S del ciclo celular; el segundo, es la creación de sistemas virales que protegen a la célula infectada de varias defensas antivirales del organismo hospedador y el tercero es la de la síntesis de productos de genes virales, necesarias para la replicación del ADN viral (Knipe & Howley, 2013; Norkin, 2010).

Se han identificado 6 regiones de transcripción tempranas que se localizan en ambas cadenas de ADN complementarias: E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4. La primera proteína que se expresa es E1A y funciona como transactivador de algunos genes celulares y virales, e inhibidor de otros, para permitir la replicación del ADN viral. El ADN viral codifica para un total de 8 unidades de transcripción diferentes, la mayoría de las cuales generan un grupo complejo de ARNm con diferentes *splicing* que codifican para múltiples proteínas (Carballal & Oubiña, 2015).

La expresión de E1A no requiere la síntesis previa de ninguna proteína viral. Se sabe que E1A no sólo activa la expresión de otros genes virales tempranos, sino que también, mediante la unión a la proteína del retinoblastoma (Rb), hace posible la activación del factor de transcripción E2F, desencadenando la síntesis de ADN viral y celular (Dallaire *et al.*, 2015).

La proteína E1A auto activa la transcripción de la región E1A alrededor de cinco veces, estimula la transcripción de la proteína E1B diez veces y, en el caso de las proteínas E2 temprana, E3 y E4, aumenta la transcripción aproximadamente cien veces. La activación requiere una interacción estable y altamente específica de la región única de la proteína E1A y la región conservada 3 (CR3) con la subunidad MED23 del complejo mediador de la transcripción. Las proteínas E1A grande y pequeña, a través de sus secuencias comunes, pueden estimular  $G_0$ - y  $G_1$ -deteniendo las células en fase S en ausencia de otras señales (Knipe & Howley, 2013).

Los genes tardíos de AdV son aquellos que alcanzan su mayor tasa de expresión después de la replicación del ADN viral (Norkin, 2010). Los ARNm de las 5 regiones de transcripción tardía L1, L2, L3, L4 y L5, codifican todas las proteínas estructurales del virus, con excepción de los polipéptidos IX y IVa2 (Carballal & Oubiña, 2015). Cada una de las familias de ARNm tardíos se genera a partir del mismo promotor y se procesan a partir del mismo pre-ARNm. L1 – L5 se distinguen sobre la base de cuál de los cinco sitios de poliadenilación en el pre-ARNm utilizan (Norkin, 2010). Cada familia consta de ARNm empalmados alternativamente que contienen 201 nucleótidos sin traducir, generados a partir del empalme de tres

exones cortos a un exón más largo, que contiene un marco de lectura abierto que generalmente no es interrumpido por intrones, excepto en el caso de la L4-33K ARNm.

La expresión de esta gran familia de ARNm tardíos es controlada por un promotor tardío principal. Este promotor presenta un bajo nivel de actividad poco después de la infección, pero se convierte en varios cientos de veces más activo en las últimas etapas del ciclo multiplicación. Al menos habría dos componentes distintos que contribuyen a la activación retardada de este promotor: un cambio de acción en *cis* en el cromosoma viral dependiente de la replicación del ADN viral y la expresión de dos factores que realizan la transcripción codificada por el virus (Knipe & Howley, 2013).

Para la duplicación del ADN, la ADN pol utiliza la proteína de 55 kDa unida covalentemente al extremo 5' como cebador; la duplicación de ambas cadenas se realiza de manera semiconservativa.

Los ARNm que se producen salen hacia el citoplasma y la maquinaria de traducción los convierte en proteínas para ser trasladadas nuevamente al núcleo donde comienza el ensamblaje. Las partículas virales recién formadas constituyen agregados cristalinos en forma de cuerpos de inclusión intranucleares (Carballal & Oubiña, 2015).

La replicación del ADN viral junto con la producción de grandes cantidades de los polipéptidos estructurales de AdV, preparan el escenario para el ensamblaje del virus. Se suprime la traducción de los ARNm celulares y se estimula la traducción de los ARNm virales. La proteína L4-100 kDa actúa como una chaperona para facilitar el plegado de hexones y como un andamio para facilitar el montaje de trímeros. Se ensamblan en el citoplasma los capsómeros, una base de pentón y una fibra para posteriormente formar un capsómero-pentón completo. Después, hexones y pentones se importan al núcleo, donde se produce el ensamblaje del virión.

La proteína IVa2 se asocia con un vértice de la partícula del virión maduro y actúa como un motor impulsado por ATP (trifosfato de adenosina) para la inserción del ADN viral en una pro-cápside. Luego de la escisión de los precursores de proteínas VI, VII, VIII, m, y la PT por una proteasa viral, se completa el ensamblado de viriones infecciosos.

La progenie viral es liberada generalmente con destrucción de la célula hospedadora. Existen varios procesos que facilitan la liberación y propagación de la progenie viral. La proteasa viral L3-23K escinde la citoqueratina K18 celular

impidiendo su capacidad de polimerizar y formar filamentos, desestabilizando la estructura celular y haciéndola más frágil. El segundo sistema implica la proteína E3 de 11,6 kDa conocida como la proteína de muerte de AdV. Esta proteína mata a las células porque se acumula durante la etapa tardía de la infección y promueve su lisis (Knipe & Howley, 2013).

### 1.3. Virus Herpes simplex tipo 1

Los seres humanos son anfitriones de al menos nueve tipos de virus pertenecientes a la familia *Herpesviridae* que incluye más de 200 especies capaces de infectar a mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces y bivalvos. Hasta la fecha, se han identificado los siguientes herpesvirus humanos: virus herpes simplex tipos 1 y 2 (HSV-1, HHV-1 y HSV-2, HHV-2), virus de la varicela zoster (VZV, HHV-3), virus de Epstein-Barr (EBV, HHV-4), cytomegalovirus (CMV, HHV-5), herpesvirus humano 6 o roseolovirus (HHV- 6 A y B), herpesvirus humano 7 (HHV- 7) y herpesvirus asociado a sarcoma de Kaposi (HHV-8) (Kukhanova *et al.*, 2014; Suazo *et al.*, 2015).

Al final de la década de 1970, el taxón se dividió en tres subfamilias:

1. *Alphaherpesvirinae*: son virus líticos con un ciclo de vida relativamente corto. Comprenden los virus HSV-1 y -2 y VZV.

2. *Betaherpesvirinae*: incluyen virus con ciclo de vida larga y lenta progresión de la infección como el citomegalovirus humano (hCMV) y los HHV-6 y -7.

3. *Gammaherpesvirinae*: Comprenden el HHV-8 y EBV que causa linfoma de Burkitt (Grinde, 2013).

Los miembros de la familia *Herpesviridae* poseen, al menos, cuatro características en común:

- Presentan cápside icosaédrica formada de 162 capsómeros, recubiertos de tegumento y de envoltura.
- El genoma comprende una única molécula de ADN doble cadena lineal, de 120 a 250 kbp.
- La producción de su progenie es generalmente acompañada de la destrucción de su célula hospedadora (lisis).
- La fase productiva es seguida por una fase de latencia en la cual el genoma viral permanece quiescente dentro de las células neuronales

durante toda la vida del individuo infectado y es susceptible a la reactivación, dando lugar a una nueva fase productiva.

HSV- 1 es un virus neurotrópico que causa principalmente infecciones orales. Las infecciones producidas por HSV-1 pueden presentarse de forma leve, como el herpes labial, o grave, como la meningoencefalitis (Bascones-Martínez & Pousa-Castro, 2011).

Los viriones de HSV-1 son partículas esféricas envueltas que tienen 186 a 225 nm de diámetro cuya nucleocápside ocupa una posición excéntrica. Posee tegumento, una capa amorfa con algunas regiones estructuradas que contienen filamentos adosados a la envoltura. Consta de 40 proteínas de origen viral y celular, de las cuales 10 están glicosiladas y once se encuentran en la superficie del virión.

La cápside icosaédrica se compone de 162 capsómeros que a su vez contiene 12 pentones y 150 hexones. Cada uno de los 150 hexones está compuesto por seis moléculas de VP5, la principal proteína de la cápside, y seis moléculas de VP26. Existen tres tipos de cápsides que se pueden aislar de las células infectadas: A) cápsides que carecen de ambas proteínas de andamiaje (VP5 y VP26) y de ADN viral (procapsides); B) cápsides que no contienen ADN viral, pero contienen las proteínas de andamio; C) cápsides que contienen el genoma viral (Kukhanova *et al.*, 2014; Norkin, 2010).

La envoltura del virión consta de una bicapa lipídica, 11 glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK), dos de las cuales provienen de la membrana celular (gL y gM), y dos proteínas no glicosiladas (UL20 y US9) (Chowdhury *et al.*, 2013). Además de las proteínas, los viriones pueden incluir ARNm virales y celulares. Si la infección ha de ser latente, los únicos ARNm que se sintetizan inmediatamente después de la infección son los transcriptos asociados a latencia (LATs) (Knipe & Howley, 2013).

HSV-1 tiene un genoma ADN doble cadena lineal compuesto por 152 Kpb rico en GC (68%). Los extremos del ADN se mantienen posiblemente unidos o muy estrechamente juntos dando la apariencia de un ADN circular. Consta de dos unidades únicas, una larga ( $U_L$ ) y otra corta ( $U_S$ ), separadas por un conjunto de repeticiones invertidas. El genoma de HSV- 1 codifica alrededor de 90 unidades de transcripción, y al menos 84 codifican para la síntesis de proteínas. Cada transcripto viral codifica para la síntesis de una sola proteína y no contiene intrones (Kukhanova *et al.*, 2014).

### 1.3.1. Ciclo de replicación viral

El ciclo de vida de HSV-1 comprende los siguientes pasos: entrada en la célula hospedadora, expresión de genes virales, replicación, ensamblaje del virión, y salida de la nueva generación de partículas virales. En líneas celulares permisivas, este ciclo dura aproximadamente 18-20 horas.

La etapa esencial del proceso de entrada del HSV-1 es la interacción de las glicoproteínas de superficie del virus (gB, gC y gD) con los receptores de la superficie celular, en particular el heparán sulfato. La gD puede unirse a tres tipos de receptores: nectin-1 y -2, el mediador de la entrada de los virus Herpes (HVEM) y 3-O-sulfatado heparán sulfato (3-O-S-HS). Una segunda vía por la cual el virus entra en la célula es la endocitosis seguida de fusión de la envoltura con vesículas intracelulares (Arii *et al.*, 2009).

La vía endocítica se desarrolla a través de endosomas ácidos en algunas células y a través de endosomas neutros en otras células, aunque se requieren las mismas glicoproteínas virales para ambas vías. Por lo tanto, si el HSV entra por fusión de membranas o por endocitosis es un fenómeno dependiente de la línea o tipo celular (Knipe & Howley, 2013).

En ambos casos, la fusión de membranas promueve la entrada de la cápside y las proteínas virales al citoplasma. El tegumento es una malla compleja de más de 20 proteínas por debajo de la envoltura que envuelve la cápside viral y contiene determinantes moleculares que median, entre otros, la inhibición de la traducción celular y la apoptosis (Suazo *et al.*, 2015).

Después de la entrada de la partícula viral, la cápside recubierta de tegumento se transporta a los poros nucleares (PN). El HSV-1 viaja a través de las células durante largas distancias, especialmente en neuronas a lo largo de una red de microtúbulos accionados por la dineína citoplasmática (proteína motora). Las cápsides no recubiertas por el tegumento o con tegumento que contiene otras proteínas, no se unen a las proteínas motoras (Sodeik *et al.*, 1997).

Las cápsides vacías se acumulan en la membrana nuclear, lo que sugiere que la liberación de ADN viral se lleva a cabo sin la ruptura de las mismas. El ADN viral se libera en los PN a temperatura permisiva para que suceda la expresión génica viral (Knipe & Howley, 2013).

Los primeros genes que se transcriben son los genes inmediatos tempranos  $\alpha$  que codifican para las proteínas que contribuyen a la evasión de la respuesta inmune y factores que controlan la síntesis de proteínas celulares. Luego se transcriben los genes tempranos  $\beta$ , necesarios para la replicación del ADN. Por último se transcriben los genes inmediatos tardíos y tardíos  $\gamma$ -1 y  $\gamma$ -2 que codifican principalmente para los componentes estructurales del virión, tales como la cápside, el tegumento y las proteínas de la superficie (Rajcáni *et al.*, 2004). La síntesis de las diversas proteínas de HSV-1 se desarrolla en forma de cascada, así las proteínas inmediatas tempranas, activan la síntesis de las proteínas tempranas, y éstas, a su vez, activan la síntesis de las proteínas inmediatas tardías y tardías (Kukhanova *et al.*, 2014).

La transcripción y replicación del genoma viral, así como el ensamblado de las cápsides progenie, tienen lugar dentro del núcleo provocando una reorganización y aumento de tamaño del mismo. Se produce la disrupción del nucléolo por redistribución de sus proteínas (Greco *et al.*, 2011), condensación de la cromatina y posterior destrucción de ésta y la lámina nuclear. Al mismo tiempo, los principales procesos celulares de transcripción, corte y empalme del ARN, la biosíntesis de proteínas y la respuesta celular a la infección se encuentran bloqueados (Kukhanova *et al.*, 2014).

El ARNm viral es sintetizado por la ARN-polimerasa II celular, con la participación de factores y proteínas virales en todas las etapas de la infección que regulan la transcripción de los genes ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y las modificaciones post-traduccionales. Los seis genes que codifican para ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 y US1.5, se atribuyen al grupo de los genes tempranos inmediatos  $\alpha$ , cinco de los cuales activan la transcripción de los genes  $\beta$ . Las proteínas y las enzimas codificadas por los genes  $\beta$  están implicadas en la replicación del genoma viral (ADN polimerasa, UL30), la regulación del metabolismo de los nucleótidos (timidina quinasa, UL23), la supresión de genes tempranos  $\alpha$  y la activación de genes tardíos  $\gamma$  (Kukhanova *et al.*, 2014).

Entre las proteínas inmediato-tempranas  $\alpha$ , la primera es VP16 o  $\alpha$ TIF, una proteína de tegumento que ingresa con el virus al iniciarse la infección. Aumenta la expresión de los genes  $\alpha$  cumpliendo, por ende, una doble función como transactivadora de la transcripción y como proteína estructural. Las proteínas de células infectadas (ICP) son también proteínas inmediato-tempranas necesarias para regular la síntesis de proteínas tempranas y tardías, a su vez actúan también bloqueando los mecanismos de defensa de la célula hospedadora. La ICP4 se une al

ADN viral actuando como represora o transactivadora. ICP0 es un transactivador promiscuo, no se une al ADN sino a otras proteínas celulares regulando el ciclo celular y manteniendo una vigorosa síntesis proteica. La proteína ICP27 controla el proceso del ARNm bloqueando el corte y empalme, reduciendo la síntesis de proteínas celulares. Asimismo regula la expresión de proteínas virales tardías (Carballal & Oubiña, 2015).

En células infectadas, se detecta la síntesis de ADN a las 3 h post-infección (p.i.), la cual continúa durante otras 12 h. La ADN polimerasa alcanza su máximo rendimiento a las 4 h después de la infección. La síntesis de ADN viral ocurre a través del mecanismo de replicación de círculo rodante que produce moléculas concatémicas que se escinden durante el proceso de ensamblaje de la nucleocápside (Kukhanova *et al.*, 2014). Sólo alrededor del 25% del DNA/proteínas sintetizados acabarán formando viriones, mientras que el resto se acumula dentro de la célula.

Para generar nuevos viriones, las proteínas de la cápside migran desde el citoplasma al núcleo para ensamblarse junto con el ADN viral y adquirir en este lugar una capa de proteínas de tegumento. Las partículas de HSV-1 no alteran los PN a la salida, sino que se ensamblan en la membrana nuclear interna. La cápside se desplaza a través del espacio perinuclear y se fusiona con la membrana nuclear externa gracias a las glicoproteínas gB y gH. A partir de ese momento la cápside pasa al citoplasma y se recubre con proteínas del tegumento. Posteriormente pasan por el aparato de Golgi y desde ahí se exportan los viriones en vesículas a la superficie celular. La salida de los viriones produce la destrucción de la célula hospedadora (Bascones-Martínez & Pousa-Castro, 2009; Suazo *et al.*, 2015).

### 1.3.2. Latencia

Después de la propagación de HSV-1 en el sitio primario de la infección, el virus entra en las neuronas sensoriales por fusión en los extremos axonales y la nucleocápside pasa por transporte retrógrado al cuerpo celular. En el núcleo de la neurona el ADN viral persiste en forma circular episomal asociado a los nucleosomas y la expresión del gen lítico se reprime. Sin embargo, los LATs se expresan en abundancia, son transcritos de ARN que promueven la supervivencia neuronal. El virus no replicante puede detectarse en los ganglios sensoriales durante la infección latente. Se observó el efecto citopático (ECP) del virus en co-cultivos de tejido de

ganglios sensoriales junto con células permisivas. En una fracción de las neuronas que albergan HSV-1 latente, el virus se reactiva periódicamente y viaja por transporte axonal anterógrado a los tejidos periféricos, por lo general a las células del sitio de la infección inicial o cerca. La reactivación depende de varios factores, como por ejemplo el estado inmune del hospedador (Knipe & Howley, 2013).

#### 1.4. Antivirales

Para que una droga sea eficaz como antiviral se deben considerar varios aspectos y características propias de los virus. Los virus, a diferencia de las bacterias y otros microorganismos, son parásitos intracelulares obligados, es decir, utilizan la maquinaria biosintética de la célula a la que infectan para poder multiplicarse. Para que una droga tenga potencial como antiviral debe tener como blanco un paso del ciclo de multiplicación esencial para el virus y baja toxicidad para el organismo hospedador.

Entre las estrategias utilizadas para descubrir nuevas drogas existen tres tipos de abordajes principales:

- *Ensayo empírico de un gran número de compuestos:* Se prueba en cultivos celulares el efecto inhibitorio de diferentes series de compuestos de síntesis o naturales frente a un virus determinado.
- *Diseño racional de compuestos antivirales dirigidos a blancos predeterminados:* Se elige el blanco de acción a partir de información obtenida del ciclo de multiplicación viral. Por ejemplo, se estudian las distintas proteínas o enzimas virales indispensables en el ciclo de multiplicación del virus, y se diseñan moléculas similares a los sustratos naturales de dichas enzimas para que compitan con el sustrato natural, se unan a la enzima y bloqueen su actividad.
- *Bloqueo de la expresión de un gen viral:* El blanco terapéutico es el ARNm. Se diseñan pequeñas moléculas que bloqueen la expresión del gen seleccionado, ocasionando la falta de la correspondiente proteína viral.

En cualquiera de las estrategias a emplearse, una droga antiviral antes de ser aprobada para el uso clínico en seres humanos debe pasar, en forma secuencial, por: a) ensayos *in vitro*, b) pruebas preclínicas en animales y c) ensayos clínicos (Carballal & Oubiña, 2015).

El primer fármaco antiviral de gran éxito fue un análogo de guanosina, el 9-(2-hidroxietoximetil)-guanina (Aciclovir, ACV), inicialmente desarrollado en 1970 contra HSV-1, HSV-2 y VZV. La búsqueda de nuevos fármacos antivirales se expandió notablemente con la epidemia del SIDA, lo que llevó a la investigación y desarrollo de nuevas variedades de fármacos contra el HIV y patógenos oportunistas tales como el hCMV (Knipe & Howley, 2013).

Desde su introducción, el ACV y sus derivados se convirtieron en los fármacos de primera línea para la profilaxis y el tratamiento de las infecciones causadas por HSV. El ACV es un análogo de guanosina dependiente de la timidinaquinasa viral. *In vitro*, presenta mayor actividad antiviral frente a HSV-1 que frente a HSV-2, VZV, EBV y hCMV. Su principal limitación reside en su relativamente pobre biodisponibilidad oral (15 a 35%), lo cual llevó al desarrollo del valaciclovir (VACV). El VACV es un profármaco valil-éster del ACV que, después de la administración oral, es transportado al intestino delgado donde se convierte rápidamente en ACV por hidrólisis del éster. El 9-(4-hidroxi-3-hidroximetilbut-1-il)-guanina (penciclovir, PCV) es un derivado de guanina acíclico no disponible comercialmente como agente oral que tiene un espectro de actividad y mecanismo de acción similar a los del ACV. Se utiliza para las infecciones por herpesvirus. Un diacetilester del 6-deoxipenciclovir (famciclovir, FCV) es un profármaco que pierde sus grupos acetato en el intestino y, al pasar por el hígado, se convierte en PCV y se utiliza también para las infecciones por los virus del Herpes.

La mayoría de los tratamientos exitosos en infecciones causadas por cepas de HSV resistentes al ACV se han logrado con el uso de foscarnet (FOS) y cidofovir. El FOS (ácido fosfonofórmico) es un análogo de pirofosfato que inhibe la ADN polimerasa viral actuando de manera no competitiva. Es potente contra todos los HSV, pero es nefrotóxico e induce trastornos electrolíticos. El Cidofovir y el Adefovir son fosfonatos de nucleósidos acíclicos, (S)-1-(3-metoxipropilo hidroxil-2-phosphonyl) que incluyen derivados de citosina (cidofovir) y adenina (adefovir). Son inhibidores competitivos de la ADN polimerasa independientes de la timidinaquinasa y actúan como interruptores de la síntesis de la cadena de ADN viral. Se administran por vía intravenosa para infecciones por CMV en pacientes con SIDA (Piret & Boivin, 2011).

Otras drogas utilizan diferentes blancos de acción como el complejo helicasa-primasa que desenrolla el ADN doble cadena y genera cebadores para la síntesis del ADN. Los inhibidores del complejo helicasa-primasa son no-nucleosídicos/no-nucleotídicos extremadamente potentes contra HSV en cultivo celular. Entre estos

antivirales aprobados por la FDA se encuentran: BAY 57-1293 (Bayer) (Baumeister *et al.*, 2007) y BILS 45 BS (Boehringer Ingelheim) (Crute *et al.*, 2002). BILD 1633 SE (Boehringer Ingelheim) es un inhibidor peptidomimético de la ribonucleótido reductasa de HSV que cataliza la síntesis de los precursores de desoxirribonucleótidos requeridos para la síntesis de ADN (Piret & Boivin, 2011).

Recientemente se ha desarrollado una nueva clase de fármacos tópicos que actúan como modificadores de la respuesta inmune. Dicha respuesta está regulada principalmente por la inducción de la producción de interferón y citoquinas a partir de linfocitos activados en el lugar de la lesión. Estos fármacos son agonistas de los receptores de tipo Toll (TLR) celulares, por lo que activan las vías de la inmunidad innata. Entre ellos se encuentra el imiquimod y el resiquimod, agonistas de los TLR-7 y -8 que estimulan la producción de citoquinas que promueven una respuesta inmune tipo T helper antígeno específico (Th1). Ensayos clínicos con estas drogas en el tratamiento del herpes labial arrojaron resultados contradictorios (Bernstein *et al.*, 2005). El agonista del TLR-3 poli (I:C) induce protección mediada por la respuesta inmune innata mediante un mecanismo de neuroprotección contra los HSV (Boivin *et al.*, 2008; Piret & Boivin, 2011).

A diferencia de lo que ocurre con las infecciones causadas por el HSV, no existen antivirales específicos para tratar las infecciones por AdV. La mayoría de las pruebas de eficacia terapéutica *in vivo* contra AdV se han realizado con cidofovir y ribavirina y, generalmente, no se recomiendan como tratamiento. Sin embargo, la eficacia de la ribavirina documentada *in vitro* frente a especies de AdV C puede justificar su uso en situaciones clínicas específicas (Lion, 2015)

La ribavirina es un análogo de nucleósido que se ha descrito como un "antiviral de amplio espectro". La ribavirina se convierte en monofosfato de adenosina capaz de inhibir la inosina monofosfato deshidrogenasa celular (IMPDH), lo que reduce el pool de GTP y le confiere la actividad antiviral (Knipe & Howley, 2013).

Tanto el cidofovir como la ribavirina se utilizan como terapia primaria para el tratamiento de la infección por AdV en pacientes pediátricos y adultos con trasplante hematopoyético de células madre (Ganapathi *et al.*, 2016, Bordigoni *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha descrito que la administración de ribavirina durante los primeros signos de diseminación de AdV no fue acompañada por una disminución en la carga de ADN adenoviral en el plasma de los pacientes tratados (Lankester *et al.*, 2004).

### 1.4.1. Antivirales de amplio espectro

En la actualidad se tiene un amplio conocimiento sobre la biología celular y la interacción de las proteínas celulares con la estructura de los diversos virus. Este hecho genera una ventaja para enfocarse en nuevos blancos farmacológicos, considerando como dianas los factores y proteínas celulares que son indispensables para que el virus cumpla su ciclo replicativo.

El desarrollo de nuevas drogas capaces de tratar diversas infecciones víricas, se enfoca no sólo en que los tratamientos engloben las variantes genéticas que generan entre otros, cepas resistentes a los antivirales ya existentes, sino también que sean capaces de ejercer su efecto inhibitorio sobre una o varias familias de virus (por ejemplo, todos los virus con genoma ARN o todos los virus con envoltura). Esto permitiría tratar con una sola droga a pacientes con coinfecciones, como aquellos con HIV y HCV (Brai *et al.*, 2016).

- *Antivirales de amplio espectro de acción directa:* Dentro de este grupo se incluyen aquellos antivirales ya descritos que inhiben las proteínas virales involucradas en el ciclo de multiplicación, como los análogos de nucleósidos y nucleótidos, que por su capacidad de ejercer su efecto inhibitorio sobre virus que tienen distintas estrategias replicativas se los considera como de “amplio espectro”. Entre ellos podemos nombrar los siguientes: aciclovir, ganciclovir y cidofovir como tratamiento antiherpético; la ribavirina para tratar hepatitis C y E crónicas, infecciones causadas por el RSV, el hantavirus y la fiebre de Lassa; tenofovir, emtricitabina y lamivudina como agente anti-HIV (Debing *et al.*, 2015).

Diversas moléculas que ejercen actividad antiviral contra virus ARN de polaridad positiva y negativa se encuentra en ensayos clínicos. Entre ellos se encuentra el favipiravir (T-750), que inhibe la ARN polimerasa del virus influenza, virus Junín, virus de la fiebre del Valle de Rift y la fiebre amarilla (Caroline *et al.*, 2014). El BCX4430 es un análogo de adenosina, terminador de las cadenas de ARN polimerasa y ha demostrado eficacia pronunciada *in vitro* frente a filovirus, MERS-CoV y SARS-CoV, e *in vivo* frente al virus del Ébola, virus de Marburg, virus de la fiebre del Valle del Rift, y el virus de la fiebre amarilla (Taylor *et al.*, 2016).

Otros BSAA de acción directa son aquellos que inhiben la proteasa viral. En base al análisis filogenético, varios virus ARN de polaridad positiva pueden ser clasificados dentro del supercluster picornavirus-like, que incluye virus de las familias Picornaviridae, Caliciviridae y Coronaviridae. Todos los virus pertenecientes a este supercluster tienen en común las proteasas virales 3C o 3C-like. Éstas presentan un típico pliegue similar a la quimotripsina y una tríada catalítica (o díada) que contiene un residuo de cisteína como sitio activo. Debido a que las proteasas virales son esenciales para la multiplicación viral, los sitios activos de las proteasas 3C o 3C-like podrían servir como blancos atractivos para el diseño de drogas antivirales (Kim *et al.*, 2012). Dentro del grupo de drogas que se encuentran en estudios clínicos y que actúan sobre estos blancos, se encuentra el rupintrivir, originalmente empleado para el tratamiento de las infecciones por Rhinovirus humanos, y para el que se demostró actividad antiviral contra otros picornavirus, coronavirus y norovirus (Rocha-Pereira *et al.*, 2014).

- *Antivirales host-targeting como BSAA*: El blanco de acción puede ser una proteína del hospedador esencial en el ciclo de vida de diferentes familias de virus. Si bien esta estrategia podría dar lugar a toxicidad o efectos adversos en el paciente, por otro lado la probabilidad de desarrollar una resistencia viral al fármaco sería menor. De manera similar, muchos virus son dependientes del metabolismo de los lípidos del hospedador para su replicación. Una clase de moduladores lipídicos mayormente utilizados son las estatinas. Éstas reducen la síntesis de colesterol en el hígado y poseen actividad antiviral *in vitro* frente a HCV, HIV, poliovirus, CMV, dengue y RSV. Sin embargo, los resultados obtenidos en pacientes fueron contradictorios (Delang *et al.*, 2009; Martínez-Gutierrez *et al.*, 2011).

El arbidol es otro modulador de lípidos aprobado en China y Rusia para la profilaxis y tratamiento de la gripe y otras infecciones virales respiratorias. Es un derivado del indol que se une a las membranas lipídicas e interactúa con los aminoácidos aromáticos de las glicoproteínas virales. Así interfiere en la entrada del virus y en la fusión de membranas. El arbidol inhibe la replicación de virus ARN y ADN con y sin envoltura, incluyendo HBV, HCV y el virus Chikungunya (Blaising *et al.*, 2014).

Otro ejemplo es el LJ001, un derivado lipofílico de tiazolidina, que actúa a nivel de la envoltura viral y disminuye su capacidad de fusión célula-virión. No tiene ningún efecto sobre los virus desnudos. Desafortunadamente, esta molécula no

fue aprobada por falta de estabilidad fisiológica y requerimiento de luz para ejercer su actividad antiviral (Wolf *et al.*, 2010).

La escualamina, a diferencia del LJ001 y otros análogos, actúa directamente a nivel de la membrana del hospedador. Inhibe virus ARN y ADN con envoltura, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se encuentra en fase clínica. El mecanismo inhibitorio consiste en neutralizar la carga electrostática negativa superficial de las membranas intracelulares, con lo cual el entorno celular se vuelve menos favorable para la replicación viral sin causar daño estructural en las membranas celulares (Zasloff *et al.*, 2011).

La nitazoxanida, originalmente utilizada como antiparasitario intestinal, inhibe una amplia gama de virus ARN y ADN, incluyendo el virus de la gripe, mediante el bloqueo de la maduración de la hemaglutinina (Rossignol *et al.*, 2009). La ciclosporina A y el sanglifehrín A son moléculas inmunosupresoras que inhiben las ciclofilinas encargadas del correcto plegamiento de ciertas proteínas del hospedador. Estas drogas inhiben una amplia gama de virus ARN y ADN, tanto *in vitro* como en modelos animales, y presentan eficacia terapéutica en pacientes infectados con el HCV (Frausto *et al.*, 2013; Kaul *et al.*, 2009).

- *Drogas que modulan la respuesta Inmune*: Muchos virus pueden eludir o incluso cooperar con la respuesta inmune para su propio beneficio. Por lo tanto, varias moléculas que se encuentran en estudio utilizan la modulación de la respuesta inmune como una estrategia para hacer frente a los virus persistentes o latentes. Una estrategia emplea la 5'pppARN, agonista de RIG-1 que activa varias vías de la inmunidad innata. Otro ejemplo es la activación de la RNasa-L, que presenta amplia actividad contra los virus ARN. En el caso del GSK983, la droga induce la síntesis de interferón. Por último, la proteína inducida por interferón con repeticiones tetratricopeptídicas (IFIT) y la proteína transmembrana inducida por interferón (IFITM) son familias de proteínas que también muestran un amplio espectro de actividad antiviral (Debing *et al.*, 2015).

#### 1.4.2. Análogos de esteroides - Azasteroides

Hace años se describió la actividad antiviral de esteroides de esponjas marinas (Koehn *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1991). En base a estas evidencias, se inició en nuestro laboratorio el estudio de una potencial actividad antiviral de esteroides

fitohormonales llamados Brassinosteroides (BRs), entre ellos el Brassinólido natural y de una familia numerosa de análogos de BRs sintetizados en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad (FCEyN). Se halló que muchos de ellos resultaron activos frente a diversos virus patógenos para los humanos, entre ellos, el Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1), el virus del sarampión, y varios arenavirus como virus Junín, Pichindé y Tacaribe (Ramírez *et al.*, 2000; Wachsmann *et al.*, 2000, 2002, 2004; Michelini *et al.*, 2004, 2008a). Algunos de estos esteroides, además, poseen la capacidad de modular la respuesta inflamatoria de células epiteliales e inflamatorias a diferentes estímulos, virales y no virales (Michelini *et al.*, 2008a, 2008b, 2013, 2016).

Considerando a los componentes celulares esenciales para la replicación viral como nuevos blancos de ataque, los esteroides son una fuente atractiva para el descubrimiento de fármacos antivirales, ya que se sabe que poseen varias propiedades biológicas que implican dianas celulares (Dávola *et al.*, 2012). La sustitución de uno o más átomos de carbono de una molécula de esteroide por un heteroátomo afecta sus propiedades químicas y a menudo resulta en alteraciones útiles a su actividad biológica. Los azasteroides, especialmente, cuentan con numerosas actividades biológicas (Alonso *et al.*, 2008).

En el Departamento de Química Orgánica de la FCEN se desarrolló un programa de investigación dedicado a la síntesis de nuevos análogos de esteroides a partir de reacciones de múltiples componentes (RMC). Con este tipo de reacciones, se forma un producto con una estructura que puede ser fácilmente diversificada por una variación sistemática (Alonso *et al.*, 2010). El enfoque sintético llevado a cabo fue una reacción de Ugi de cuatro componentes (U-4CR): un grupo amino, un ácido, un grupo carbonilo y un isocianuro reaccionan entre sí para dar una  $\alpha$ -aminoacilamida (**Figura 1**). Esta nueva familia de azaesteroides con cadenas diamida laterales presentaron actividad antifúngica (Alonso *et al.*, 2010; Burbiel & Bracher, 2003), antiparasitaria (Gros *et al.*, 2006) y antiviral frente a AdV, VSV y HSV-1, con porcentajes de inhibición del rendimiento viral superiores al 85% (Amado, 2013), y  $CE_{50}$  de  $12,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$  (Dávola *et al.*, 2012, 2016).

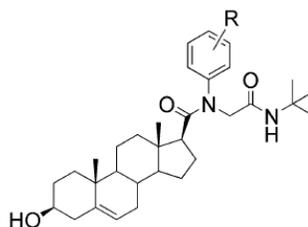


Figura 1 Azasteroide

**HIPÓTESIS**

---

Dado que se ha demostrado la actividad antiviral de amplio espectro y la actividad inmunomoduladora de diversos compuestos esteroidales de síntesis química, entre ellos algunos azasteroides, la hipótesis del presente trabajo de investigación es que nuevos azasteroides presentan actividad antiviral y antiinflamatoria frente a virus con distintas estrategias replicativas y de importancia sanitaria como Herpes simplex tipo 1 y Adenovirus humano.

## **OBJETIVOS**

---

Dada la constante necesidad de buscar nuevas drogas antivirales como alternativas para el tratamiento de las infecciones con el HSV y el AdV, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Evaluar la actividad antiviral de nuevos azasteroides sintéticos frente a Adenovirus humano tipo 5 (AdV5) y virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) en cultivos celulares.
- Investigar la etapa del ciclo de replicación viral inhibida por los compuestos que resulten activos.
- Analizar el efecto antiinflamatorio de los azasteroides en células infectadas con los virus mencionados y en células inmunes activadas con diferentes estímulos no virales.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

#### 4.1. Células

La línea celular continua A549, proveniente de adenocarcinoma alveolar de pulmón humano, fue cultivada a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en medio esencial mínimo en solución salina de Eagle (E-MEM) (GIBCO) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Natocor) inactivado y suplementado con Hepes 20 μM (Sigma-Aldrich) y bicarbonato de sodio 7,5% equilibrado a pH 7,4. Las células fueron subcultivadas semanalmente y mantenidas a 33°C con MEM suplementado con 1,5% de SFB sin Hepes ni bicarbonato. Para los experimentos en microplacas de 24 y 96 pocillos se utilizó MEM 1,5% con Hepes y bicarbonato y la incubación se llevó a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

La línea celular Vero, proveniente de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), fue cultivada a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, en E-MEM (GIBCO) suplementado con 5 % de SFB (Natocor) inactivado, Hepes 20 μM (Sigma-Aldrich) y bicarbonato de sodio 7,5%, equilibrado a pH 7,4. Las células fueron subcultivadas semanalmente y mantenidas a 33°C con MEM 1,5% sin Hepes ni bicarbonato. Para los experimentos en microplacas de 24 y 96 pocillos se utilizó MEM 1,5% con Hepes y bicarbonato y la incubación se llevó a cabo a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

La línea celular J774A.1 corresponde a macrófagos de ratón, fue cultivada a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (GIBCO) suplementado con 10% de SFB (Natocor) inactivado y bicarbonato de sodio 7,5%, equilibrado a pH 7,4. Para realizar los ensayos en microplacas de 24 pocillos se utilizó medio RPMI sin suero a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

La línea celular THP1 corresponde a macrófagos humanos, fue cultivada a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI (GIBCO) suplementado con 10% SFB (Natocor) inactivado y bicarbonato de sodio 7,5%, equilibrado a pH 7,4. Para realizar los ensayos en microplacas de 24 pocillos se cuantificaron y sembraron 250.000 células/pocillo suspendidas en medio RPMI sin suero y Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (50 ng/ml) (Sigma-Aldrch) para su activación durante 72 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo la microplaca se encontraba lista para recibir los tratamientos utilizando medio RPMI sin suero a 37°C y en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

## 4.2. Virus

Se utilizó Adenovirus humano tipo 5 (AdV5) y el virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa KOS.

Para preparar el stock de AdV5, se infectaron células A549 crecidas en botellas T25 con una multiplicidad de infección (m.i.) de 1 (1 UFP por célula). Luego de 1 h de adsorción a 37°C, el inóculo viral se retiró y se agregaron 5 ml de MEM 1,5%. Las botellas se incubaron durante 5 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de dicho lapso fueron congeladas a -70°C y luego se descongelaron para trasvasar los sobrenadantes a tubos cónicos y centrifugarlos durante 10 min a 2000 rpm. Los sobrenadante se fraccionaron en alícuotas de 1000 y 50 µl y se titularon por el método de formación de placas en medio semisólido. El stock de AdV5 presentó un título de  $3,7 \times 10^7$  UFP/ml y fue almacenado a -70°C.

Para preparar el stock del HVS-1, se infectaron células Vero crecidas en botellas T25 con una m.i. de 0,1. Luego se procedió de manera análoga a lo detallado para la preparación del stock de AdV5, con excepción del tiempo de incubación, que fue de 24 h. El stock presentó un título de  $4 \times 10^7$  UFP/ml y fue almacenado a -70°C.

## 4.3. Compuestos

Los azasteroides utilizados en el presente trabajo fueron sintetizados en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA bajo la dirección del Dr. Javier Ramírez. Todos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO). La máxima concentración de DMSO evaluada fue del 1% y no presentó citotoxicidad en las condiciones experimentales ensayadas.

En el Laboratorio de Química Orgánica se aplicó con éxito una nueva estrategia para obtener análogos de esteroides con una alta diversidad estructural, con un procedimiento sencillo y rápido utilizando cuatro componentes Ugi (U-4CR): un grupo amino, un ácido, un grupo carboxilo y un isocianuro para obtener una  $\alpha$ -aminoacilamida. Obtuvieron una nueva familia de azasteroides sintéticos, algunos con la cadena lateral polifuncionalizada en el carbono 20 (U20) y otros en el carbono 22 (U22) (Alonso *et al.*, 2008, 2010).

#### 4.4. Ensayo de Citotoxicidad

La viabilidad celular se determinó por dos métodos: a través del ensayo colorimétrico del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich) y mediante el recuento de células viables en cámara de Neubauer.

Células crecidas en microplacas de 96 pocillos fueron tratadas o no con diluciones seriadas al medio de los compuestos (200 – 12,5 µM) durante 24 h a 37°C, en atmósfera con 5 % CO<sub>2</sub>, por triplicado. Al culminar la incubación:

- se agregaron 10 µl de una solución de 5 mg/ml de MTT a cada pocillo y se incubó durante 4 h a 37 °C. Finalmente, se descartaron los sobrenadantes y se disolvieron los cristales formados con 200 µl de etanol 96%. Para determinar la densidad óptica (DO) se utilizó un lector de microplacas (Eurogenetics MPR-A 4i) a 570 nm. EL MTT es clivado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa para dar un producto azul (cristales de formazán). La cantidad del producto formado es proporcional al número de células viables presentes.

- se realizó un recuento de células viables en cámara de Neubauer: se retiró el sobrenadante y se agregaron 25 µl de tripsina, dejando actuar por 2-3 min hasta que se despegaran las células del fondo del pocillo. Posteriormente se agregaron 25 µl de MM. De la suspensión celular se tomaron 25 µl y se mezclaron con 25 µl de Azul Tripán. Se tomaron 10 µl de la mezcla y se cargaron en cámara de Neubauer para el conteo celular.

Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje de viabilidad celular, comparando la absorbancia de las células tratadas con respecto a las células sin tratar. Así se determinó la CC<sub>50</sub> (concentración citotóxica 50) para cada compuesto, definida como la concentración de compuesto que causa la muerte del 50% de las células en cultivo.

$$\% Viabilidad Celular = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células sin tratar}} \times 100$$

#### 4.5. Ensayo de Proliferación Celular

Para determinar si los compuestos utilizados en los ensayos afectan la proliferación celular, se sembraron  $9 \times 10^4$  células A549 y Vero por pocillo en microplacas de 96 pocillos, con medio 5% SFB, en presencia y ausencia de diluciones seriadas al medio del compuesto (200 - 12,5  $\mu\text{M}$ ). Las microplacas fueron incubadas a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas.

Al cumplirse las 24 h de incubación, se realizó el recuento de células viables en cámara de Neubauer, según lo descrito en el punto anterior.

#### 4.6. Ensayo de inhibición del rendimiento viral

Células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 96 pocillos fueron infectadas con 25  $\mu\text{L}$  de AdV5 y HSV-1 respectivamente, con una m.i. de 1 (AdV5) y 0,1 (HSV-1), durante 1 h a 37 °C, en atmósfera con 5 % de  $\text{CO}_2$ . Luego de la adsorción, se descartó el inóculo viral y las células se incubaron con 100  $\mu\text{l}$  de diferentes concentraciones de los compuestos (100 – 6,25  $\mu\text{M}$ ), durante 24 h a 37 °C en atmósfera con 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Luego de la incubación, para titular AdV, las microplacas fueron congeladas y descongeladas 1 vez y se cuantificó el rendimiento viral en las distintas muestras por el método de formación de placas en medio semisólido. En el caso de HSV-1, se cosechó el sobrenadante (virus extracelular), luego se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de MM por pocillo y se congelaron y descongelaron las microplacas 1 vez para cuantificar la infectividad del virus intracelular.

Los resultados obtenidos fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la multiplicación viral en presencia de los compuestos con respecto a los controles sin tratar. Se determinó la  $\text{CE}_{50}$  (concentración efectiva 50) para cada compuesto, definida como la concentración de compuesto que inhibe el 50% de la infectividad viral.

$$\% \text{ Inhibición} = \left( 1 - \frac{\text{UFP/ml Tratamiento}}{\text{UFP/ml Control}} \right) \times 100$$

#### 4.7. Titulación por el método de formación de placas (UFP)

Monocapas de células A549 y de células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron inoculadas con 100 µl de diluciones seriadas al décimo de Adv5 y HSV-1, por duplicado. Luego de 1 h de adsorción a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, el inóculo viral fue descartado y se agregaron 500 µl de medio de plaqueo (mezcla 1:1 de MEM 2x y metilcelulosa 1,4 %) en el caso de las células Vero, y 1 ml de medio de plaqueo cuando se infectaron las células A549. Las microplacas se incubaron a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>, durante los días necesarios como para observar la formación de placas de lisis (3 días para HSV-1 y 7 días para Adv5). Luego, se procedió a fijar las células con 500 µl de formol 10% durante 30 min a temperatura ambiente. Después, se retiró el formol mediante lavados con agua corriente y se agregó cristal violeta 1% en etanol 10% durante 30 min para teñir las células. Las microplacas se lavaron con agua corriente y se dejaron secar para la observación y conteo de placas de lisis que se realizó en aquellos pocillos que presentaron entre 50 y 100 placas.

Con el número de placas se calculó el título viral como el número de UFP/ml:

$$UFP/ml = \frac{n^{\circ} \text{ de placas}}{\text{Vol. inóculo}} \times \text{Factor de dilución}$$

#### 4.8. Mecanismo de Acción

##### 4.8.1. Acción Virucida

Para analizar si los compuestos en estudio presentan la capacidad de inactivar directamente las partículas virales, 3,7x10<sup>7</sup> UFP/ml de Adv5 y 4x10<sup>7</sup> UFP/ml de HSV-1 fueron tratados con una concentración de 200 µM de cada compuesto. El volumen final fue de 200 µl. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 0, 30, 60 y 90 min. Al cumplirse cada tiempo se tomó alícuotas de cada muestra y se tituló la infectividad viral remanente por el método de formación de placas en medio semisólido. Se utilizó una cantidad equivalente de virus sin tratar con los compuestos como control.

#### **4.8.2. Ensayo de Adsorción**

Para determinar el efecto de los compuestos durante la adsorción viral, monocapas de células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con AdV5 y HSV-1 (m.i.=1) junto con 50  $\mu$ M del compuesto a ensayar. El volumen del inóculo fue de 100  $\mu$ l. Luego de 1 h de incubación a 4°C se retiró el inóculo viral. Se lavaron dos veces las monocapas con PBS y se cubrieron con 500  $\mu$ l de MM. Las microplacas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Posteriormente se congelaron y descongelaron 1 vez y los sobrenadantes se titularon por el método de plaqueo en medio semisólido.

#### **4.8.3. Ensayo de Internalización**

Para determinar el efecto de los compuestos durante la internalización viral, monocapas de células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos, fueron infectadas con 100  $\mu$ l de AdV5 y HSV-1 (m.i.=1) durante 1 h a 4°C. Luego de la adsorción viral se retiró el inóculo y se realizaron lavados con PBS. Posteriormente se agregaron 300  $\mu$ l de los compuestos a ensayar (50  $\mu$ M). Las microplacas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 15, 30 y 60 min. Al cumplirse cada uno de los tiempos se realizaron dos lavados de las monocapas con PBS y se agregó 300  $\mu$ l de buffer citrato (pH=3) durante 1 min. El buffer citrato inactiva el virus no internalizado. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS y se agregaron 500  $\mu$ l de MM. Las microplacas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Finalmente se congelaron y descongelaron las microplacas 1 vez y los sobrenadantes se titularon por el método de plaqueo en medio semisólido.

#### **4.9. Ensayo de agregado de compuesto a distintos tiempos post-infección**

Monocapas de células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con 100  $\mu$ l de AdV5 y HSV-1 (m.i.=1) durante 1 h a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se retiraron los inóculos y se cubrieron todos los pocillos con 500  $\mu$ l de MM. A distintos tiempos (0, 1, 3, 5, 7, 16 y 24 h.p.i. para AdV5 y 0, 1, 3, 5, 7, 12, 16 y 18 h.p.i. para HSV-1) el MM fue reemplazado por

500 µl de los compuestos a ensayar (50 µM) y las placas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 24 h las microplacas se congelaron y descongelaron 1 vez y los sobrenadantes se titularon por el método de plaqueo en medio semisólido.

Cuando los compuestos fueron agregados a las 24 h.p.i. en células A549 infectadas, la incubación se realizó por 24 h más bajo las mismas condiciones que los demás pocillos.

#### **4.10. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)**

Monocapas de células A549 y células Vero crecidas en cubreobjetos dentro microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con AdV5 y HSV-1 (m.i.=1) e incubadas durante 1 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se retiró el inóculo y se agregaron 500 µl de MM en presencia o ausencia del compuesto a ensayar (50 µM) a distintos tiempos post-infección (0 y 7 h para HSV-1 y 0 y 16 h para AdV5). Las microplacas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 y 48 h.

Cumplido el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y se lavó dos veces con PBS. Se agregó metanol para fijar las células durante 10 min a -20°C. Posteriormente se lavaron 3 veces los cubreobjetos con PBS durante 5 min en agitación y se realizó la incubación con el primer anticuerpo en cámara húmeda durante 30 min a 37°C. Los anticuerpos primarios están dirigidos contra la proteína inmediata temprana E1A y la proteína tardía hexón de AdV5 y la proteína de la cápside gD de HSV-1. A continuación se lavaron las muestras 3 veces con PBS y se incubaron con el segundo anticuerpo (anti-ratón, CyTM3, y anti-conejo, CyTM2) durante 30 min más a 37°C. Para finalizar, se realizaron 3 lavados con PBS y se montaron los cubreobjetos con glicerina tamponada con 2,5% de DABCO. Se observaron las células en microscopio Olympus BX51 con epifluorescencia y en confocal Olympus FB300.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anticuerpo monoclonal de ratón contra proteína de hexón (1/200) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anticuerpo policlonal de conejo contra proteína E1A (1/100) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-gD (1/100) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Los secundarios: anticuerpo anti-conejo conjugado con fluorocromo FluoroLink™ CyTM2 (1/200) (GE Healthcare Bio-Sciences, Argentina) y anticuerpo anti-ratón conjugado con fluorocromo FluoroLink™ CyTM3 (1/600) (GE Healthcare Bio-Sciences, Argentina).

#### **4.11. Western Blot (WB)**

Monocapas de células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas y tratadas siguiendo el mismo protocolo que se utilizó para los ensayos de IFI. Al cumplirse las 24 y 48 h de incubación, se descartaron los sobrenadantes y las monocapas fueron levantadas con 100  $\mu$ l de buffer de siembra (Tris 0,125 M pH: 6,8; SDS 4%;  $\beta$ -Mercaptoetanol 10%; Glicerol 20% y Azul de Bromofenol 0,02%) precalentado a 100°C y se colocaron en tubos eppendorf.

Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min y se sembraron en minigeles de poliacrilamida 10% con SDS. El gel se sometió a 200 V por 45 min y la corrida se transfirió a una membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 75 mA por 4 h. El bloqueo de la membrana se realizó con 5% de leche en polvo en PBS TWEEN 0,05% overnight. Después de varios lavados con PBS TWEEN 0,05%, la membrana se incubó a 37°C con el anticuerpo primario durante 2 h. Concluida la incubación se realizó el lavado de la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa a 37°C durante 1,5 h. Finalmente, las bandas inmunorreactivas fueron visualizadas utilizando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Perkin Elmer). Se utilizó actina como control de carga.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados fueron los mismos que los utilizados en las IFI. Adicionalmente se utilizó el anticuerpo policlonal de ratón para proteínas totales de HSV-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

#### **4.12. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) directo**

Para realizar la detección de las citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ) en el sobrenadante de los cultivos celulares, se utilizaron kits comerciales de ELISA directo siguiendo las instrucciones del comerciante (BD OptEIA™).

Se sensibilizaron las microplacas con 50  $\mu$ l del anticuerpo de captura (1/250) diluido en buffer de pegado a 4°C overnight. Al día siguiente se retiró el sobrenadante de las microplacas, se lavaron 3 veces con PBS TWEEN 0,05% (200  $\mu$ l) y se secaron por inversión sobre papel absorbente. Se realizó el bloqueo con PBS 10% SFB (200  $\mu$ l) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de las microplacas y se agregaron las

muestras y estándares (50  $\mu$ l). Se incubaron las microplacas durante 2 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación, se lavaron 5 veces las microplacas y se agregaron los anticuerpos de detección (1/250) y la enzima (1/250) (50  $\mu$ l) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se realizaron 7 lavados de la microplaca y se incubaron las placas con el sustrato TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbencidina) (50  $\mu$ l) durante 30 min en oscuridad. Finalmente, se adicionó la solución de stop (solución de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  2N) (50  $\mu$ l) y se determinó la DO utilizando un lector de microplacas (Eurogenetics MPR-A 4i) a 450 nm.

#### 4.13. Análisis estadístico

Se utilizó el programa bioestadístico **GraphPad Prism** que organiza datos, combina gráficos y analiza curvas. Para analizar las diferencias significativas de los grupos de datos obtenidos se aplicó un Análisis de Varianza (**ANOVA**) de un factor o una vía, en el que la hipótesis nula (***H*<sub>0</sub>**) considera que los grupos presentan valores similares de las variables por una condición equivalente, es decir, las medias en los diferentes grupos son iguales.

Para aquellos análisis en los que se rechazó la *H*<sub>0</sub>, el siguiente paso fue determinar en qué grupos existe diferencias significativas aplicando las comparaciones post hoc o a posteriori, específicamente la prueba de **Diferencia Honestamente Significativa de Tukey**, que compara cada grupo de datos con los demás (6 o más), es una prueba conservadora, es decir, que mantiene bajo error de tipo I (falsos positivos), sacrificando la capacidad de detectar diferencias existentes.

## **RESULTADOS**

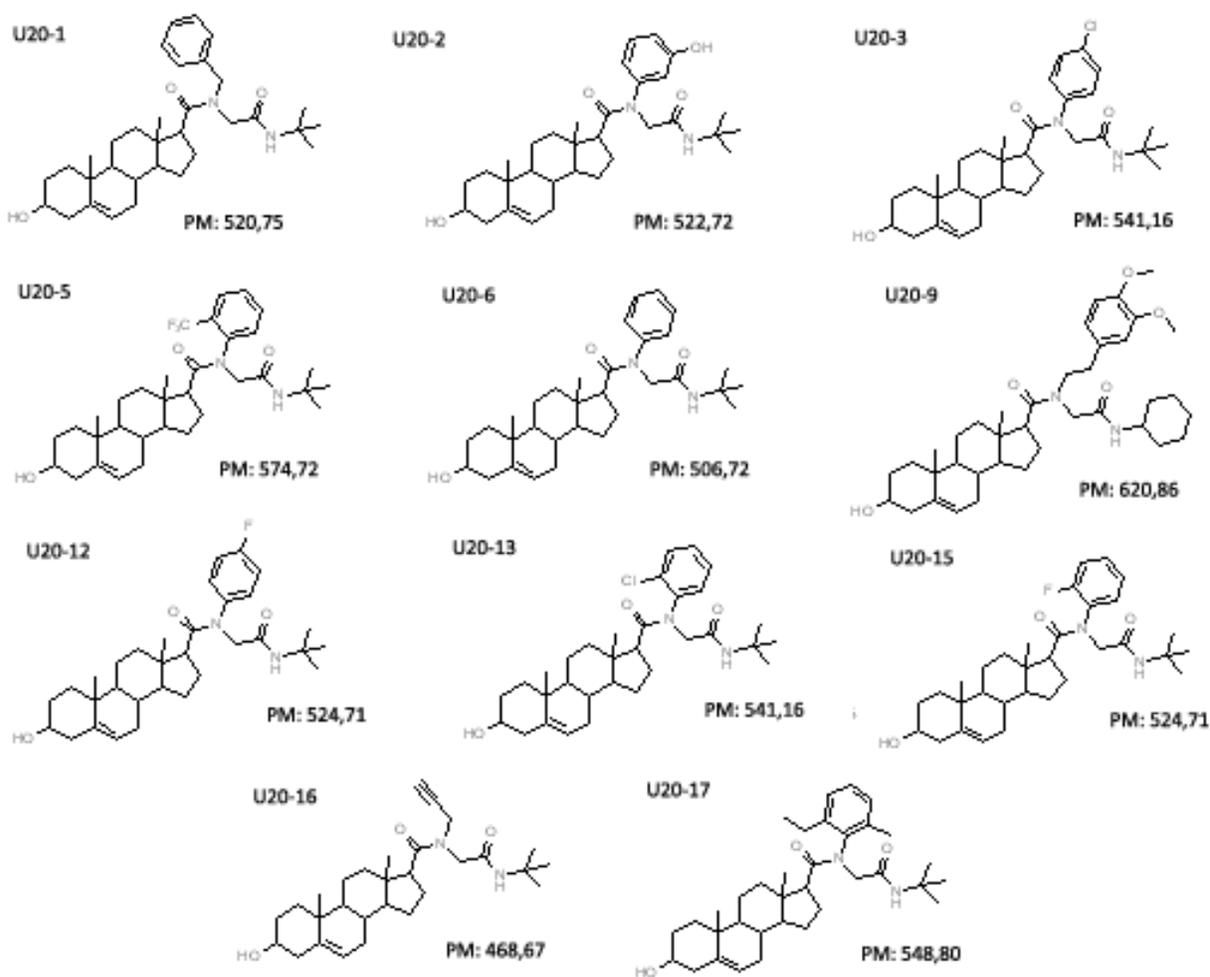
---

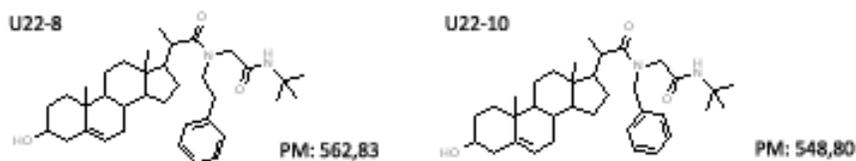
## 5.1. Efecto de los compuestos sobre las células

Los azasteroides analizados comprenden dos series de compuestos y toman el nombre dependiendo del carbono donde se localiza la cadena lateral polifuncionalizada. Puede ser en el carbono 20 (U20) o en el carbono 22 (U22).

Seleccionamos los azasteroides para nuestro trabajo tomando como modelo las cadenas polifuncionalizadas de los compuestos que presentaron actividad antiviral en trabajos previos frente a HSV-1: U20-3, -6, -12 y -13 (Dávola *et al.*, 2012) y Adv5: U20-12, -14, -18 y U22-6 (Amado, 2013). También elegimos de este grupo aquellos que presentaron el mayor índice de selectividad (U20-12 para Adv5 y U20-3 para HSV-1) como controles internos de actividad.

Las estructuras de los azasteroides ensayados figuran a continuación:

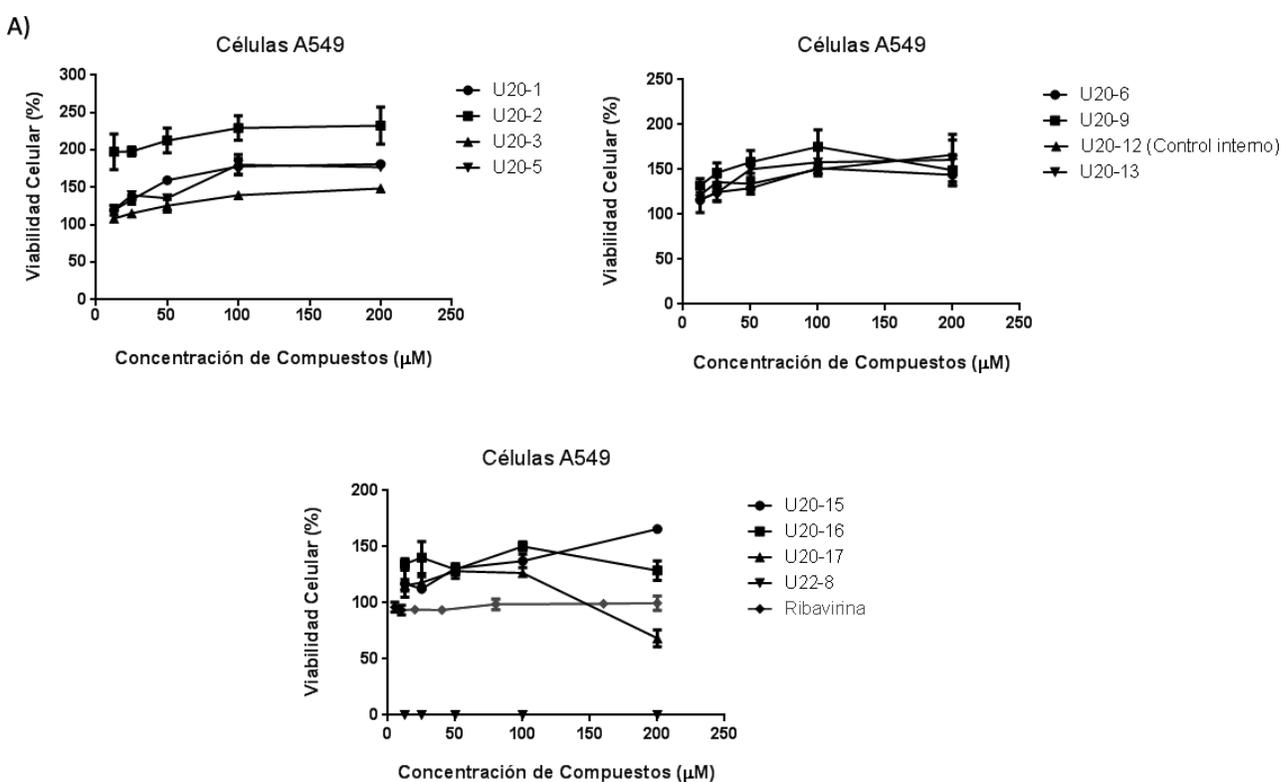


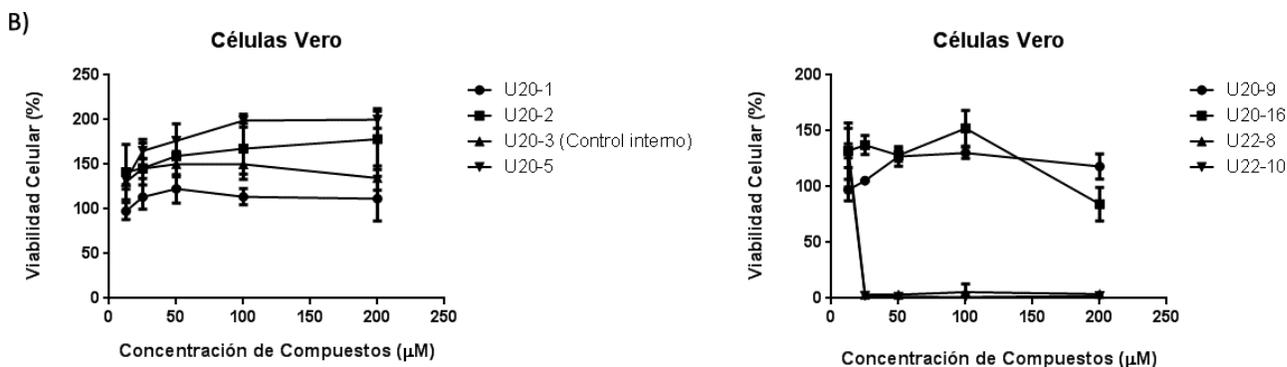


**Figura 2 Estructura de los azasteroides de síntesis orgánica.** Sintetizados en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Se utilizaron cuatro componentes Ugi (U-4CR) un grupo amino, un ácido, un grupo carboxilo y un isocianuro. PM (Peso Molecular).

### 5.1.1. Citotoxicidad

En primer lugar se determinó si los compuestos a estudiar presentan un efecto citotóxico. Para ello, células A549 y Vero crecidas en microplacas de 96 pocillos fueron tratadas con diferentes concentraciones de los azasteroides y al cabo de 24 h se realizó el ensayo con MTT, obteniéndose los porcentajes de viabilidad celular (**Figura 3**) a partir de los cuales se determinó la  $CC_{50}$ .





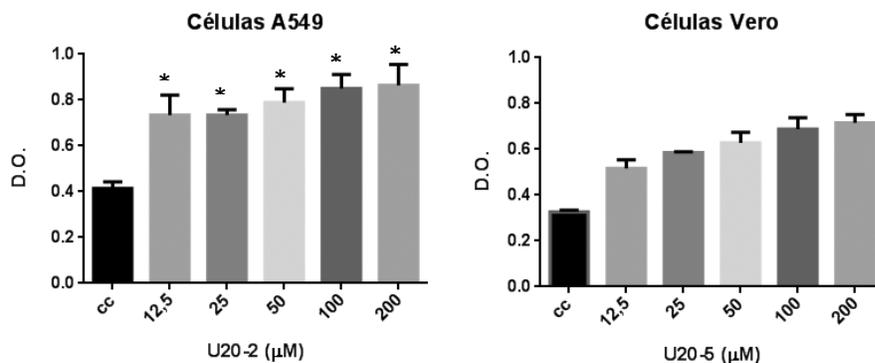
**Figura 3 Citotoxicidad de los azasteroides.** (A) Células A549 y (B) Células Vero fueron tratadas con distintas concentraciones de compuestos por 24 h a 37°C. Posteriormente se agregó MTT, se incubó a 37°C y a las 4 h se midió la DO con lector de microplacas a 570 nm. Se representa la viabilidad celular (%) como el promedio de triplicados.

Los valores de  $CC_{50}$  (**Tabla 1**) para cada compuesto son similares en ambas líneas celulares. Todos los compuestos de la serie U20 presentaron valores de  $CC_{50}$  superiores a la máxima concentración analizada (200  $\mu\text{M}$ ), mientras que los compuestos de la serie U22 resultaron tóxicos en todas las concentraciones ensayadas. Por lo tanto, se decidió continuar con el estudio de los compuestos de la serie U20 únicamente.

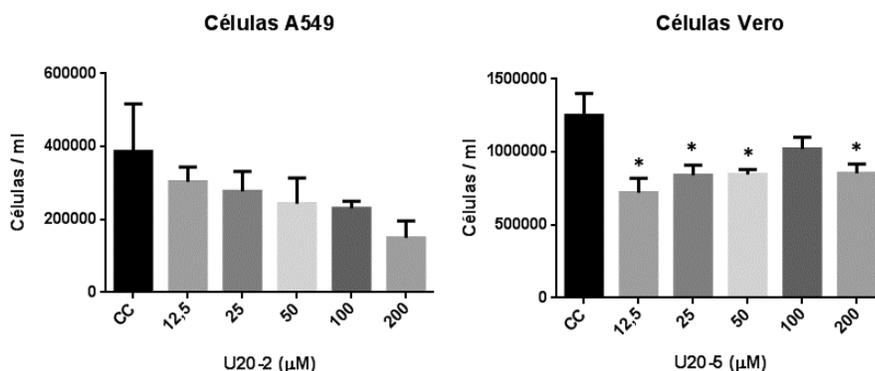
Debido a los elevados porcentajes de viabilidad celular obtenidos en el presente ensayo, se realizaron pruebas de significancia estadística para los valores de D.O. obtenidos en el ensayo de MTT de los compuestos que presentaron mayor % de viabilidad en cada línea celular. Y bajo las mismas condiciones, con los mismos compuestos, se cuantificaron las células en cámara de Neubauer.

Por el método del MTT (**Figura 4**), el compuesto U20-2 aumentó de manera significativa los valores de D.O. en las células A549 tratadas con relación al CC ( $p < 0,001$ ). Si bien el compuesto U20-5 también provocó un aumento en los valores de D.O. en las células Vero, dicho aumento no fue significativo.

Cuando se realizó el recuento de células viables (**Figura 5**), se observó que el compuesto U20-2 no afectó de manera significativa la viabilidad de las células A549, pero se observó una disminución de la misma a medida que aumentaba la concentración del compuesto. Si bien en las células Vero tratadas con el compuesto U20-5, se observó una disminución significativa de la viabilidad celular en presencia de 12,5, 25, 50 y 200  $\mu\text{M}$  del compuesto ( $p < 0,01$ ), dicha disminución no fue superior al 42%.



**Figura 4 D.O. de azasteroides en el ensayo de MTT.** Células A549 y Vero crecidas en microplacas de 96 pocillos fueron tratadas con distintas concentraciones de compuestos por 24 h. Posteriormente se agregó MTT, se incubó a 37°C y a las 4 h se midió la D.O. con lector de microplacas a 570 nm. Se presenta las D.O. como el promedio de triplicados. CC (Control Células). \* Significativamente diferente con respecto al CC ( $p < 0,001$ ).



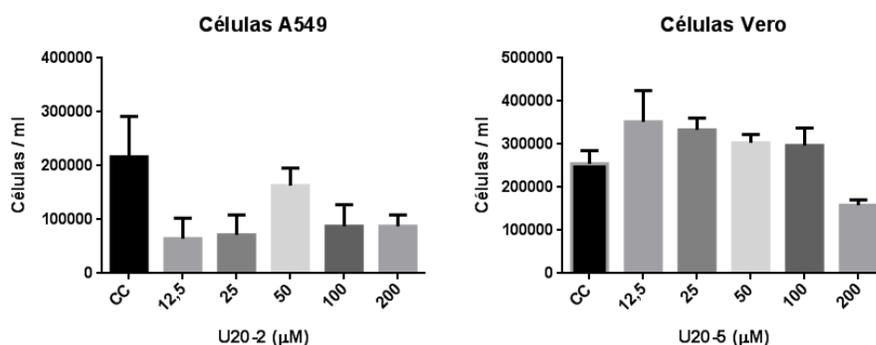
**Figura 5 Efecto de los azasteroides en la viabilidad de células A549 y Vero.** Monocapas de células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 96 pocillos fueron tratadas con diferentes concentraciones de U20-2 y U20-5 (12,5 – 200 µM) durante 24 h a 37°C. Al cumplirse las incubaciones, se cuantificaron las células en cámara de Neubauer. Se expresa el número de células como promedio de triplicados. CC (control celular). \* Significativamente diferente con respecto al CC ( $p < 0,01$ ).

### 5.1.2. Efecto de los azasteroides sobre la proliferación celular

Para determinar si los azasteroides ejercían algún efecto sobre la proliferación celular, se trataron células A549 y Vero con los compuestos U20-2 y U20-5 respectivamente al momento de sembrar las células.

No se observaron diferencias significativas en la cantidad de células encontradas entre los controles y las células tratadas en todo el rango de

concentraciones de ambos compuestos (**Figura 6**). Por lo tanto los compuestos no estimulan la proliferación celular *per se*.



**Figura 6 Efecto de los azasteroides en el crecimiento celular.** Se sembraron células A549 y células Vero en microplacas de 96 pocillos en presencia de diferentes concentraciones de U20-2 y U20-5 (12,5 – 200 µM) durante 24 h a 37°C. Al cumplirse las incubaciones, se cuantificaron las células en cámara de Neubauer. Se expresa el número de células como promedio de triplicados. CC (control celular).

A partir de los datos obtenidos en los ensayos anteriores podemos concluir que los compuestos azasteroides no afectan la proliferación ni la viabilidad de las células A549 y Vero. Debido a que el método de MTT mide la actividad de las enzimas mitocondriales de las células viables, los valores elevados de viabilidad celular observados mediante este método podrían corresponder a un aumento de la actividad metabólica celular. Por lo tanto, es probable que los compuestos estén ejerciendo un efecto sobre la actividad metabólica de las células A549 y Vero.

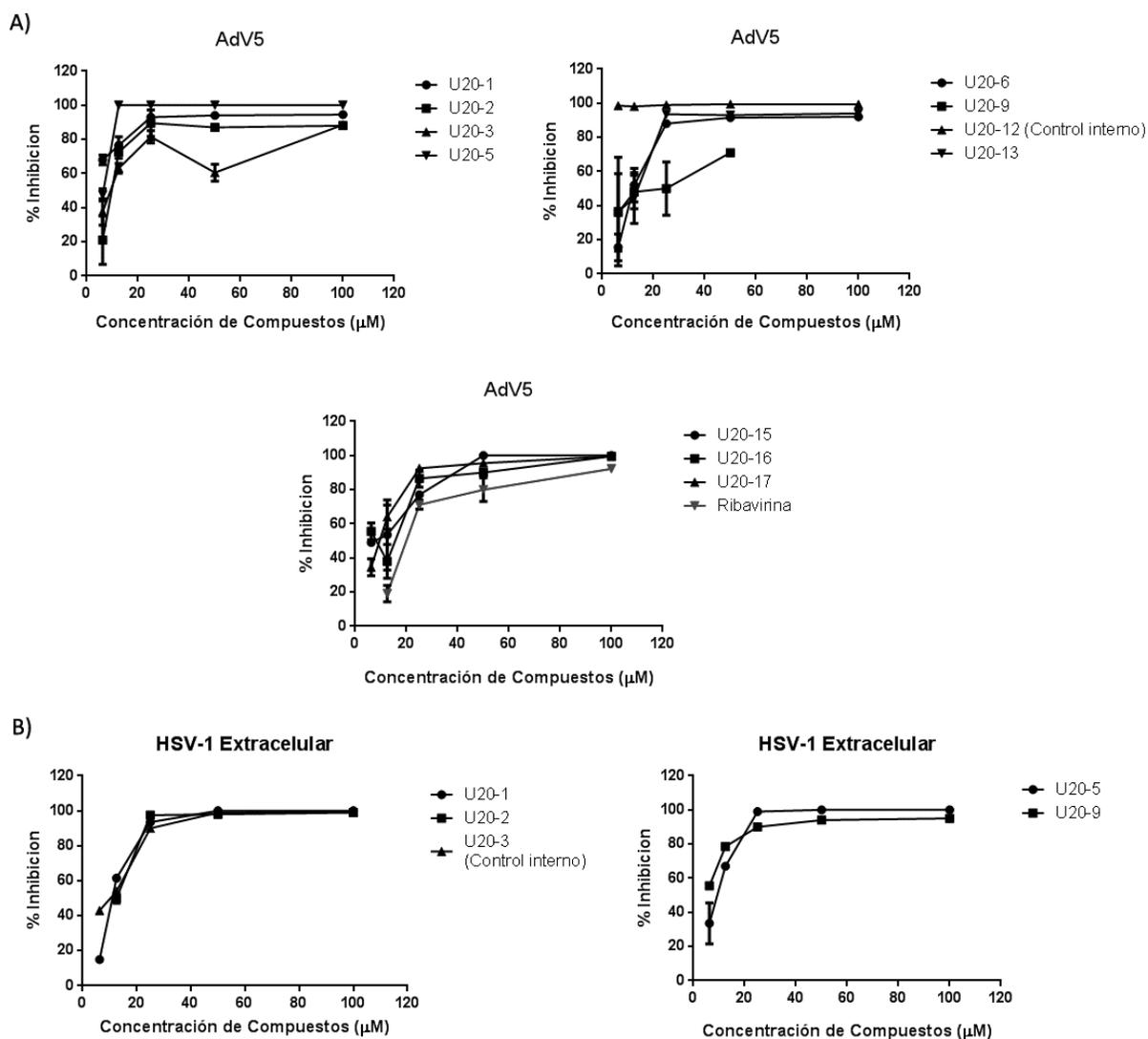
## 5.2. Actividad antiviral

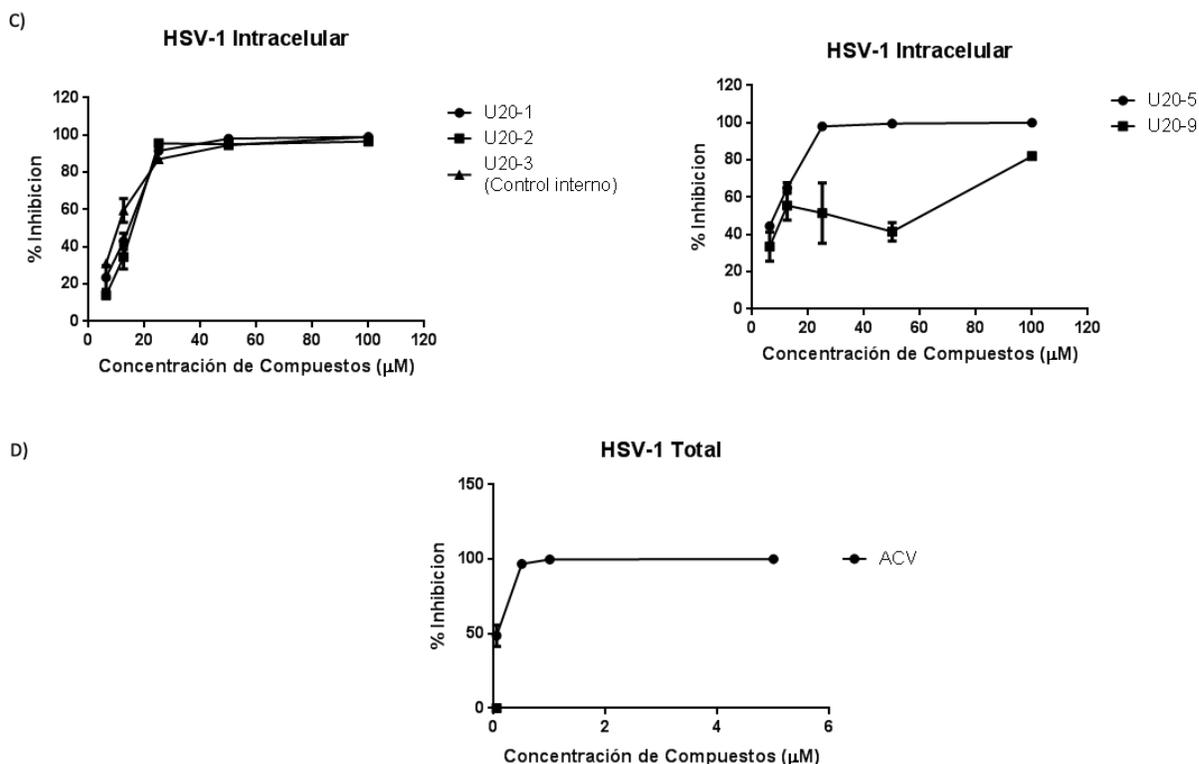
### 5.2.1. Efecto de los compuestos sobre la multiplicación viral

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre la multiplicación de AdV y HSV, se infectaron células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 96 pocillos con AdV5 (m.i.=1) y HSV-1 (m.i.=0,1), respectivamente. Luego de la adsorción, se trataron las células con las diferentes concentraciones de todos los compuestos de la serie U-20. Al cabo de 24 h de incubación a 37°C, se cosecharon los sobrenadantes y se tituló la infectividad viral por el método de formación de placas en medio semisólido. Se calcularon los porcentajes de inhibición de la multiplicación viral con respecto a los controles sin tratar.

Para HSV-1 se cuantificó el título viral intra y extracelular, debido a que tiene la capacidad de salir por brotación, incluso antes de la lisis celular, generándose así una acumulación de partículas virales en el medio de cultivo y en el interior de las células.

En la **Figura 7** se observan los porcentajes de inhibición del rendimiento viral en función de las concentraciones de los compuestos ( $\mu\text{M}$ ), a partir de los cuales se obtuvieron los valores de  $\text{CE}_{50}$  para cada uno (**Tabla 1**). Se utilizó Ribavirina como control positivo de actividad anti-AdV y ACV como control positivo de actividad anti-HSV. Todos los compuestos fueron efectivos para reducir la multiplicación de ambos virus y lo hicieron de manera dependiente de la concentración de los compuestos. El compuesto U20-9 fue el menos activo.





**Figura 7 Efecto inhibitorio de los azasteroides sobre el rendimiento viral.** Células A549 y células Vero infectadas con AdV5 (m.i.=1) y HSV-1 (m.i.=0,1) se trataron o no con diferentes concentraciones de los azasteroides (6,25 – 100  $\mu\text{M}$ ). A las 24 h.p.i. se cosechó y se cuantificó el virus infeccioso por el método de formación de placas. Se determinó el porcentaje de inhibición de la multiplicación viral de los compuestos con respecto a los controles sin tratar. (A) AdV5, (B) HSV-1 extracelular, (C) HSV-1 intracelular y (D) HSV-1 total. Se utilizó Ribavirina como control positivo de actividad anti AdV y ACV como control positivo de actividad anti HSV. Se representa el porcentaje de inhibición como el promedio de duplicados.

Se obtuvo el índice de selectividad (IS) para cada compuesto, que corresponde al cociente  $CC_{50}/CE_{50}$ . Consideramos que un compuesto tiene una actividad antiviral aceptable cuando el IS es igual o mayor a 10 (**Tabla 1**).

Los IS de todos los azasteroides analizados frente a AdV5 fueron superiores al obtenido con Ribavirina. El compuesto U20-1 presentó un IS similar al obtenido con el control interno (U20-12), siendo éstos los valores más altos obtenidos frente a AdV5.

Los IS obtenidos frente a HSV-1 no superaron al obtenido con ACV, pero sí fueron superiores al IS del control interno (U20-3), con excepción del compuesto U20-2. El compuesto U20-5 presentó el mayor IS de los azasteroides analizados frente al HSV-1.

Tabla 1 Citotoxicidad y actividad antiviral de los azasteroides sintéticos.

Compuestos	Células A549	Adv5		Células Vero	HSV-1	
	CC <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>50</sub> (μM)	IS	CC <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>50</sub> (μM)	IS
U20-1	> 200	<6.25	>32	> 200	14	14,3
U20-2	> 200	10	20	> 200	18	11,1
U20-3	> 200	10	20	> 200	16	12,5
U20-5	> 200	7	28,5	> 200	< 6,25	>32
U20-6	> 200	13	15,4	ND	-	-
U20-9	> 200	20	10	> 200	12	16,7
U20-12	> 200	<6.25	>32	ND	-	-
U20-13	> 200	15	13,3	ND	-	-
U20-15	> 200	7	28,5	ND	-	-
U20-16	> 200	15	13,3	>200	ND	-
U20-17	> 200	10	20	ND	-	-
U22-8	< 12,5	ND	-	6,5	ND	-
U22-10	ND	-	-	12,4	ND	-
Ribavirina	>200	23	9	ND	-	-
Aciclovir	ND	-	-	>500*	0,10	>5000

\* Valores tomados de (Dávola *et al.*, 2012)

CC<sub>50</sub> (concentración citotóxica 50%): concentración de compuesto que reduce en un 50% la viabilidad celular.

CE<sub>50</sub> (concentración efectiva 50%): concentración de compuesto que reduce en un 50% el rendimiento viral.

IS (índice de selectividad): CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>

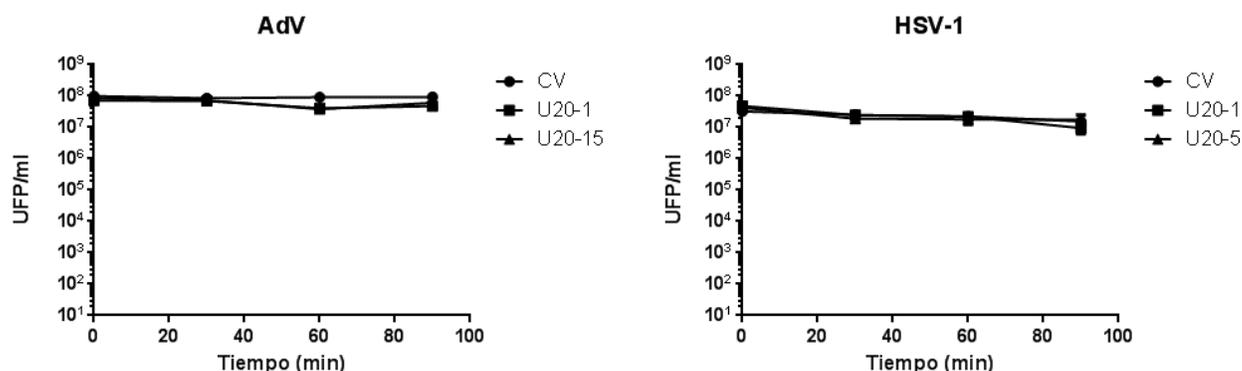
ND: no determinado

A partir de los datos obtenidos se decidió continuar el trabajo únicamente con los dos compuestos más activos para cada virus. Se eligieron los compuestos U20-1 y U20-15 para caracterizar su mecanismo de acción frente a Adv5 y U20-1 y U20-5, frente a HSV-1.

### 5.2.2. Actividad virucida de los azasteroides sintéticos

Para caracterizar el mecanismo de acción antiviral de los compuestos, en primer lugar se evaluó el efecto directo de los mismos sobre la infectividad de ambos virus. Se decidió ensayar la máxima concentración de los azasteroides utilizada en los ensayos de citotoxicidad (200 μM).

Los compuestos U20-1, U20-5 y U20-15 no afectaron la infectividad viral al cabo de 90 min de incubación (**Figura 8**). En consecuencia, los azasteroides ensayados no poseen un efecto directo sobre AdV5 ni HSV-1 y, por ende, no son virucidas.



**Figura 8 Actividad virucida de los azasteroides sintéticos.** Suspensiones de virus conteniendo  $3,7 \times 10^7$  UFP/ml de AdV5 y  $4 \times 10^7$  UFP/ml de HSV-1 fueron incubados con los compuestos (200  $\mu$ M) o con MM (control virus) en volúmenes iguales a 37°C durante 30, 60 y 90 min, tiempos en los cuales se tomaron alícuotas y se tituló la infectividad viral remanente mediante plaqueo en medio semisólido. Se representa el título viral (UFP/ml) como el promedio de duplicados. CV (Control Virus).

Para los siguientes ensayos se utilizó una concentración de 50  $\mu$ M de los azasteroides U20-1, U20-5 y U20-15, elegida por ser la concentración más baja que generó inhibición del rendimiento viral entre el 95 y 100% frente a ambos virus (**Figura 7**).

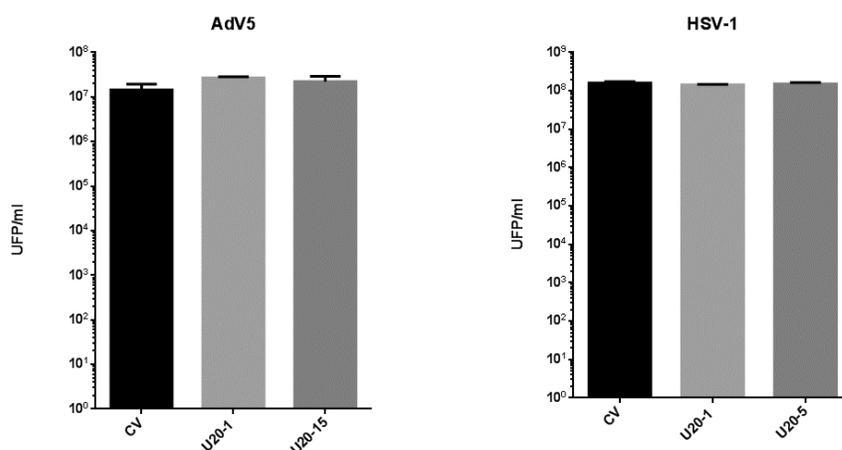
### 5.2.3. Efecto de los azasteroides sobre la adsorción viral

Los virus utilizan distintos receptores celulares para unirse a la célula hospedadora. En el caso del AdV, la unión se realiza entre la fibra viral y la proteína transmembrana de alta afinidad CAR, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) (Knipe & Howley, 2013). Por otro lado, el HSV-1 utiliza sus glicoproteínas (gB, gC y gD) para interactuar con los glicosaminoglicanos de la superficie celular, en particular el heparán sulfato (Kukhanova *et al.*, 2014).

Con el propósito de establecer si los azasteroides interferían en esta etapa del ciclo replicativo de los virus, monocapas de células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con AdV5 y HSV-1 (m.i.=1) junto con

los compuestos U20-1, U20-5 y U20-15 (50  $\mu$ M) durante 1 h a 4°C. Transcurrido este tiempo, se retiró el inóculo, se cubrieron las monocapas con MM y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 24 h de incubación, se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el virus infectivo por el método de plaqueo en medio semisólido.

No se observaron diferencias significativas entre los títulos virales de las muestras tratadas con los compuestos y el control virus tanto para AdV5 como para HSV-1 (**Figura 9**). Por lo tanto, podemos concluir que los azasteroides no ejercen su acción inhibitoria sobre la etapa de adsorción de AdV ni de HSV-1 a sus respectivos receptores celulares.



**Figura 9 Efecto de los azasteroides sintéticos en la adsorción viral.** Células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con AdV5 y HSV-1 (m.i.=1) junto con los compuestos (50  $\mu$ M) o no, en un volumen final de 100  $\mu$ l a 4°C durante 1 h. Posteriormente, se retiró el inóculo, se lavó con PBS, se cubrió con MM y se incubó a 37°C durante 24 h. Se tituló el virus infectivo por el método de plaqueo en medio semisólido. Se representa el título viral (UFP/ml) como el promedio de duplicados. CV (Control Virus).

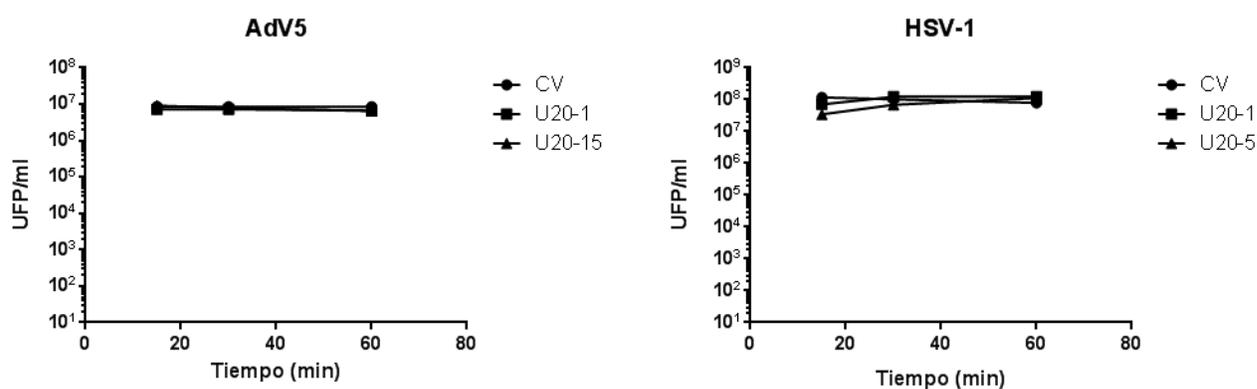
#### 5.2.4. Efecto de los azasteroides en la internalización del virus

Después de la interacción entre la partícula viral y el receptor celular, los virus se pueden internalizar en la célula por diferentes mecanismos. AdV lo hace por medio de endosomas. Éstos contienen a las partículas virales y se lisan por la disminución del pH inducido por ATPasas. En otras ocasiones la proteína de la base del pentón se une a integrinas de la membrana celular, ingresando por un mecanismo dependiente de clatrina. Posteriormente se promueve la liberación del ADN viral hasta los poros nucleares (Henaff *et al.*, 2011). Por otra parte, HSV-1 ingresa a la célula por dos mecanismos: la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática y el transporte adicional de la cápside viral al núcleo, y

mediante endocitosis del virión envuelto seguido de fusión de la envoltura con vesículas intracelulares (Kukhanova *et al.*, 2014).

Para determinar si el efecto inhibitorio de los compuestos U20-1, U20-5 y U20-15 estaba implicado en los procesos de internalización viral, se infectaron monocapas de células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos con AdV5 y HSV-1 (m.i.=1) durante 1 h a 4°C. Posteriormente se retiró el inóculo, se cubrió con los compuestos (50 µM) y se incubó a 37°C durante 15, 30 y 60 min. Transcurrido cada uno de los tiempos, se retiraron los sobrenadantes, se inactivó el virus no internalizado y se cubrieron los pocillos con MM. Las microplacas se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 24 h se cosecharon los sobrenadantes y se tituló la infectividad viral por el método de plaqueo en medio semisólido.

No se observaron diferencias entre los títulos virales obtenidos en las células tratadas con los compuestos respecto al control virus en ninguno de los tiempos ensayados (**Figura 10**). Por lo tanto, concluimos que los azasteroides no ejercen su acción inhibitoria sobre la etapa de internalización del virus en la célula hospedadora.



**Figura 10 Efecto de los azasteroides sintéticos en la internalización viral.** Células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con AdV5 y HSV-1 (m.i.=1) a 4°C durante 1 h. Luego, se retiró el inóculo viral y se realizaron lavados con PBS, se agregaron 300 µl de compuesto (50 µM) o MM, y se incubaron las placas a 37°C durante 15, 30 y 60 min. Cumplido cada tiempo se retiraron los sobrenadantes, se realizaron lavados con PBS y se trataron los pocillos con buffer citrato (pH= 3) durante 1 minuto para inactivar el virus no internalizado. Luego de dos lavados con PBS, se cubrieron las monocapas con MM y se incubaron a 37°C durante 24 h. Luego, se tituló el virus infectivo por el método de plaqueo en medio semisólido. Se representa el título viral (UFP/ml) como el promedio de duplicados. CV (Control Virus).

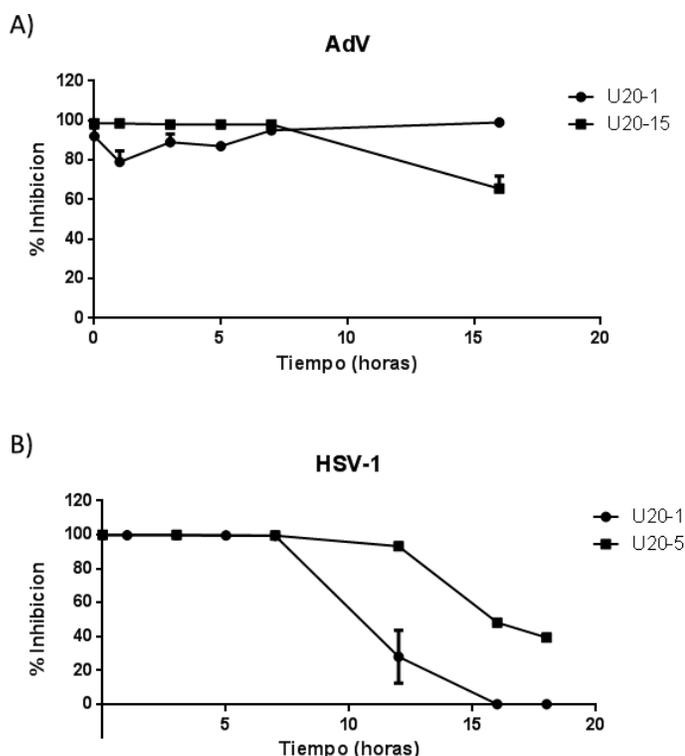
### 5.2.5. Efecto de los azasteroides agregados a distintos tiempos post-infección

Para ubicar temporalmente el efecto inhibitorio de los compuestos en el ciclo de multiplicación viral, células A549 y Vero fueron infectadas con Adv5 y HSV-1 (m.i.=1) durante 1 h a 37°C. Luego de la adsorción se retiró el inóculo y se cubrieron las células con MM. Posteriormente, a diferentes tiempos p.i. se retiró el MM y se agregaron los compuestos U20-1, U20-5 y U20-15 (50 µM) durante 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al cumplirse este tiempo se cosecharon los sobrenadantes y se tituló la infectividad viral por el método de plaqueo en medio semisólido.

Los compuestos U20-1 y U20-15 mantuvieron una inhibición de la multiplicación de Adv5 de alrededor del 90% cuando fueron agregados hasta 7 h luego de la infección (**Figura 11 A**). El compuesto U20-1 ejerció una inhibición de un 99% aún agregado a las 16 h.p.i., mientras que el efecto inhibitorio del compuesto U20-15 disminuyó a un 65% en las mismas condiciones experimentales.

Cuando los compuestos fueron agregados a las 24 h.p.i., el efecto inhibitorio disminuyó al 40% en el caso de U20-1 y al 43% con el U20-15 (no mostrado). Dado que Adv presenta un ciclo de replicación viral que dura entre 24 y 36 h (Knipe & Howley, 2013), los azasteroides estarían actuando a lo largo del ciclo de replicación viral en etapas tardías. Sin embargo, no se puede descartar que también estén ejerciendo su efecto inhibitorio en etapas tempranas.

En el caso del HSV-1, los compuestos U20-1 y U20-5 inhibieron el rendimiento viral en un 100% cuando fueron agregados hasta las 7 h.p.i. (**Figura 11 B**). La inhibición ejercida por el compuesto U20-1 disminuyó al 28% a las 12 h.p.i. y a partir de las 16 h.p.i. ya no se observó inhibición del rendimiento viral. El compuesto U20-5 redujo el rendimiento del HSV-1 en 92%, 48% y 39% a las 12, 16 y 18 h.p.i., respectivamente. Dado que HSV-1 presenta un ciclo de replicación viral que dura de 18 a 20 h aproximadamente (Kukhanova *et al.*, 2014), los azasteroides podrían estar actuando tanto en etapas tempranas como tardías del ciclo de replicación del HSV-1.



**Figura 11 Efecto de los azasteroides sintéticos agregados a diferentes tiempos p.i..** Monocapas de células A549 y células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con AdV5 y HSV-1 (m.i.=1) e incubadas a 37°C durante 1 h. Luego de la adsorción se retiró el inóculo y se cubrieron los pocillos con MM. A distintos tiempos p.i. (0, 1, 3, 5, 7, 16, 18 y 24 h) el MM fue reemplazado por cada compuesto (50  $\mu$ M) y la placa fue incubada a 37°C durante 24 h. Se tituló el virus infeccioso por el método de plaqueo en medio semisólido. Se representa el % de inhibición del rendimiento viral como el promedio de duplicados.

### 5.2.6. Efecto del compuesto U20-1 sobre la expresión y localización intracelular de las proteínas virales

Los azasteroides estarían ejerciendo su efecto inhibitorio en etapas del ciclo de replicación comprendidas entre la internalización y la salida de AdV5 y HSV-1 de las células hospedadoras. Probablemente, estarían actuando sobre etapas tempranas y tardías, incluyendo la síntesis proteica en ambos casos. Por lo tanto, decidimos evaluar la expresión de las proteínas virales mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Western Blot (WB).

Para los siguientes ensayos se utilizó únicamente el compuesto U20-1 debido a la mayor disponibilidad de este compuesto.

Se determinó entonces el efecto del compuesto U20-1 sobre la expresión y localización de la proteína inmediato temprana E1A y la proteína tardía hexón de AdV5, y sobre la glicoproteína gD del HSV-1.

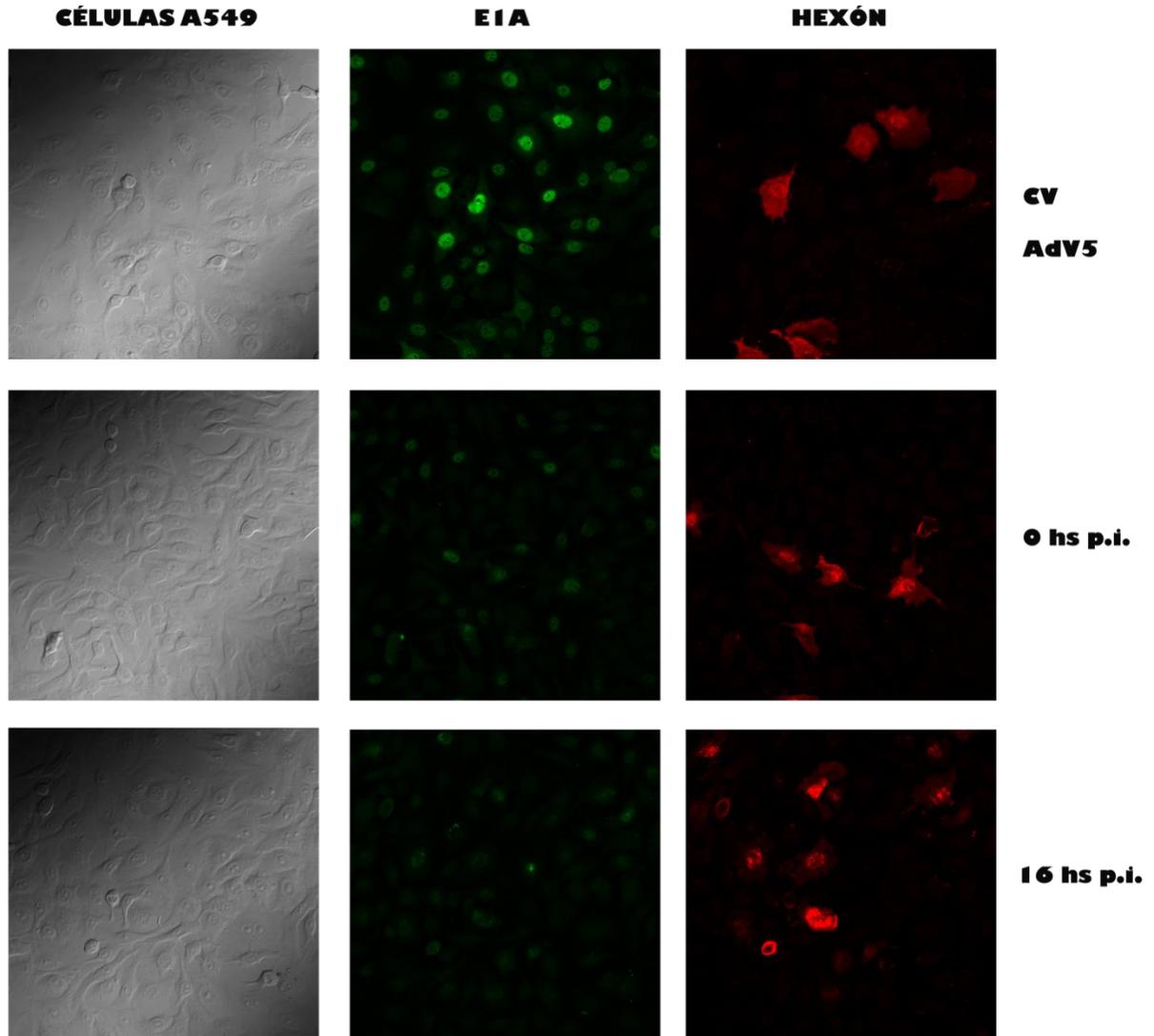
#### **5.2.6.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Las células A549 y células Vero crecidas en cubreobjetos en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con AdV5 y HSV-1 (m.i.=1) y tratadas o no con el compuesto U20-1 (50  $\mu$ M) a las 0 y 16 h.p.i para AdV5 y 0 y 7 h.p.i. en el caso de HSV-1. Las células fueron incubadas a 37°C durante 24 y 48 h. Luego, se fijaron las células y se revelaron las proteínas E1A, hexón y gD con los anticuerpos correspondientes. Se observaron las células en microscopio confocal Olympus FB300 y se fotografiaron con un aumento de 400x.

Se observó que la mayoría de las células A549 infectadas y sin tratar (control virus), expresaron la proteína temprana E1A a las 24 h.p.i., con una localización nuclear, mientras que la proteína tardía hexón sólo se expresó en pocas células y distribuida en toda la célula (**Figura 12**). A las 48 h.p.i. la expresión de E1A y hexón se observó en todas las células del control de virus. La proteína E1A continuó observándose en el núcleo celular, mientras que hexón se distribuyó de manera predominantemente citoplasmática, a diferencia de lo observado a las 24 h.p.i.. A las 48 h.p.i. el virus ha completado un ciclo replicativo y se encuentra en el segundo, por ello se observó una mayor expresión de las proteínas tanto tempranas como tardías (**Figura 13**).

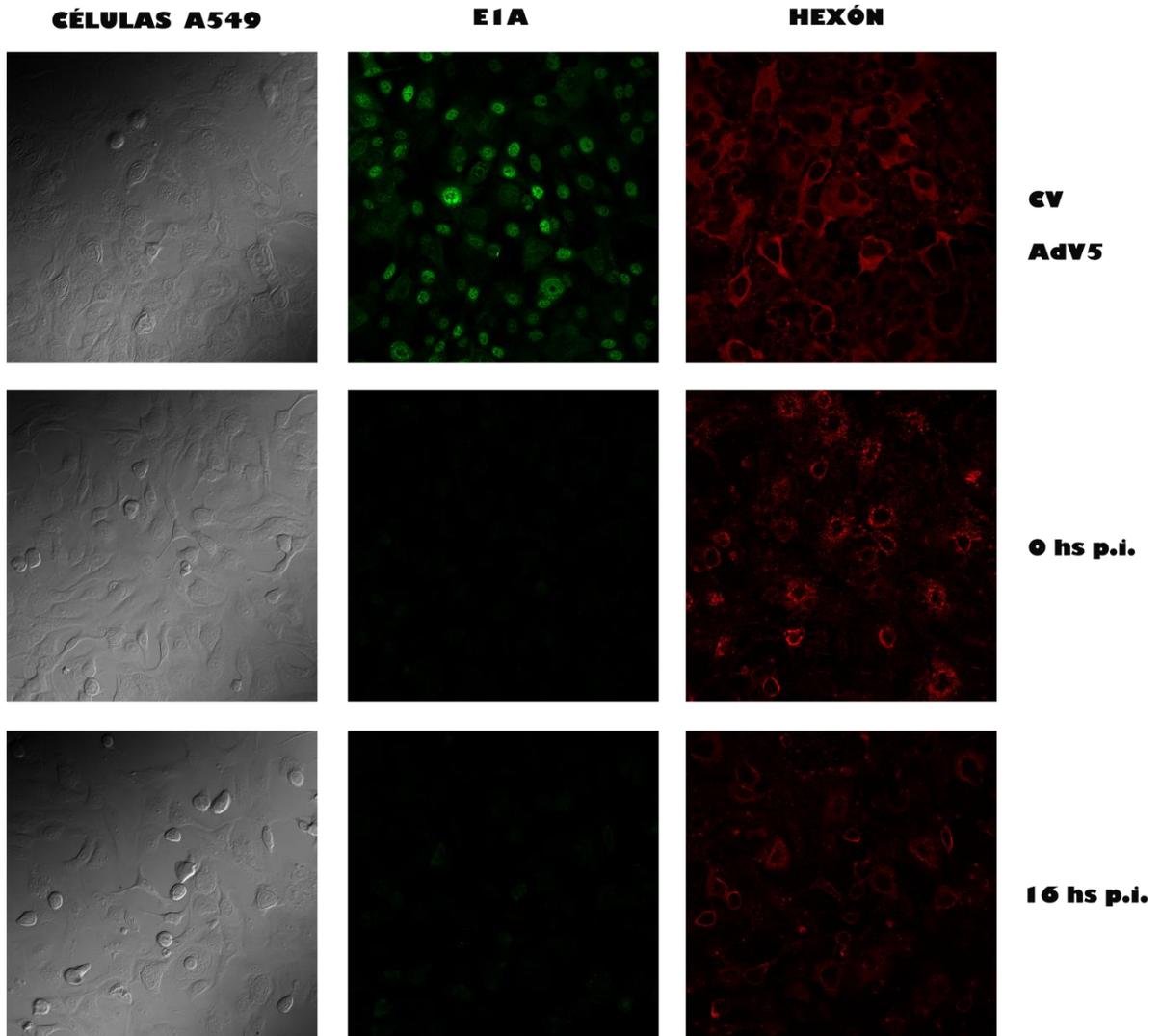
En las células infectadas que recibieron tratamiento, se observó que a las 24 h.p.i. se produjo una disminución de la expresión de E1A, mientras que la expresión de hexón permaneció similar al control virus. A las 48 h.p.i., la expresión de E1A disminuyó casi en su totalidad. La proteína hexón también sufrió una disminución de su expresión, pero no tan marcada como E1A.

U20-1 redujo la expresión de las proteínas de AdV. Estos resultados junto con los obtenidos en el ensayo de agregado a distintos tiempos permiten concluir que el compuesto actúa tanto a etapas tempranas como tardías del ciclo de replicación de AdV. El compuesto no afectó la localización intracelular de las proteínas de AdV (**Figura 12 y 13**).



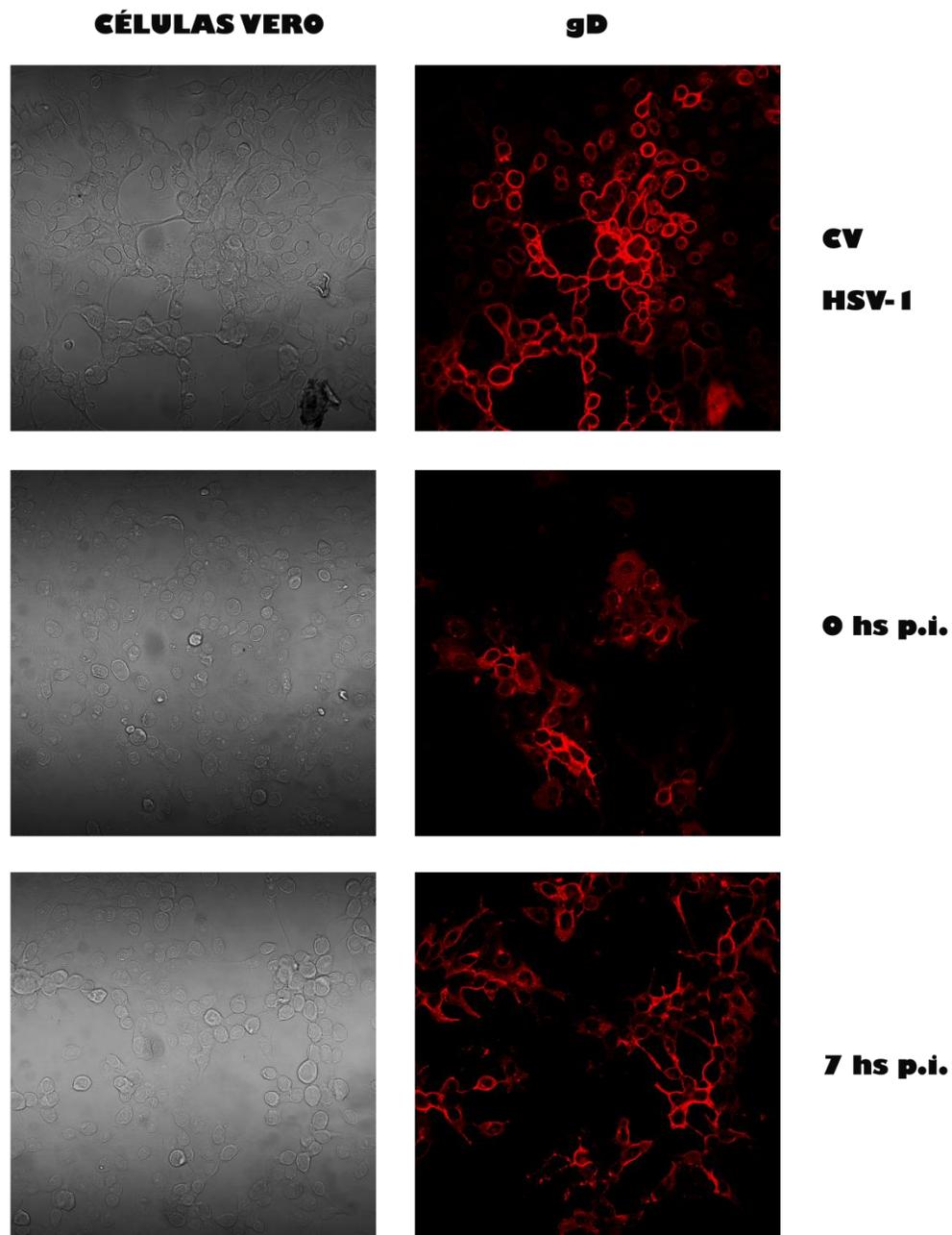
**Figura 12 Efecto de U20-1 sobre la expresión y localización intracelular de las proteínas de AdV5.** Monocapas de células A549 crecidas en cubreobjetos fueron infectadas con AdV5 (m.i.=1). A diferentes tiempos p.i. (0 y 16 h) las células recibieron tratamiento o no y fueron incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente, se fijaron las células con metanol y se revelaron las proteínas virales por IFI con los anticuerpos correspondientes. Se observaron los preparados en microscopio confocal Olympus FB300 y se fotografiaron con un aumento de 400x. CV (Control Virus)

En el caso de la infección con el HSV-1, las células que no fueron tratadas con U20-1 (control virus) presentaron la morfología típica de la acción citopática de HSV-1: redondeamiento y formación de sincicios. Dichas células expresaron gD con localización citoplasmática. En las células infectadas que recibieron tratamiento después de la adsorción viral, se visualizó una disminución de la expresión de gD y



**Figura 13 Efecto de U20-1 sobre la expresión y localización intracelular de las proteínas de AdV5.** Monocapas de células A549 crecidas en cubreobjetos fueron infectadas con AdV5 (m.i.=1). A diferentes tiempos p.i. (0 y 16 h) las células recibieron tratamiento o no y fueron incubadas a 37°C por 48 h. Posteriormente, se fijaron las células con metanol y se revelaron las proteínas virales por IFI con los anticuerpos correspondientes. Se observaron los preparados en microscopio confocal Olympus FB300 y se fotografiaron con un aumento de 400x. CV (Control Virus)

un menor efecto citopático del virus. La morfología celular se mantuvo más conservada y, si bien se observó un ligero redondeamiento celular, no se observaron sincicios. En las células infectadas que recibieron tratamiento a las 7 h.p.i. la expresión de gD fue similar a la del control de virus, pero la morfología celular se encontró más conservada, con un ligero redondeamiento y pocos focos de formación de sincicios (**Figura 14**).



**Figura 14 Efecto de U20-1 sobre la expresión y localización intracelular de las proteínas de HSV-1.** Monocapas de células Vero crecidas en cubreobjetos fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=1). A diferentes tiempos p.i. (0 y 7 hs) las células recibieron tratamiento o no y fueron incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente, se fijaron las células con metanol y se revelaron las proteínas virales por IFI con los anticuerpos correspondientes. Se observaron los preparados en microscopio confocal Olympus FB300 y se fotografiaron con un aumento de 400x. CV (Control Virus)

U20-1 produjo una disminución de la expresión de la gD viral y protegió a la célula cuando el tratamiento fue aplicado dentro de las 7 h.p.i.. Estos resultados coinciden con los observados en el ensayo de adición a distintos tiempos. Por último, U20-1 no alteró la localización de dicha glicoproteína en las células.

#### 5.2.6.2. *Western Blot*

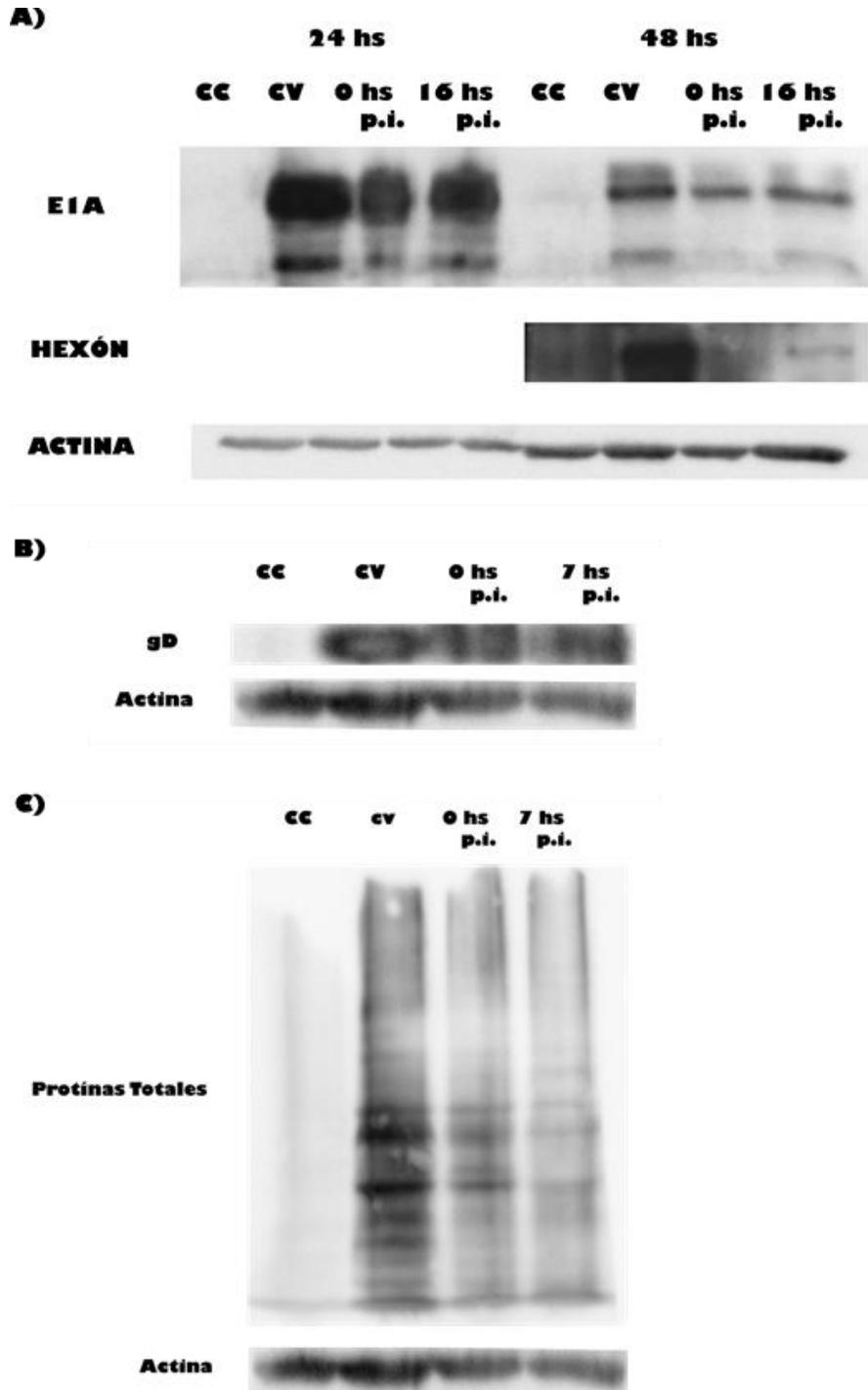
El efecto del compuesto U20-1 sobre la expresión de proteínas virales también fue evaluado a través del ensayo de Western Blot.

Para ello, monocapas de células A549 y células Vero fueron infectadas con Adv5 y HSV-1 (m.i.=1), respectivamente, en presencia o ausencia del compuesto, en las mismas condiciones de tratamiento que las utilizadas para las IFI. A las 24 y 48 h de incubación, las monocapas fueron levantadas con buffer de siembra. Se separaron las proteínas en minigeles de poliacrilamida 10% con SDS y se revelaron con anticuerpos específicos. Se utilizó actina como control de carga.

En las muestras de células infectadas con Adv5 se observó que la expresión de la proteína E1A a las 24 h.p.i. disminuyó en presencia del U20-1 con respecto al control. La disminución fue más marcada a las 48 h.p.i. La proteína hexón no fue detectable por este método en las primeras 24 h.p.i., pero a las 48 h.p.i. se observó la disminución de la expresión de las bandas de hexón en presencia de U20-1 con respecto al control virus. La disminución de la expresión de E1A y hexón fue mayor cuando el compuesto U20-1 se agregó inmediatamente después de la adsorción viral e incubando durante 48 h (**Figura 15 A**).

A diferencia de lo observado en las IFI, en los ensayos de WB no se detectó una disminución en la expresión de la proteína gD de HSV-1 en las células tratadas con U20-1 con respecto al control de virus (**Figura 15 B**). Sin embargo, la expresión de las proteínas totales de HSV-1 sí disminuyó en las muestras de las células tratadas con respecto al control (**Figura 15 C**).

De acuerdo con los resultados expuestos, concluimos que el compuesto U20-1 estaría ejerciendo su efecto inhibitorio a lo largo del ciclo de replicación de Adv5 y HSV-1 en etapas tempranas y tardías de la síntesis de las proteínas virales.



**Figura 15 Efecto del compuesto U20-1 en la expresión de proteínas virales.** Monocapas de células A549 y células Vero fueron infectadas con Adv5 y HSV-1 (m.i.=1). Luego de 1 h de adsorción, los pocillos se cubrieron con MM y a distintos tiempos p.i. se reemplazó el medio por el compuesto U20-1 (50  $\mu$ M). Al cumplirse las 24 y 48 h de incubación, las monocapas fueron levantadas con buffer de siembra. Se separaron las proteínas en minigeles de poliacrilamida 10% con SDS y se reveló la proteína inmediata temprana E1A y la proteína tardía hexón de Adv5 y la glicoproteína gD y las proteínas totales de HSV-1. Se utilizó actina como control de carga. CC (Control Células). CV (Control Virus).

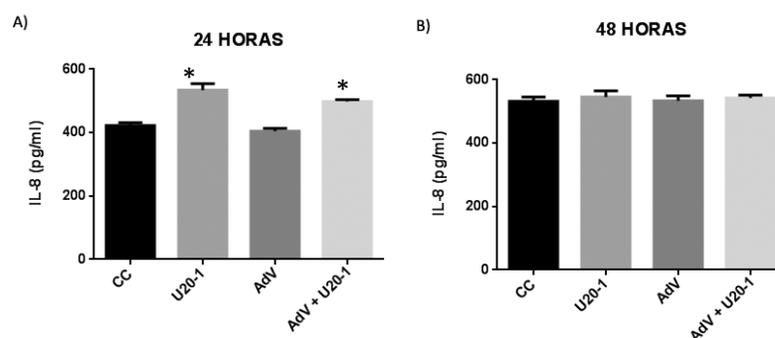
### 5.3. Actividad inmunomoduladora

#### 5.3.1. Efecto del compuesto U20-1 sobre la secreción de IL-8 en células A549 infectadas con AdV5

La IL-8 es una citoquina proinflamatoria implicada en algunas infecciones virales incluyendo la infección por HAdV (Haveman *et al.*, 2010). IL-8 es un potente quimioattractante y activador de neutrófilos y juega un papel importante en la lesión pulmonar aguda (Allen & Kurdowska, 2014). Las células A549 tienen la capacidad de producir IL-8. Zhou *et al.* (2014) cuantificaron IL-8 en sobrenadantes de células A549 infectadas con RSV a las 24 h.p.i.. Más aún, Tamanini y colaboradores describen que la interacción de la fibra de AdV5 con el receptor CAR promueve la transcripción de IL-8 en células A549 (Tamanini *et al.*, 2006). Por lo tanto, decidimos evaluar el efecto del compuesto U20-1 sobre la producción de IL-8 en células A549 infectadas o no con AdV5.

Células A549 crecidas en microplacas de 24 pocillos, fueron infectadas con AdV5 (m.i.=1) y tratadas con el compuesto U20-1 (50  $\mu$ M). Como controles se incluyeron células infectadas y sin tratar, células sin infectar tratadas con U20-1 y células sin infectar. La microplaca se incubó por 24 y 48 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cumplidos los tiempos se cosecharon los sobrenadantes y se midió IL-8 utilizando un kit comercial de ELISA siguiendo las indicaciones del fabricante.

No se observaron diferencias significativas en la secreción de IL-8 entre las células sin infectar (CC) y las células infectadas con AdV. Por otro lado, el tratamiento con U20-1 de las células sin infectar y de las células infectadas, indujo un aumento significativo de la producción de IL-8 con respecto al CC ( $p < 0,0001$ ) a las 24 h de incubación (**Figura 16 A**). Es posible que a las 48 h el medio se haya saturado de IL-8 en todas las muestras y por ello no se observaron diferencias en los distintos tratamientos (**Figura 16 B**).



**Figura 16 Efecto de U20-1 sobre la producción de IL-8 en células A549 infectadas con AdV5.** Células A549 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con AdV5 (m.i.=1) (AdV + U20-1) y tratadas con U20-1 (50  $\mu$ M). Se incluyeron como controles células infectadas, sin tratar (AdV), células sin infectar, tratadas con U20-1 (U20-1) y células no infectadas (CC). Las células fueron incubadas durante 24 y 48 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se coleccionaron los sobrenadantes y se cuantificó IL-8 mediante ELISA, según las especificaciones del fabricante. Se determinó la DO en el lector de microplacas MPR-A 4) a 450 nm. Se representa la cantidad de IL-8 (pg/ml) como el promedio de triplicados. CC (Control Células). \*Significativamente diferente respecto del CC ( $p < 0,0001$ ).

### 5.3.2. Efecto de U20-1 sobre la secreción de citoquinas en células inflamatorias activadas

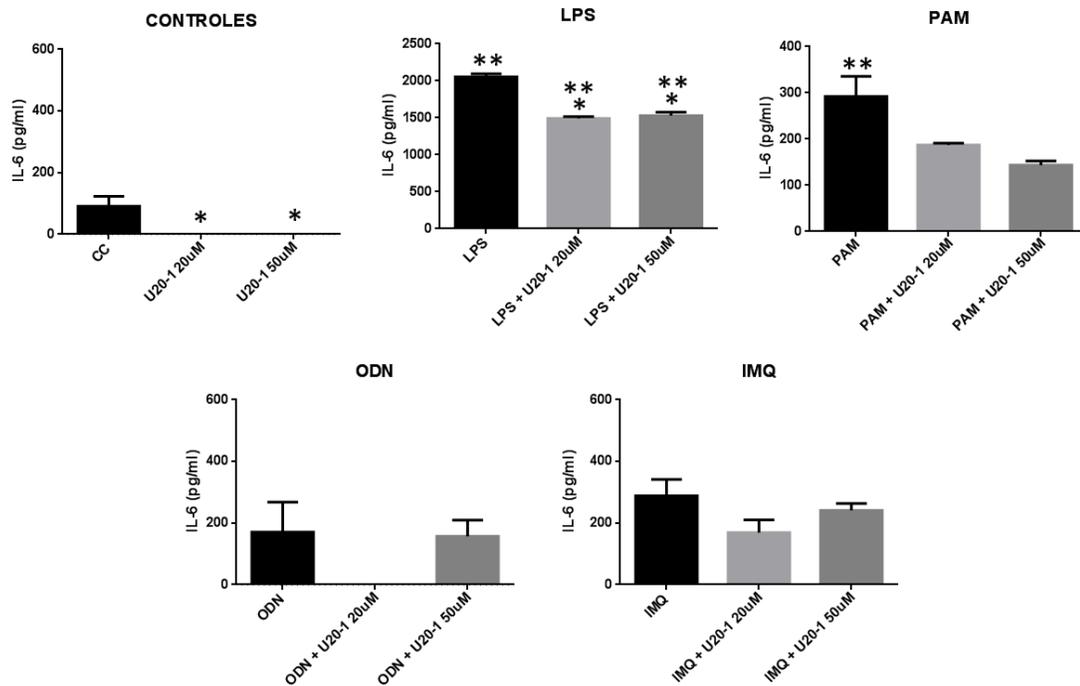
La activación clásica del macrófago es inducida por la exposición al IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$ , o inductores de éste tales como ligandos de receptores tipo Toll (TLR) (CpG DNA, poli (I:C), LPS, peptidoglicano y señales endógenas de las chaperonas HSP de 60 y 70 Kda). Los macrófagos activados clásicamente, entre otros mecanismos, tienen la capacidad de producir y secretar distintas citoquinas y quemoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , CCL3, CXL9 y CXCL10 (Duque Correa & Rojas López, 2007).

Para estudiar el efecto del compuesto U20-1 sobre células inflamatorias, se utilizaron dos líneas celulares de macrófagos: la línea J774A.1 proveniente de ratón y la línea THP1 de humanos. Ambas líneas celulares se activaron utilizando varios estímulos, tales como lipopolisacáridos (LPS) (ligando de TLR4), lipoproteínas diacetiladas (PAM) (ligando de TLR2/TLR6), oligodesoxinucleótidos CpG (ODN) (ligando de TLR9), imiquimod (IMQ) (ligando de TLR7), poliinosinico:ácido-policidílico (Poli (I:C)) (ligando de TLR3), en ausencia y presencia de U20-1 (20 y 50  $\mu$ M). Al cabo de 8 h de incubación a 37°C se midieron en los sobrenadantes diferentes citoquinas proinflamatorias tales como IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes de los cultivos a través de la técnica de ELISA.

#### 5.3.2.1. Determinación de IL-6 y TNF- $\alpha$ en células J774

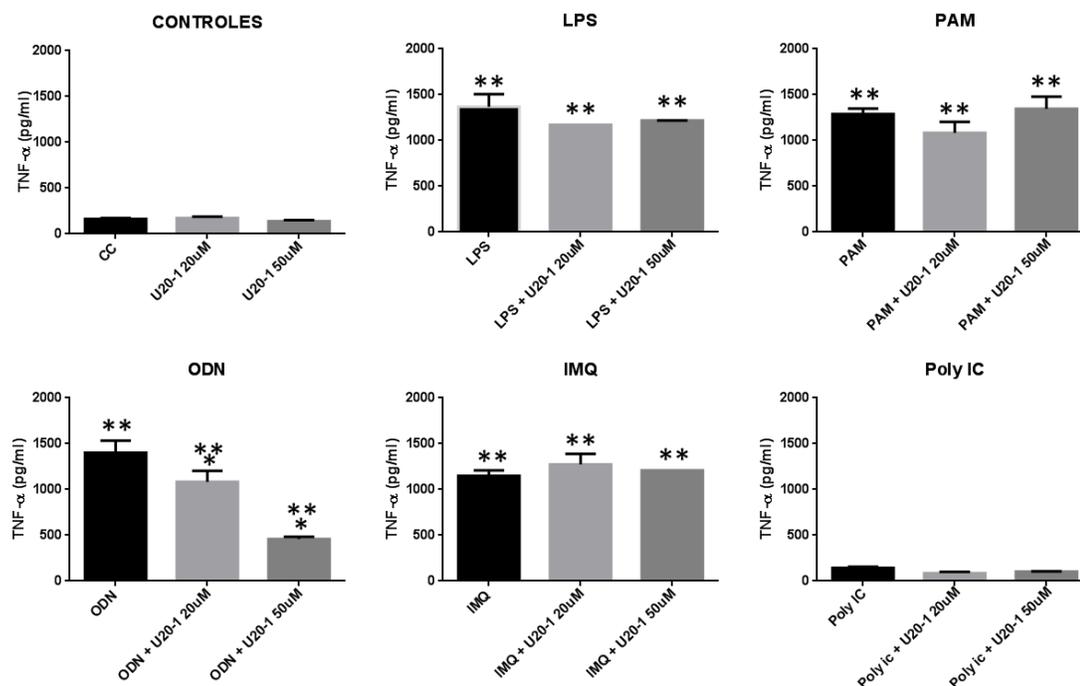
El compuesto U20-1 redujo la producción basal de IL-6 a valores no detectables en los macrófagos J774A.1 no estimulados con respecto al control celular (CC) ( $p < 0,001$ ). Cuando los macrófagos fueron estimulados con LPS, PAM, ODN e IMQ, se observó que el compuesto U20-1 inhibió la secreción de IL-6 con respecto a las células estimuladas y sin tratar. Si bien esta disminución no fue estadísticamente significativa en las células estimuladas con PAM, ODN e IMQ, se observa una

tendencia hacia la reducción de los niveles de dicha citoquina. En las células estimuladas con LPS, la disminución de IL-6 fue estadísticamente significativa en presencia de U20-1 ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 17**). La estimulación con Poli (I:C) no indujo la producción de IL-6 en las células J774A.1.



**Figura 17 Efecto de U20-1 sobre la producción de IL-6 en células J774A.1 activadas con diferentes estímulos.** Monocapas de células J774A.1 fueron activadas con diferentes estímulos y tratadas con el compuesto U20-1 (50 µM) durante 8 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se cuantificó IL-6 en los sobrenadantes cosechados a través de un kit comercial de ELISA, según instrucciones del fabricante. Se representa la concentración de IL-6 (pg/ml) como el promedio de triplicados. CC (Control Células). \* Significativamente diferente con respecto a los estímulos y CC sin U20-1 ( $p < 0,0001$ ). \*\* Significativamente diferente con respecto al CC ( $p < 0,0001$ ).

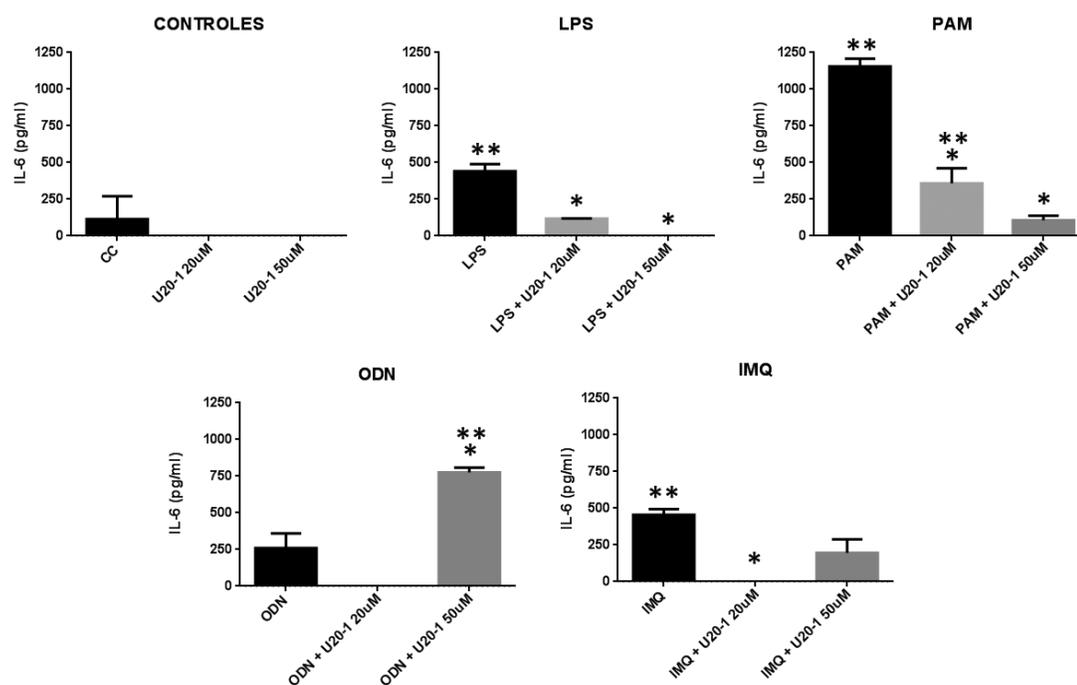
U20-1 no afectó la producción basal de TNF- $\alpha$  en los macrófagos J774A.1 sin estimular con respecto a los controles de células (CC). Asimismo, únicamente en las células estimuladas con ODN, se observó una disminución significativa de la producción de TNF- $\alpha$  en presencia del U20-1 ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 18**).



**Figura 18 Efecto de U20-1 sobre la producción de TNF-α en células J774A.1 activadas con diferentes estímulos.** Monocapas de células J774A.1 fueron activadas con diferentes estímulos y tratadas con el compuesto U20-1 (50 μM) durante 8 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se cuantificó TNF-α en los sobrenadantes cosechados a través de un kit comercial de ELISA, según instrucciones del fabricante. Se representa la concentración de TNF-α (pg/ml) como el promedio de triplicados. CC (Control Células). \* Significativamente diferente con respecto a los estímulos y CC sin U20-1 ( $p < 0,0001$ ). \*\* Significativamente diferente con respecto al CC ( $p < 0,0001$ ).

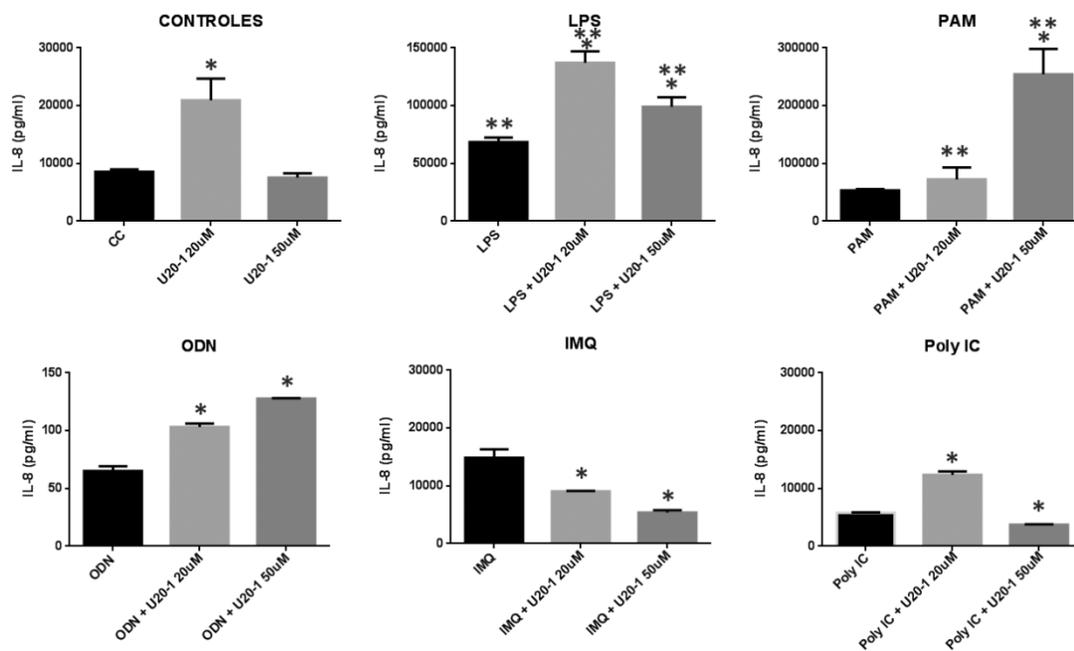
### 5.3.2.2. Determinación de IL-6, IL-8 y TNF-α en células THP1

En la línea celular THP1 de macrófagos humanos, U20-1 disminuyó la producción de IL-6 hasta niveles no detectables en los macrófagos THP1 no estimulados. Cuando los macrófagos fueron estimulados con LPS, PAM e IMQ, el compuesto U20-1 inhibió significativamente la secreción de IL-6 con respecto a las células estimuladas y sin tratamiento ( $p < 0,001$ ) (**Figura 19**). Dicha inhibición fue similar a la observada en los macrófagos J744A.1. Cuando la estimulación se realizó con ODN, la secreción de IL-6 aumentó significativamente en presencia de U20-1 con respecto al control ( $p < 0,0001$ ). La estimulación con Poli (I:C) no indujo la producción de IL-6 en las células THP1.



**Figura 19 Efecto de U20-1 sobre la producción de IL-6 en células THP1 activadas con diferentes estímulos.** Células THP1 fueron activadas con diferentes estímulos y tratadas con el compuesto U20-1 (50 μM) durante 8 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se cuantificó IL-6 en los sobrenadantes cosechados a través de un kit comercial de ELISA, según instrucciones del fabricante. Se representa la concentración de IL-6 (pg/ml) como el promedio de triplicados. CC (Control Celulas). \* Significativamente diferente con respecto a los estímulos y CC sin U20-1 ( $p < 0,0001$ ). \*\* Significativamente diferente con respecto al CC ( $p < 0,0001$ ).

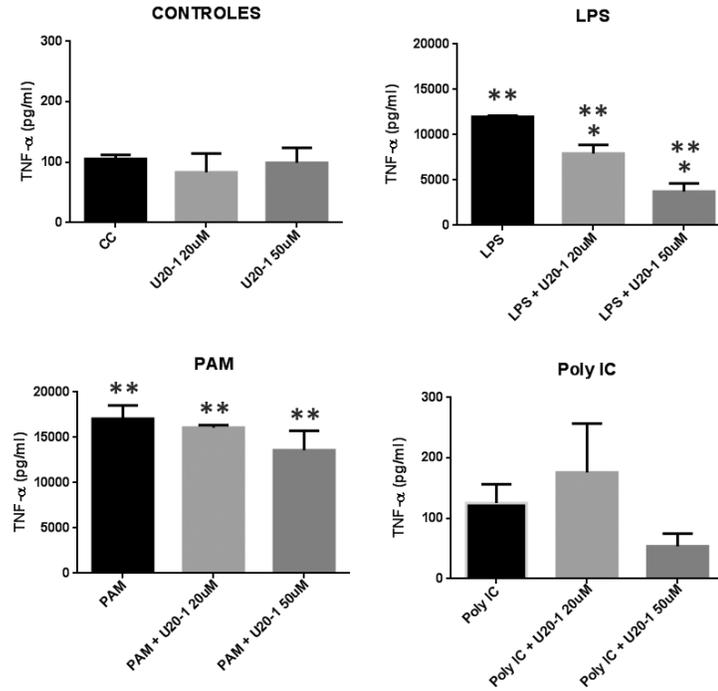
El compuesto U20-1 aumentó de forma significativa la secreción de IL-8 en los macrófagos THP1 sin estimulación con respecto al CC ( $p < 0,001$ ). Cuando los macrófagos fueron estimulados con LPS, PAM, ODN y Poly (I:C), la presencia de U20-1 aumentó significativamente la producción de IL-8 con relación a las células estimuladas sin tratamiento. En cambio, cuando el estímulo se realizó con IMQ, la adición del compuesto U20-1 inhibió la síntesis de IL-8 significativamente con relación al control celular estimulado ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 20**).



**Figura 20 Efecto de U20-1 sobre la producción de IL-8 en células THP1 activadas con diferentes estímulos.** Células THP1 fueron activadas con diferentes estímulos y tratadas con el compuesto U20-1 (50 μM) durante 8 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se cuantificó IL-8 en los sobrenadantes cosechados a través de un kit comercial de ELISA, según instrucciones del fabricante. Se representa la concentración de IL-8 (pg/ml) como el promedio de triplicados. CC (Control Celulas). \* Significativamente diferente con respecto a los estímulos y CC sin U20-1 ( $p < 0,0001$ ). \*\* Significativamente diferente con respecto al CC ( $p < 0,0001$ ).

La secreción basal de TNF-α en macrófagos THP1 no presentó variación significativa cuando fueron tratados con U20-1. Tampoco se observaron diferencias en la secreción de TNF-α cuando los macrófagos fueron estimulados con PAM y Poly (I:C) en presencia de U20-1. Por otro lado, cuando los macrófagos fueron estimulados con LPS la adición de U20-1 disminuyó la producción de TNF-α de forma significativa con relación a los macrófagos estimulados sin tratamiento ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 21**). La estimulación con ODN e IMQ no indujo la producción de TNF-α en las células THP1.

Concluimos que el compuesto U20-1 tiene la capacidad de modular la expresión de citoquinas proinflamatorias en macrófagos humanos y de ratón *per se* e inducida por diferentes estímulos (ligandos de TLRs).



**Figura 21 Efecto de U20-1 sobre la producción de TNF-α en células THP1 activadas con diferentes estímulos.** Células THP1 fueron activadas con diferentes estímulos y tratadas con el compuesto U20-1 (50 µM) durante 8 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se cuantificó TNF-α en los sobrenadantes cosechados a través de un kit comercial de ELISA, según instrucciones del fabricante. Se representa la concentración de TNF-α (pg/ml) como el promedio de triplicados. CC (Control Celulas). \* Significativamente diferente con respecto a los estímulos y CC sin U20-1 ( $p < 0,0001$ ). \*\* Significativamente diferente con respecto al CC ( $p < 0,0001$ ).

## DISCUSIÓN

---

Muchas de las enfermedades causadas por virus aún no cuentan con vacunas preventivas y/o antivirales como tratamiento eficaz (Cunningham *et al.*, 2016; Plotkin, 2014). En muchos casos, estas patologías son provocadas por el sistema inmune del hospedador en el proceso natural de eliminación del virus, lo cual causa daños severos en los tejidos infectados. Tal es el caso de la queratoconjuntivitis adenoviral (QCA) causada por AdV (González-López *et al.*, 2013) y la queratitis estromal herpética (QEH) producida por el HSV-1. En este último caso, si bien los antivirales existentes pueden frenar la diseminación viral, no impiden la inmunopatogénesis (Alejandre-Alba *Et al.*, 2008).

Por lo tanto, nuestras investigaciones en el laboratorio de Virología del Departamento de Química Biológica, conjuntamente con el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), se enfocan en el desarrollo y análisis de productos de origen natural y de síntesis química con potencial actividad antiviral y antiinflamatoria.

Tanto los compuestos naturales como los de síntesis han demostrado poseer actividad antiviral de amplio espectro frente a distintos virus ADN y ARN (Alché *et al.*, 2002; Wachsman *et al.*, 2000, 2002, 2004a y b) y algunos de ellos presentaron también actividad inmunomoduladora/antiinflamatoria tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Bueno *et al.*, 2009; Michelini *et al.*, 2004, 2008a, 2008b, 2013, 2016). Los azasteroides U20-3, -6, -12, -13, -14, -18 y U22-6, pertenecientes a la familia de esteroides de síntesis química, obtenidos por reacciones de múltiples componentes, presentaron actividad antiviral frente a HSV-1, VSV y AdV5 (Dávola *et al.*, 2012; Amado, 2013) y antiinflamatoria (Dávola, 2016). Por estas razones, el presente trabajo se enfocó en evaluar la actividad anti-adenoviral, anti-herpética e inmunomoduladora de nuevos azasteroides de síntesis química.

Nuestros resultados con la nueva familia de azasteroides muestran que todos los compuestos de la serie U20 analizados fueron efectivos para reducir la multiplicación de AdV5 y HSV-1 de forma dependiente de la concentración del compuesto (Figura 7). La mayoría de los compuestos exhibieron elevados IS frente a ambos virus (Tabla 1). Los compuestos de la serie U20 no resultaron citotóxicos, a diferencia de los compuestos de la serie U22, que fueron citotóxicos en todas las concentraciones (Figura 3).

Algunos brassinosteroides y azasteroides sintéticos han presentado actividad frente a las cepas TK<sup>-</sup>, resistentes al ACV, B2006 y Field, con valores de CE<sub>50</sub> entre 8,6 y 38,6  $\mu$ M (Wachsman *et al.*, 2000, Dávola *et al.*, 2012, 2016). Si bien el ACV resultó más activo que los compuestos analizados frente al HSV (Figura 7), es posible que

estos compuestos también sean activos frente a las cepas TK<sup>-</sup>, lo cual representaría una ventaja para el uso frente a cepas de HSV que no responden al tratamiento con ACV.

El efecto inhibitorio de los compuestos U20-1, U20-5 y U20-15 no se debió a la acción directa sobre la partícula viral, es decir, no presentaron actividad virucida, con lo cual estarían actuando en alguna etapa del ciclo de multiplicación viral (Figura 8). Al analizar el efecto de los compuestos sobre la entrada de Adv5 y HSV-1 en las células hospedadoras, se observó que no se vieron inhibidas la adsorción ni la internalización de las partículas virales (Figuras 9 y 10). Los compuestos U20-1 y U20-15 fueron efectivos para inhibir la multiplicación de Adv5 cuando se agregaron hasta las 16 h.p.i. mientras que U20-1 y U20-5 ejercieron inhibición frente al HSV-1 hasta las 7 y 12 h.p.i., respectivamente (Figura 11). Podríamos descartar un efecto inhibitorio de los azasteroides sobre la salida de los viriones del HSV-1, debido a que no se observaron partículas infectivas acumuladas en el medio intracelular, y se cuantificó el virus extracelular a las 24 h.p.i. (Figuras 7 B y C). Por lo tanto, estas nuevas moléculas estarían actuando más específicamente en las etapas del ciclo replicativo comprendidas entre la internalización y la salida de las partículas virales. En estas etapas es donde se realiza la síntesis de proteínas virales, la replicación del material genético y el ensamblado de los viriones. Una manera más precisa de ubicar en qué etapa o etapas del ciclo replicativo de los virus estarían actuando los compuestos, sería realizando ensayos de agregado y remoción de los compuestos a distintos tiempos p.i.. Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio muestran que brassinosteroides naturales y sintéticos, entre ellos, el compuesto sintético **6b** ((22S, 23S)-3 $\beta$ -bromo-5 $\alpha$ ,22,23-trihidroxistigmastan-6-ona) y otras moléculas esteroidales tales como la dehidroepiandrosterona (DHEA), son efectivos para reducir la multiplicación de diferentes virus. Dependiendo del virus, dichos compuestos afectan tanto etapas tempranas como tardías del ciclo de multiplicación. Por ejemplo, en el caso de HSV-1 y VSV, los compuestos (22R,23R,24S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,22,23-tetrahidroxi-5 $\alpha$ -estigmastano-6-ona (**1a**), **6b** y DHEA inhiben etapas tardías del ciclo viral. El compuesto **1a** reduce el rendimiento de HSV-1 hasta las 9 h.p.i. y el compuesto **6b** hasta las 8 hp.i.. En el caso de VSV, los compuestos **6b** y DHEA son efectivos hasta las 4 h.p.i., mientras que los arenavirus Tacaribe y Junín son susceptibles a la inhibición ejercida por el compuesto **6b** a lo largo de todo el ciclo de replicación. Dicha inhibición es dependiente del tiempo de agregado de los compuestos, siendo significativa a las 0 y 1 h.p.i. (etapa temprana), y manteniéndose hasta las 8 h.p.i. (etapas tardías) (Wachman *et al.*, 2000, 2004b; Castilla *et al.*, 2005; Romanutti *et al.*, 2007, 2009, 2010; Acosta *et al.*, 2008; Acosta *et al.*, 2008). Estudios realizados por Wachsmann y colaboradores muestran que el

compuesto **6b** provoca una reducción de la expresión de proteínas virales del HSV-1, lo cual impide la formación de partículas de virus maduro. Lo mismo se describió para células infectadas con AdV y tratadas con DHEA, y en el caso de células infectadas con el virus Junín y tratadas con DHEA y epiandrosterona (EA). Ambos compuestos provocan una inhibición parcial de la glicoproteína de superficie G1 de Junín (Wachsman *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2008; Romanutti *et al.*, 2010). Recientemente se describió que los azasteroides N-((tert-butilcarbamoil)metil)-N-(4-fluorofenil)-3 $\beta$ -hidroxiandrost-5-en-17 $\beta$ -carboxamida (**1f**) y N-((t-butilcarbamoil)metil)-N-(4-clorofenil)-3 $\beta$ -hidroxi-20-oxo-pregn-5en-16 $\alpha$ -carboxamida (**6c**) inhiben la multiplicación de AdV5, HSV-1 y VSV, afectando etapas tardías de los ciclos de multiplicación de dichos virus. En el caso del HSV-1, ambos compuestos inhiben su replicación cuando son agregados hasta las 7 h.p.i. y alteran la distribución intracelular de la glicoproteína gD y la proteína de tegumento VP22. Por otro lado, el compuesto **1f** altera la glicosilación de G de VSV (Dávola, 2016). Para estos azasteroides también está descrito que afectan el proceso post-traduccional de gD del HSV-1, generando acumulación de dicha proteína inmadura (Dávola, 2016). Tanto los análogos de brassinosteroides, como la DHEA y sus derivados, y los azasteroides ya reportados se comportan como antivirales de amplio espectro. Dentro de este contexto podemos incluir al compuesto U20-1.

El compuesto U20-1 redujo la expresión de la proteína inmediata-temprana E1A y la proteína tardía hexón en células infectadas con AdV (Figuras 12, 13 y 15 A). Dado que la proteína E1A se expresa independientemente de la síntesis de otras proteínas, y la síntesis de las proteínas tardías como hexón depende de que haya ocurrido la síntesis de ADN viral (Dallaire *et al.*, 2015), podemos concluir que el compuesto U20-1 ejerce su efecto inhibitorio tanto en etapas tempranas como en etapas tardías del ciclo de AdV. Además su efecto inhibitorio se sostiene a lo largo del tiempo, hasta 48 h.p.i., donde se observó de manera significativa la reducción de la expresión de las proteínas adenovirales. U20-1 no afectó la localización intracelular de las proteínas E1A y hexón. El compuesto U20-1 es el primero de los azasteroides para el cual se describe que inhibe la expresión de la proteína tardía hexón de AdV.

En células infectadas con el HSV-1, el compuesto U20-1 redujo la expresión de la glicoproteína gD y de las proteínas totales de HSV-1. Además, proporcionó un efecto protector contra la acción citopática del virus, observándose monocapas de células morfológicamente conservadas (Figuras 14, 15 B y C). El compuesto U20-1 estaría ejerciendo su acción inhibitoria en etapas tempranas y tardías del ciclo replicativo del HSV-1, sin afectar la localización intracelular de gD. Si bien los

ensayos de IFI revelaron la reducción de la expresión de la glicoproteína gD, esta diferencia entre células tratadas y células controles no se observó en los ensayos de WB.

AdV y HSV-1 son ambos virus con genoma ADN. Pero estructuralmente son diferentes entre sí: AdV es desnudo y de menor tamaño, HSV es envuelto y su envoltura le confiere un mayor diámetro. Las estrategias de replicación de ambos virus también son diferentes (Ghebremedhin, 2014; Bascones-Martínez & Pousa-Castro, 2011). A pesar de ello, los azasteroides analizados inhiben la replicación de ambos virus con igual efectividad, lo cual da cuenta de un amplio espectro de acción. Otro elemento que abona este planteo es el hecho de que el efecto inhibitorio de los compuestos se observa en etapas del ciclo de multiplicación viral que requieren de la maquinaria celular. Por lo tanto, podemos inferir que los compuestos también estarían afectando factores celulares indispensables para que el virus se multiplique. Estas características representan un beneficio adicional para estas moléculas, ya que podrían ser efectivas frente a virus con diferentes estrategias replicativas y, al actuar sobre factores celulares, no inducirían la aparición de mutantes resistentes, lo cual suele observarse frente a la presión de selección ejercida por drogas que actúan a nivel de las proteínas virales.

En cuanto a las propiedades inmunomoduladoras, el compuesto U20-1 presenta propiedades tanto inmunoestimulantes como inmunosupresoras. Tanto en las células A549 como en los macrófagos humanos, U20-1 estimula la secreción de IL-8 *per se* (Figuras 16 y 20). IL-8 es una quemoquina con potente poder quimioattractante de polimorfonucleares. El efecto proinflamatorio del compuesto U20-1 podría ser de utilidad para desencadenar la respuesta innata y eliminar el virus del sitio de infección. Por el contrario, U20-1 inhibe la secreción de IL-6 en macrófagos humanos y de ratón, y lo hace de manera independiente del ligando utilizado para la inducción (Figuras 17 y 19). Por otra parte, el compuesto no modifica la secreción de TNF- $\alpha$  en los macrófagos activados con los diferentes estímulos empleados (Figuras 18 y 21). Existen antecedentes de otros análogos esteroidales que actúan induciendo o inhibiendo las citoquinas proinflamatorias, dependiendo del tipo celular y las vías de activación estimuladas. Tal es el caso de los compuestos (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmastan-4-en-3-ona (**1**) y (22S,23S)-22,23-dihidroxiestigmastano-1,4-dien-3-ona (**2**), que *in vivo* mejoran los signos de la QEH murina, e *in vitro* inducen la liberación de citoquinas proinflamatorias en las células epiteliales de origen ocular infectadas con el HSV-1, y reducen la producción de las mismas en macrófagos activados por LPS (Michelini *et al.*, 2008a). Estos estigmastanos ejercen su actividad inmunomoduladora mediante la inhibición de las

vías de señalización de ERK y Akt sin unirse a los receptores de glucocorticoides (Michelini *et al.*, 2008a, 2013, 2016). Por otra parte, los azasteroides **1f** y **6c** modulan la secreción de citoquinas proinflamatorias dependiendo del tipo celular y del estímulo empleado. En células epiteliales aumentan la producción de IL-6 e IL-8 de forma intrínseca y exacerbaban su secreción inducida por el HSV-1, mientras que en macrófagos ambos compuestos *per se* disminuyen la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  contrarrestando el aumento de las mismas en presencia del HSV-1 y LPS (Dávola *et al.*, 2016).

Todos los nuevos azasteroides analizados en el presente trabajo resultaron activos como antivirales frente a virus pertenecientes a dos familias diferentes. En muchos casos, resultaron más activos que los azasteroides ya reportados utilizados como controles positivos de actividad antiviral (Tabla 1). Debido a que pertenecen a la misma familia de compuestos, conservan el mismo núcleo tetracíclico, pero presentan diferentes cadenas polifuncionalizadas en los distintos carbonos, y éstas podrían ser las responsables de las diferencias en la actividad antiviral observada. Los nuevos compuestos muestran propiedades inmunomoduladoras similares a los recientemente reportados (Dávola *et al.*, 2016).

Uno de los problemas que se presentan en ciertas patologías virales es el daño causado por el sistema inmune frente a la infección y las lesiones permanentes que en algunos casos produce. El hecho de haber encontrado compuestos de la familia de azasteroides sintéticos, en especial el compuesto U20-1, que presenten actividad antiviral de amplio espectro e inmunomoduladora *in vitro*, nos alienta a continuar con la investigación de dichos compuestos en modelos animales, como posibles candidatos para el tratamiento de inmunopatologías virales, y ahondar en el estudio de su mecanismo de acción antiviral e inmunomodulador.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

- Acosta EG, Bruttomesso AC, Bisceglia JA, Wachsmann MB, Galagovsky LR, Castilla V. Dehydroepiandrosterone, epiandrosterone and synthetic derivatives inhibit Junin virus replication in vitro. *Virus Research*. (2008) 135, 203-212.
- Alché LE, Barquero AA, Sanjuan NA, Coto CE. An Antiviral Principle Present in a Purified Fraction from Melia Azedarach L. Leaf Aqueous Extract Restrains Herpes Simplex Virus Type 1 Propagation. *Phytotherapy Research*. (2002) 16, 348–352.
- Alejandro-Alba N, Ariño-Gutiérrez M, Arriola-Villalobos P, García-Sandoval B, Jiménez-Alfaro M. *Comunicación solicitada* (2008). Recuperado el 09 de 09 de 2016, de Queratitis herpética:  
  
<http://www.oftalmo.com/studium/studium2008/stud08-2/08b-02.htm>
- Allen TC, Kurdowska A. Interleukin 8 and Acute Lung Injury. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. (2014) 138, 266–269.
- Alonso F, Acebedo SL, Bruttomesso AC, Ramírez JA. Synthesis of 4-azasteroids by an intramolecular Ugi reaction. *Steroids*. (2008) 73, 1270-1276.
- Alonso F, Cirigliano AM, Cabrera GM, Ramírez JA. Synthesis and preliminary biological screening of sterol analogues as new antifungal agents against plants pathogens. *Steroids*. (2010) 75, 659-664.
- Amado M. *Efecto de compuestos naturales y sintéticos sobre la expresión de genes adenovirales a través de ensayos de PCR en tiempo real*. Tesis presentada para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas (2013). Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- Arii J, Uema M, Morimoto T, Sagara H, Akashi H, Ono E, y otros. Entry of Herpes Simplex Virus 1 and Other Alphaherpesviruses via the Paired Immunoglobulin-Like Type 2 Receptor  $\alpha$ . *Journal of Virology*. (2009) 83, 4520–4527.
- Bascones-Martínez A, Pousa-Castro X. Herpesvirus. *Avances en Odontostomatología*. (2011) 27, 11-24.
- Bauer D, Schmitz A, van Rooijen N, Steuhl KP, Heiligenhaus A. Conjunctival macrophage-mediated influence of the local and systemic immune response

- after corneal herpes simplex virus-1 infection. *Immunology*. (2002) 107, 118-128.
- Baumeister J, Fischer R, Eckenberg P, Henninger K, Ruebsamen-Waigmann H, Kleymann G. Superior Efficacy of Helicase-Primase Inhibitor BAY 57-1293 for Herpes Infection and Latency in the Guinea Pig Model of Human Genital Herpes Disease. *Antiviral chemistry & chemotherapy*. (2007) 18, 35-48.
- Bernstein DI, Spruance SL, Arora SS, Schroeder JL, Meng TC. Evaluation of Imiquimod 5% Cream to Modify the Natural History of Herpes Labialis: A Pilot Study. *Clinical Infectious Diseases*. (2005) 41, 808-814.
- Blaising J, Polyak S, Pécheur E. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antiviral Research*. (2014) 107, 84-94.
- Boivin N, Sergerie Y, Rivest S, Boivin G. Effect of Pretreatment with Toll-like Receptor Agonists in a Mouse Model of Herpes Simplex Virus Type 1 Encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases*. (2008) 198, 664-672.
- Bordigoni P, Carret AS, Venard V, Witz F, Le Faou A. Treatment of Adenovirus Infections in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*. (2001) 32, 1290-1297.
- Brai A, Fazi R, Tintori C, Zamperini C, Bugli F, Sanguinetti M, y otros. Human DDX3 protein is a valuable target to develop broad spectrum antiviral agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2016) 113, 5388-5393.
- Burbiel J, Bracher F. Azasteroids as antifungals. *Steroids*. (2003) 68, 587-594.
- Carballal G., & Oubiña, J. R. (2015). *Virología Médica*. Corpus, Buenos Aires.
- Caroline A L, Powell DS, Bethel LM, Oury TD, Reed DS, Hartman AL. Broad Spectrum Antiviral Activity of Favipiravir (T-705): Protection from Highly Lethal Inhalational Rift Valley Fever. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. (2014) 8, e2790.
- Castilla V, Larzábala M, Sgalippa N, Wachman M, Coto C. Antiviral mode of action of a synthetic brassinosteroid against Junin virus replication. *Antiviral research*. (2005) 68, 88-95.
- Chou TY, Hong BY. Ganciclovir ophthalmic gel 0.15% for the treatment of acute herpetic keratitis: background, effectiveness, tolerability, safety, and future

- applications. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. (2014) 10, 665-681.
- Chowdhury S, Chouljenko VN, Naderi M, Kousoulas KG. The Amino Terminus of Herpes Simplex Virus 1 Glycoprotein K Is Required for Virion Entry via the Paired Immunoglobulin-Like Type-2 Receptor Alpha. *Journal of Virology*. (2013) 87, 3305–3313.
- Cohen JA, Sellers A, Sunil TS, Matthews PE, Okulicz JF. Herpes simplex virus seroprevalence and seroconversion among. *Clinical Virology*. (2016) 74, 4-7.
- Crute JJ, Grygon CA, Hargrave KD, Simoneau B, Faucher AM, Bolger G, y otros. Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease. *Nature Medicine*. (2002) 8, 386 - 391.
- Cunningham AL, Garçon N, Leo O, Friedland LR, Strugnell R, Laupèze B, y otros. Vaccine development: From concept to early clinical testing. *Vaccine*. (2016) 10, 016.
- Dallaire F, Schreiner S, Blair EG, Dobner T, Branton PE, Blanchette P. The Human Adenovirus Type 5 E4orf6/E1B55K E3 Ubiquitin Ligase Complex Enhances E1A Functional Activity. *Host-Microbe Biology*. (2015) 1, e00015.
- Darr S, Madisch I, Heim A. Antiviral Activity of Cidofovir and Ribavirin against the New Human Adenovirus Subtype 14a That Is Associated with Severe Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. (2008) 47, 731-732.
- Dávola ME. *Estudio de la actividad antiviral de amplio espectro y de las actividades inmunomoduladoras de compuestos esteroidales polifuncionalizados*. Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica (2016). Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- Dávola ME, Alonso F, Cabrera GM, Ramirez JA, Barquero AA. Sterol analogues with diamide side chains interfere with the intracellular localization of viral glycoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2012) 427, 107–112.
- Debing Y, Neyts J, Delang L. The future of antivirals: Broad-spectrum inhibitors. *Curr Opin Infect Dis*. (2015) 10, 596-602.

- Delang L, Paeshuyse J, Vliegen I, Leyssen P, Obeid S, Durantel D, y otros. Statins potentiate the in vitro anti-hepatitis C virus activity of selective hepatitis C virus inhibitors and delay or prevent resistance development. *Hepatology*. (2009) 50, 6-16.
- Duque Correa M A, Rojas López M. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*. (2007) 26, 73-86.
- Elbadawy HM, Galledrat M, Desseaux C, Ponzin D, Ferrari S. Targeting Herpetic Keratitis by Gene Therapy. *Journal of Ophthalmology*. (2012) 2012, 594869.
- Faroog AV, Shukla D. Herpes Simplex Epithelial and Stromal Keratitis: An Epidemiologic Update. *Survey of Ophthalmology*. (2012) 57, 448–462.
- Frausto SD, Lee E, Tang H. Cyclophilins as Modulators of Viral Replication. *Viruses*. (2013) 5, 1684-1701.
- Ganapathi L, Arnold A, Jones S, Patterson A, Graham D, Harper M, y otros. Use of cidofovir in pediatric patients with adenovirus infection. *F1000 Research* (2016) 5, 758-772.
- Ghebremedhin B. Human Adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *European Journal of Microbiology and Immunology*. (2014) 4, 26–33.
- González-López JJ, Morcillo-Laiz R, Muñoz-Negrete F J. Queratoconjuntivitis adenovíricas: actualización. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. (2013) 88, 108–115.
- Greco A, Arata L, Soler E, Gaume X, Couté Y, Hacot S, y otros. Nucleolin Interacts with US11 Protein of Herpes Simplex Virus 1 and Is Involved in Its Trafficking. *Journal of Virology*. (2012) 86, 1449 –1457.
- Grinde B. Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. *Journal of Oral Microbiology*. (2013) 5, 22766.
- Gros L, Lorenete SO, Jimenez C, Yardley V, Rattray L, Wharton H, y otros. Evaluation of azasterols as anti-parasitic. *Medicinal Chemistry*. (2006) 49, 6094–6103.
- Haveman LM, de Jager W, van Loon AM, Claas EC, Prakken BJ, Bierings M. Different cytokine signatures in children with localized and invasive adenovirus infection after stem cell transplantation. *Pediatr Transplantation*. (2010) 14, 520–528.

- Henaff D, Salinas S, Kremer EJ. An adenovirus traffic update: from receptor engagement to the nuclear pore. *Future Microbiol.* (2011) 6, 179-192.
- Hoeben RC, Uil TG. Adenovirus DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* (2013) 5, a013003.
- Hong JY, Lee HJ, Piedra PA, Choi EH, Park KH, Koh YY, y otros. Lower Respiratory Tract Infections due to Adenovirus in Hospitalized Korean Children: Epidemiology, Clinical Features, and Prognosis. *Clinical Infectious Diseases.* (2001) 32, 1423-1429.
- Kaul A, Stauffer S, Berger C, Pertel T, Schmitt J, Kallis S, y otros. Essential role of cyclophilin A for hepatitis C virus replication and virus production and possible link to polyprotein cleavage kinetics. *PLOS Pathogens.* (2009) 5, e1000546.
- Kaye S, Choudhary A. Herpes simplex keratitis. *Progress in Retinal and Eye Research.* (2006) 25, 355–380.
- Kim Y, Lovell S, Tiew KC, Rao Mandadapu S, Alliston KR, Battaile KP, y otros. Broad-Spectrum Antivirals against 3C or 3C-Like Proteases of Picornaviruses, Noroviruses, and Coronaviruses. *Journal of Virology.* (2012) 86, 11754-11762.
- Knipe D, Howley P. Editores. *Fields Virology.* (2013). Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia.
- Koehn F, Gunasekera M, Cross S. New antiviral sterol disulfate ortho esters from the marine sponge *Petrosia weinbergi*. *Journal of Organic Chemistry.* (1991) 56, 1322-1325.
- Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human Herpes Simplex Virus: Life Cycle and Development of Inhibitors. *Biochemistry (Moscow).* (2014) 54, 1635-1652.
- Lankester AC, Heemskerk B, Claas EC, Schilham MW, Beersma MF, Bredius RG, y otros. Effect of Ribavirin on the Plasma Viral DNA Load in Patients with Disseminating Adenovirus Infection. *Clinical Infectious Diseases.* (2004) 38, 1521-1525.
- Lion T. Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews.* (2015) 27, 441-462.

- Mangel WF, San Martín C. Structure, Function and Dynamics in Adenovirus Maturation. *Viruses*. (2014) 6, 4536-4570.
- Martínez-Gutierrez M, Castellanos JE, Gallego-Gómez JC. Statins Reduce Dengue Virus Production via Decreased Virion Assembly. *Intervirology*. (2011) 54, 202-216.
- Maza PK, Oliveira P, Toledo MS, Paula DM, Takahashi HK, Straus AH, y otros. Paracoccidioides brasiliensis induces secretion of IL-6 and IL-8 by lung epithelial cells. Modulation of host cytokine levels by fungal proteases. *Microbes and Infection*. (2012) 14, 1077-1085.
- Michelini FM, Ramirez JA, Berra A, Galagovsky LR, Alché LE. In vitro and in vivo antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analoges. *Steroids*. (2004) 69, 713-720.
- Michelini FM, Ramirez JA, Berra A, Galagovsky LR, Alché LE. Anti-herpetic and anti-inflammatory activities of two new synthetic 22,23-dihydroxylated stigmastane derivatives. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. (2008a) 111, 111-116.
- Michelini FM, Berra A, Alché LE. The in vitro immunomodulatory activity of a synthetic brassinosteroid analogue would account for the improvement of herpetic stromal keratitis in mice. *Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology*. (2008b) 108, 164-170.
- Michelini FM, Zorrilla P, Robello C, Alché L. Immunomodulatory activity of an anti-HSV-1 synthetic stigmastane analog. *Bioorganic & Medical Chemistry*. (2013) 21, 560-568.
- Michelini FM, Bueno CA, Molinari A, Galigniana M, Galagovsky L, Alché LE. y otros. Synthetic stigmastanes with dual antiherpetic and immunomodulating activities inhibit ERK and Akt signaling pathways without binding to glucocorticoid receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2016) 1860, 129-139.
- Monteiro de Almeida S, Crippa A, Cruz C, de Paola L, de Souza LP, Noronha L, y otros. Reactivation of herpes simplex virus-1 following epilepsy surgery. *Epilepsy & Behavior Case Reports*. (2015) 4, 76-78.

- Munawwar A, Singh S. Human Herpesviruses as Copathogens of HIV Infection, Their Role in HIV Transmission, and Disease Progression. *Laboratory Physicians*. (2016) 8, 5-18.
- Norkin L. *Virology, Molecular Biology and Pathogenesis* (2010). DC: ASM Press, Washington.
- Piret J, Boivin G. Resistance of Herpes Simplex Viruses to Nucleoside Analogues: Mechanisms, Prevalence, and Management. *Antimicrob Agents Chemother*. (2011) 55, 459–472.
- Plotkin S. History of vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* (2014) 111, 12283–12287.
- Rajcáni J, Andrea V, Ingeborg R. Peculiarities of herpes simplex virus (HSV) transcription: an overview. *Virus Genes*. (2004) 28, 293–310.
- Ramirez JA, Teme Centurión O, Gros E, Galagovsky LR. Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs. *Steroids*. (2000) 65, 329-337.
- Rocha-Pereira J, Nascimento M, Ma Q, Hilgenfeld R, Neyts J, Jochmans D. The Enterovirus Protease Inhibitor Rupintrivir Exerts Cross-Genotypic Norovirus Activity and Clears Cells from the Norovirus Replicon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2014) 58, 4675-4681.
- Romanutti C, Castilla V, Coto CE, Wachsman MB. Antiviral effect of a synthetic brassinosteroid on the replication of vesicular stomatitis virus in Vero cells. *International Journal of Antimicrobial Agents*. (2007) 29, 311-316.
- Romanutti C, Bruttomesso AC, Castilla V, Bisceglia JA, Galagovsky LR, Wachsman MB. In vitro antiviral activity of dehydroepiandrosterone and its synthetic derivatives against vesicular stomatitis virus. *Veterinary journal*. (2009) 182, 327-335.
- Romanutti C, Bruttomesso AC, Castilla V, Galagovsky LR, Wachsman MB. Anti-adenovirus activity of epiandrosterone and dehydroepiandrosterone derivatives. *Chemotherapy*. (2010) 56, 158-65.
- Romero PC, Vogel MG, Solanes F, Luchsinger VF. Queratoconjuntivitis por adenovirus generadas a partir de una consulta oftalmológica. *Revista chilena de infectología*. (2010) 27, 148-152.

- Rosignol J, La Frazia S, Chiappa L, Ciucci A, Santoro M. Thiazolidines, a new class of anti-influenza molecules targeting viral hemagglutinin at the post-translational level. *Journal of Biological Chemistry*. (2009) 284, 29798-29808.
- Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR. Adenovirus. *Curr Top Microbiol Immunol*. (2010) 343, 195–224.
- Sodeik B, Ebersold MW, Helenius A. Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *The Journal of Cell Biology*. (1997) 136, 1007–1021.
- Suazo PA, Ibañez FJ, Retamal-Díaz AR, Paz-Fiblas MV, Bueno SM, Kalergis AM, y otros. Evasion of Early Antiviral Responses by Herpes Simplex Viruses. *Mediators of Inflammation*. (2015) 2015, 593757.
- Sun H, Cross S, Galagovsky LR, Wachsman MB. Structure-activity relationship studies in a set of new brassinosteroid derivatives assayed against herpes simplex virus type 1 and 2 in cell cultures. *Medical Chemistry Reserchs*. (2002) 434-444.
- Symeonidis N, Jakubowski A, Pierre-Louis S, Jaffe D, Pamer E, Sepkowitz K, y otros. Invasive adenoviral infections in T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: High mortality in the era of cidofovir. *Transpl Infect Dis*. (2009) 9, 108-113.
- Tamanini A, Nicolis E, Bonizzato A, Bezzeri V, Melotti P, Assael BM, Cabrini G. Interaction of adenovirus type 5 fiber with the coxsackievirus and adenovirus receptor activates inflammatory response in human respiratory cells. *J Virol*. (2006) 80(22), 11241-11254.
- Taylor R, Kotian P, Warren T, Panchal R, Bavari S, Julander J, y otros. BCX4430 — A broad-spectrum antiviral adenosine nucleoside analog under development for the treatment of Ebola virus disease. *Journal of Infection and Public Health*. (2016) 9, 220-226.
- Tsagkatakis M, Trainor E, Kaye LC, Hopkins MJ, Kaye SB. Adenoviral keratoconjunctivitis associated with stromal oedema and keratic precipitates. *Clinical and Experimental Ophthalmology*. (2013) 41, 715-716.
- Usatine RP, Tinitigan R. Nongenital Herpes Simplex Virus. *American Family Physician*. (2010) 82, 1075-1082.

- Wachsman MB, Lopez E, Ramirez JA, Galagovsky LR, Coto CE. Antiviral effect of brassinosteroids against herpes virus and arenaviruses. *Antiviral Chemistry Chemother.* (2000) 11, 71-77.
- Wachsman MB, Ramirez JA, Galagovsky LR, Coto CE. Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures. *Antiviral Chemistry Chemother.* (2002) 13, 61-66.
- Wachsman MB, Ramirez JA, Talarico L, Galagovsky LR, Coto CE. Antiviral activity of natural and synthetic brassinosteroids. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents* (2004a) 3, 163-179.
- Wachsman MB, Castila V, Talarico L, Ramírez JA, Galagovsky LR, Coto CE. Antiherpetic mode of action of (22S,23S)-3beta-bromo-5alpha,22,23-trihydroxystigmastan-6-one in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents.* (2004b) 23, 524-526.
- Wolf MC, Freiberg AN, Zhang T, Akyol-Ataman Z, Grock A, Hong PW, y otros. A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (2010) 107, 3157-3162.
- Zasloff M, Adams P, Beckerman B, Campbell A, Han Z, Luijten E, y otros. Squalamine as a broad-spectrum systemic antiviral agent with therapeutic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* (2011) 108, 15978–15983.
- Zhou Y, Yang J, Deng H, Xu H, Zhang J, Jin W, y otros. Respiratory syncytial virus infection modulates interleukin-8 production in respiratory epithelial cells through a transcription factor-activator protein-1 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports.* (2014) 10, 1443-1447.