

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y
DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE EXTRACTOS DE
VEGETALES PROCEDENTES DEL PARAGUAY
CONTRA EL VIRUS DEL *HERPES SIMPLE* TIPO 1**

GUADALUPE LUJÁN CANTERO GONZÁLEZ

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de
Magíster en Ciencias Químico Biológicas mención Biotecnología.

San Lorenzo – Paraguay

Abril – 2021

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y
DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE EXTRACTOS
DE VEGETALES PROCEDENTES DEL PARAGUAY
CONTRA EL VIRUS DEL *HERPES SIMPLE* TIPO 1**

GUADALUPE LUJÁN CANTERO GONZÁLEZ

Tutor: Prof. Dr. PABLO HERNÁN SOTELO TORRES

Co-Tutor: Prof. Dr. NELSON LUIS ALVARENGA SOSA

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado Facultad de Ciencias Químicas,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de
Magíster en Ciencias Químico Biológicas mención Biotecnología.

San Lorenzo – Paraguay

Abril– 2021

Cantero González, Guadalupe Luján.

Evaluación de la actividad antiviral y del mecanismo de acción de extractos de vegetales procedentes del Paraguay contra el Virus Del Herpes Simple Tipo 1. / Guadalupe Luján Cantero González . - - San Lorenzo : La Autora, 2021.

80 p.: fig. ; 30 cm.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Químicas – UNA, como requisito para la obtención del Grado de Magister en Ciencias Químico Biológicas mención Biotecnología.

VHS-1, ANTIVIRAL. 2. EXTRACTOS VEGETALES.

I. Título.

CDD: 615.327

C229e

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y DEL
MECANISMO DE ACCIÓN DE EXTRACTOS DE
VEGETALES PROCEDENTES DEL PARAGUAY
CONTRA EL VIRUS DEL *HERPES SIMPLE* TIPO 1**

GUADALUPE LUJÁN CANTERO GONZÁLEZ

Aprobado en fecha 16 de abril del 2021

Tribunal Examinador:

Prof. Dr. Esteban Ferro	FCM/UNA
Prof. Dra. María Kennedy	FCQ/UNA
Dra. Cristina Romero	FCQ/UNA
Prof. Dr. Jonás Chnaiderman	Univ. de Chile

Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres
Tutor

Prof. Dr. Nelson Luis Alvarenga Sosa
Co-tutor

Prof. Lic. Laura Joy Ramírez
Directora de Postgrado

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y EL MECANISMO DE ACCIÓN DE EXTRACTOS DE VEGETALES PROCEDENTES DEL PARAGUAY CONTRA EL VIRUS DEL *HERPES SIMPLE* TIPO 1

Autor: Guadalupe Luján Cantero González
Tutor: Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres
Co-Tutor: Prof. Dr. Nelson Luis Alvarenga Sosa

RESUMEN

El virus del *Herpes simple* tipo 1 (VHS-1) infecta a humanos causando lesiones epiteliales leves en la mayoría de los infectados, sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos se podrían desarrollar casos graves como encefalitis herpética con compromiso de la vida. Se ha observado una mayor frecuencia de aislamiento de cepas resistentes al tratamiento antiviral. Debido a ello es necesario el desarrollo de nuevas fuentes de tratamiento, las especies vegetales constituyen fuentes interesantes para la búsqueda de nuevos fármacos. En este proyecto se evaluó la actividad antiviral de 28 extractos metanólicos de plantas del Paraguay mediante qPCR. Se determinó que 10 extractos presentaron actividad antiviral asociada a una baja citotoxicidad. Además, se analizaron algunas fracciones, donde se destacan por su actividad antiviral las fracciones hexánicas y cloróformicas de *Acanthospermum australe* y *A. hispidum*. Se observó un IS de 49,35 y 430,58 para las fracciones clorofórmicas de *A. australe* y *A. hispidum*, y de 12,38 y 521,41 para las fracciones hexánicas de *A. australe* y *A. hispidum*. La evaluación del mecanismo de acción permitió determinar que las fracciones hexánicas actúan a nivel celular en la etapa de pre y pos adsorción. Mientras que las fracciones clorofórmicas de ambas especies actúan en todas las etapas del ciclo viral. En cuanto a la composición química de las fracciones activas se determinó mediante LC-MS la presencia de 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3,6-dimetoxiflavona o axilarina, 5,7,4' trihidroxy-3,6-dimetoxiflavona o 3,6 dimetoxiapigenina, 5, 4' dihidroxi 3,6,7 trimetoxi flavona o penduletina, 3',4',5-trihidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona o crisosplenol D, (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metilo, y fitol. Estos compuestos podrían ser responsables de la actividad antiviral, sin embargo, no se descarta que pueda haber otros compuestos que contribuyan a la misma y que no han podido aún ser identificados. Además, demuestra que el método de qPCR constituye una herramienta efectiva para la identificación de productos vegetales con actividad antiviral.

Palabras claves: VHS-1, Antiviral, extractos vegetales, *Acanthospermum*, *Solanum*, *Baccharis*, *Annona*, *Lessingianthus*

EVALUATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF PLANT EXTRACTS FROM PARAGUAY AGAINST *HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1*

Author: Guadalupe Luján Cantero González
Advisor: Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres
Co-advisor: Prof. Dr. Nelson Luis Alvarenga Sosa

SUMMARY

The Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infects humans causing mild epithelial lesions in the majority of those infected, however, in immunocompromised patients, severe cases such as herpetic encephelitis with life compromise could develop. A higher frequency of isolation of strains resistant to antiviral treatment has been observed. Because of this, it is necessary to develop new sources of treatment, plant species are interesting sources for the search for new drugs. In this project, the antiviral activity of 28 methanolic extracts from Paraguayan plants was evaluated using qPCR. It was determined that 10 extracts presented antiviral activity associated with low cytotoxicity. In addition, some fractions were analyzed, where the hexane and chloroform fractions of *Acanthospermum australe* and *A. hispidum* stand out for their antiviral activity. An IS of 49.35 and 430.58 was observed for the chloroform fractions of *A. australe* and *A. hispidum*, and of 12.38 and 521.41 for the hexane fractions of *A. australe* and *A. hispidum*. The evaluation of the mechanism of action made it possible to determine that the hexane fractions act at the cellular level in the pre and post adsorption stage. While the chloroform fractions of both species act in all stages of the viral cycle. Regarding the chemical composition of the active fractions, the presence of 5,7,3', 4'-tetrahydroxy-3,6-dimethoxyflavone or axilarin, 5,7,4'-trihydroxy-3,6-dimethoxyflavone or 3,6 dimethoxyapigenin, 5, 4'-dihydroxy 3,6,7 trimethoxy flavone or penduletin, 3', 4', 5-trihydroxy-3,6,7-trimethoxyflavone or chrysosplenol D, (Z, Z) - Methyl 9,12-octadecadienoate, and phytol was determined by LC-MS. These compounds could be responsible for the antiviral activity; however, it is not ruled out that there may be other compounds that contribute to it and that they have not yet been identified. Furthermore, it shows that the qPCR method constitutes an effective tool for the identification of plant products with antiviral activity

Keywords: HSV-1, Antiviral, plant extract, *Acanthospermum*, *Solanum*, *Baccharis*, *Annona*, *Lessingianthus*

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Generalidades Virus del Herpes simple tipo 1	1
1.2. Ciclo viral.....	2
1.3. VHS-1 un problema de salud publica	5
1.4. Tratamiento antiviral.....	5
1.5. Las especies vegetales como fuente de nuevos tratamientos	8
1.6. Métodos para evaluar actividad antiviral	9
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. METODOLOGÍA.....	12
3.1. Virus y Células	12
3.2. Biblioteca de extractos.....	13
3.3. Fraccionamiento químico.....	13
3.4. Búsqueda de extractos y fracciones con actividad antiviral por qPCR	15
3.5. Evaluación de la citotoxicidad de extractos y fracciones	17
3.6. Determinación de la concentración efectiva 50 (EC ₅₀) y concentración citotóxica 50 (CC ₅₀)	18
3.7. Ensayo de tiempo de infección.....	18
3.8. Evaluación de los efectos de las fracciones en la etapa de unión.....	20
3.9. Análisis de las componentes de las fracciones por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS)	20
4. RESULTADOS	22

4.1. Tamizaje de extractos con actividad antiviral	22
4.2. Niveles de citotoxicidad e índice de selectividad.....	24
4.3. Efecto de los extractos sobre el ciclo viral.....	25
4.4. Búsqueda de actividad antiviral en los productos de fraccionamiento químico del género <i>Baccharis</i>	32
4.5. Mecanismo de acción de las fracciones activas	33
4.6. Búsqueda de actividad antiviral en los productos de fraccionamiento químico del género <i>Acanthospermum</i>	41
4.7. Determinación del IS para las fracciones del género <i>Acanthospermum</i>	42
4.8. Evaluación del modo de acción de las fracciones activas del género <i>Acanthospermum</i>	50
4.9. Evaluación de los componentes principales de las fracciones activas de <i>Acanthospermum</i>	54
5. DISCUSIÓN.....	63
6. CONCLUSIÓN	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades Virus del *Herpes simple tipo 1*

El virus del *Herpes simplex tipo 1* (VHS-1) es miembro de la familia Herpesviridae, perteneciente a la subfamilia Alphaherpesvirinae que infecta a humanos. Se caracteriza por presentar un ciclo reproductivo relativamente corto, rápida propagación en cultivo y capacidad de establecer infecciones latentes (Roizman et al., 1981). La partícula viral tiene un diámetro de 150 a 200 nm, y estructuralmente consta de 4 componentes principales: genoma, cápside, tegumento y envoltura. El genoma viral se compone de una molécula de ADN de doble hebra de 152 kpb, que puede ser dividida en dos regiones unidas covalentemente denominadas UL (larga) y US (corta). La cápside icosaédrica compuesta por pentones y hexones rodea al genoma, a su vez rodeando a la cápside se encuentra el tegumento, una capa proteica amorfa que alberga numerosas proteínas encargadas de la activación de la expresión génica y la evasión de la respuesta inmune del huésped, y finalmente la capa externa constituye una envoltura lipídica que en su superficie incluye por lo menos 10 glicoproteínas virales, necesarias para la infección (Hep et al., 1954; Pellett,- Roizman, 2007).

1.2. Ciclo viral

El ciclo viral puede ser dividido en dos etapas principales: ciclo lítico y latencia. El ciclo lítico se caracteriza por una alta producción de progenie viral asociada con una regulación positiva de la expresión génica. Por otro lado, a diferencia de una infección productiva en el estado de latencia solo se transcribe un pequeño número de genes asociados al establecimiento y sostenimiento del estado de latencia en las neuronas sensoriales. Estas etapas se encuentran conectadas a través del proceso de reactivación, que consiste en la capacidad de restaurar una infección lítica a partir de un estado de latencia (Roizman et al., 1981).

El inicio de una infección tiene como primer paso la llegada del virus hasta el núcleo celular, este paso es conocido como entrada. Se conocen dos vías principales que pueden ser fusión de membranas o endocitosis de la partícula viral dependiendo principalmente de la línea celular que infecta, así en células de riñón de mono verde (Vero), HEp-2 y neuronas primarias ingresa por fusión de membranas en la superficie celular, mientras que en las líneas de células de ovario de hámster chino (CHO) y HeLa la entrada es realizada por endocitosis de la partícula viral (Nicola, McEvoy & Straus, 2003).

La entrada viral presenta dos pasos principales: unión y penetración. La unión viral implica el reconocimiento de glicoproteínas virales con receptores celulares, la primera interacción del tipo no específica y no esencial ocurre entre la glicoproteína viral gB o gC con receptores del tipo heparan sulfato, la misma es facilitada a través del remodelamiento del citoesqueleto de actina con la formación de filopodios, y sirve para direccionar al virus a los cuerpos celulares (Zheng et al., 2014), facilitando así la unión de gD con por lo menos uno de sus receptores celulares, HVEM, nectina 1 y 3-O- sulfato de heparán (Geraghty, Krurnmenacher, Eisenberg & Spear, 1998; Montgomery, Warner & Spear, 1996; Shukla et al., 1999). Esta segunda interacción sí resulta ser necesaria y desencadenante de la entrada viral, permitiendo el reclutamiento del heterodímero gH/gL y la activación de la proteína fusogénica gB (Heldwein et al., 2006). Esto resulta en la liberación de la partícula viral sin

envoltura al citoplasma celular, el cual es transportado hasta el núcleo a través del sistema de microtúbulos (Ojala, Sodeik, Ebersold, Kutay & Helenius, 2000).

Una vez que la partícula viral alcanza el núcleo celular necesita pasos adicionales para la generación de progenie viral que incluyen: expresión de genes virales, replicación del genoma, ensamblaje del virión y salida (Atanasiu, Saw, Cohen & Eisenberg, 2010; Gianni, Amasio & Campadelli-fiume, 2009; Honess & Roizman, 1974; Morgan, Rose & Mednis, 1968). La expresión de genes virales ocurre de manera regulada observándose cinética de fases. Los genes inmediatos tempranos genes alfa (IE o genes α) son genes que se transcriben sin la necesidad de síntesis de proteínas virales, y son activados por proteínas presentes en el tegumento viral, estos genes activan la expresión de los genes tempranos o genes beta (β) y finalmente se expresan los genes tardíos o genes gamma (γ). La activación de la expresión de los genes α se encuentra mediada por la interacción de VP16 (una proteína del tegumento viral) y proteínas celulares. Los genes α codifican para 5 proteínas denominadas proteína de células infectadas (ICP) 0, 4, 22, 27 y 47 (Honess & Roizman, 1974). ICP0 constituye un factor transcripcional viral clave, a través de su dominio ubiquitin ligasa es capaz de inducir la degradación de proteínas celulares encargadas del silenciamiento viral resultando en la activación de la expresión de los genes β (Boutell, Sadis & Everett, 2002; Kalamvoki & Roizman, 2010). Los genes β constituyen proteínas implicadas en la replicación del genoma viral. Finalmente, la expresión de genes γ , que constituyen en su mayoría a proteínas estructurales (Pellett & Roizman, 2007; Bernard Roizman & Zhou, 2015).

En el núcleo celular la molécula de ADN viral se vuelve circular y sirve de molde para la síntesis de nuevas moléculas, para lo cual necesita de proteínas esenciales como proteína de unión al origen (OBP), la proteína de unión al ADN de una sola hebra (ICP8), la ADN polimerasa viral (ADNpol), y finalmente una helicasa/primasa (Weller & Coen, 2012). Generando concatémeros que deben ser escindidos para empaquetarse en el virión formado a partir de los productos de transcripción de genes γ (Pereira, Wolff, Fenwick & Roizman, 1977; Roizman, Aurelian, & Roane, 1963). El ensamblaje del virión ocurre primeramente en el núcleo, donde el ADN naciente

es integrado a las cápsides preformadas, la salida del núcleo ocurre por fusión con la membrana nuclear externa, una vez en el citoplasma la nucleocapside se asocia a las proteínas del tegumento y adquieren su envoltura en los compartimentos endosomales para finalmente liberar partículas virales (Crump, 2018). En la **Figura 1** se observa un esquema del ciclo viral.

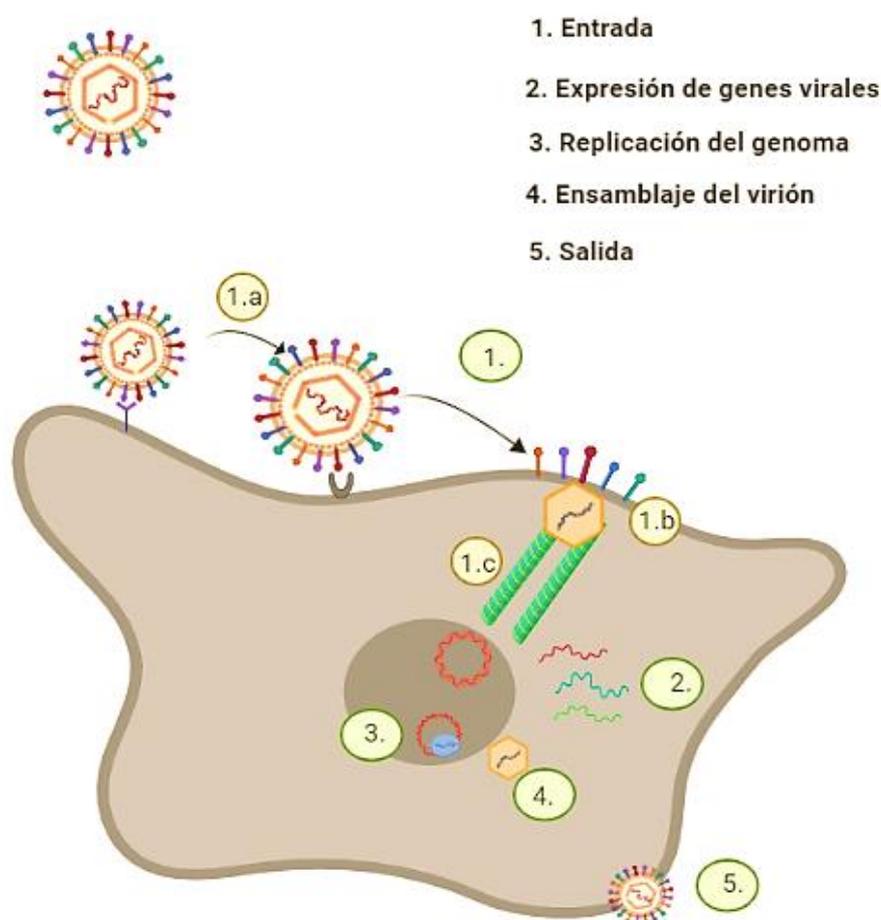


Figura 1. Ciclo lítico del Virus del *Herpes simplex I* La entrada viral en primera instancia necesita la interacción glicoproteína viral-receptor celular, este paso es conocido como adhesión (1.a) posteriormente se realiza la penetración, donde la cápside alcanza el citoplasma celular (1.b) y finalmente es transportado hasta el núcleo (1.c). Una vez en el núcleo la molécula de DNA se circulariza y se expresan genes virales de manera regulada (2.). La replicación del material genético es realizada por la ADNpol viral (3.) y ensambladas en el núcleo, finalmente el virus maduro provisto de membrana es liberado (5.)

VHS-1 un problema de salud pública

La infección por VHS-1 por lo general es asintomática, sin embargo, en algunas ocasiones se presenta con lesiones epiteliales dolorosas conocidas como pupas labiales, las cuales pueden ser recurrentes. Se estimó que alrededor del 67% de la población mundial se encuentra infectada por el VHS-1, que correspondería a 3.709 millones de personas menores a 50 años (Looker et al., 2015). Por lo general la infección viral no presenta mayores complicaciones, la gravedad de la infección depende en gran medida del estado inmunológico del huésped. Los casos graves con compromiso de la vida están asociados a pacientes inmunocomprometidos como: pacientes VIH positivo, recién nacidos y pacientes trasplantados. El hecho de que la mayoría de los seres humanos han sido infectados y albergan virus latentes que pueden reactivarse constituye un gran reservorio de VHS-1 para la transmisión a individuos susceptibles inmunocomprometidos en los cuales se desarrollan los casos más severos (Ziyaeyan et al., 2007).

Estudios epidemiológicos han informado una mayor frecuencia de reactivación en pacientes inmunocomprometidos, lo cual condiciona la instauración del tratamiento por periodos de tiempo más largo y con mayor frecuencia ejerciendo una presión positiva para la selección de virus resistentes. De hecho se ha informado el aislamiento de cepas de virus resistentes al tratamiento antiviral con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos con respecto a pacientes inmunocompetentes (Chakrabarti et al., 2000; Christophers et al., 1998; Englund et al., 1990; Langston et al., 2002).

1.3. Tratamiento antiviral

Para las lesiones epiteliales, está disponible una crema para uso tópico, aprobado por la FDA llamada abreva cuya molécula activa es un alcohol primario lipófilo (1-Docosanol) que se encuentra presente en muchas especies vegetales (Katz et al., 1994). El mecanismo principal de actividad antiviral es la inhibición de la penetración viral, este hecho hace que dicho fármaco también constituya una opción

terapéutica para infecciones con otros virus con envoltura (Katz, Marcelletti, Khalil, Pope & Katz, 1991).

El tratamiento antiviral de primera línea lo constituye el aciclovir, un análogo de nucleósidos del tipo guanosina cuyo mecanismo de acción (**Figura 2**) implica la activación mediante tres fosforilaciones. La primera fosforilación es realizada por la enzima timidina quinasa viral (TK), y las otras dos fosforilaciones se realizan mediante quinasas celulares. Esta forma activa es sustrato de la ADNpol que incorpora aciclovir a la cadena de ADN naciente, deteniendo la síntesis de ADN. El principal inconveniente para la aplicación de ACV como terapéutico antiviral radica en su pobre característica farmacocinética como: escasa biodisponibilidad oral, solubilidad limitada en agua y vida media corta en el torrente sanguíneo. Por estos motivos se desarrollaron variaciones de aciclovir tales como penciclovir, valaciclovir y famciclovir (Elion et al., 1977; Gnann, Barton & Whitley, 1983).

La resistencia antiviral constituye la problemática clave para el tratamiento antiviral, las mutaciones puntuales sobre los genes UL23 y UL30 que codifican para las enzimas TK y ADNpol viral provocan resistencia. Ante esta situación, está clara la necesidad del desarrollo de nuevos fármacos (Gaudreau, Hill, Boivin, Balfour, Erice, 1998; Fife, Clyde, Crumpacker, Gregory, Mertz, Hill,–Boone, 1994). Para casos graves, con aislamiento de cepas resistentes a análogos de nucleósidos, se ha desarrollado foscarnet, un análogo de pirofosfato y un inhibidor no nucleósido de la ADNpol viral que se une al sitio activo de la polimerasa y evita la unión del nucleótido entrante. Este fármaco no se encuentra disponible para administración por vía oral además de resultar nefrotóxico; y aunque el foscarnet inhibe a la ADNpol por un mecanismo diferente a los análogos de nucleósidos, muchos mutantes de ADNpol son resistentes a ambos tipos de compuestos (Coes & Richman, 2007; Eriksson & Oberg, 1982). Por lo tanto, hay pacientes con infecciones graves por VHS-1 para los cuales no hay opciones de tratamiento viables.

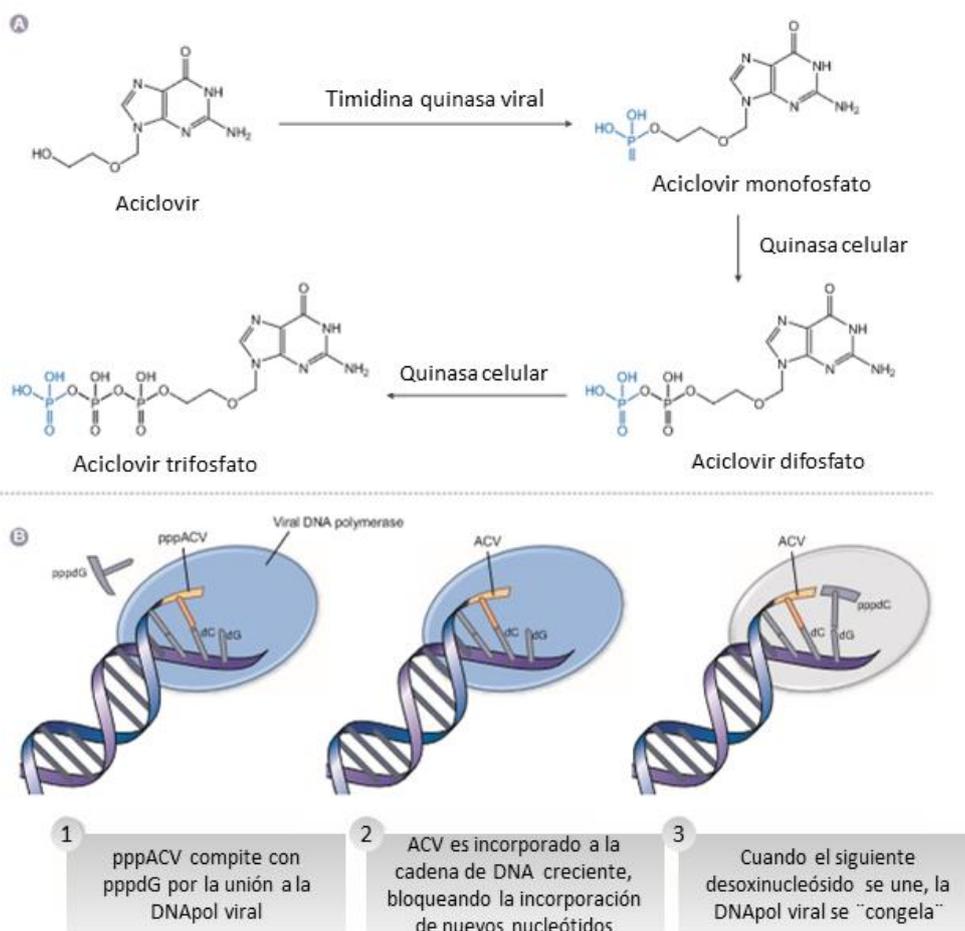


Figura 2. Mecanismo de acción de Aciclovir. **A:** El ACV es fosforilado selectivamente por la timidina quinasa del virus del Herpes simplex (HSV) para generar monofosfato de ACV. Las enzimas celulares huésped fosforilan secuencialmente el fármaco monofosfato a las formas difosfato y trifosfato (pppACV). **B:** El trifosfato de ACV tiene un mecanismo de inhibición de la ADNpol viral de tres etapas: (1) La forma trifosfato del fármaco actúa como un inhibidor competitivo de la unión de desoxiguanosina trifosfato (dGTP) (pppdG); (2) el trifosfato del fármaco actúa como un sustrato y se incorpora en la cadena de ADN en crecimiento por complementariedad de bases frente a desoxicitosina (dC) en el templado, ocurre la terminación del alargamiento de la cadena; y (3) la polimerasa queda atrapada en la cadena de ADN terminada en ACV cuando se une el desoxinucleótido trifosfato (dNTP). Extraído de Fields Virology 2007 sixth edition Cap.13

1.4. Las especies vegetales como fuente de nuevos tratamientos

Es necesaria la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiviral, que presenten idealmente, dos características principales, baja o nula toxicidad y una alta actividad antiviral. Como se mencionó anteriormente, en los casos de cepas de virus resistentes a aciclovir es necesario un fármaco que presente un mecanismo de inhibición diferente a la replicación del material genético viral actuando en otras etapas del ciclo viral (Ibáñez, Farías, Gonzalez-troncoso & Corrales, 2018). Las especies vegetales constituyen fuentes interesantes para la búsqueda de nuevos antivirales debido a la diversidad de estructuras presentes en las mismas, con potencial de presentar mecanismos de inhibición diferentes a los fármacos disponibles en el mercado. En este sentido los extractos provenientes de especies vegetales de diferentes familias han sido ampliamente estudiados para determinar actividad antiviral contra el VHS (Tareq, Khan, Ather, Thompson & Gambari, 2005). Una de las más reportadas constituye la familia Asteraceae, describiéndose diversos géneros con actividad antiviral contra los virus de la subfamilia Alphaherpesvirinae, como por ejemplo los géneros de *Acanthospermum* (Rocha Martins et al., 2011; Summerfield, Keil, Mettenleiter, Rziha & Saalmüller, 1997), *Arctium* 6, *Artemisia* (Cheng, Lin, Huang, Yang & Lin, 2008), *Baccharis* (Abad, Bermejo, Palomino, Chiriboga & Carrasco, 1999; Torres et al., 2011; Venturi et al., 2018; Zanon & Rovera, 1998), *Centaurea* (Karaoglu, Yesilada & Gurbuz, 2009; Koca & Ozcelik, 2009; Uzuncar, 2016), *Echinaceae* (Binns, Hudson, Merali & Arnason, 2002; Ghaemi et al., 2009; Scheneider, Reichling, Stintzing, Messerschmidt, Meyer, Schnitzler, 2010; Sharma, Anderson, Schoop & Hudson, 2009; Thompson, 1998; Vimalanathan et al., 2005; Wacker & Hilbig, 1978), *Laggera* (Shi, Huang, Zhang, Zhao & Du, 2007), *Tanacetum* (Álvarez, Habtemariam, Juan-Badaturuge, Jackson & Parra, 2011; Onozato et al., 2009) entre otras.

Entre los compuestos aislados a partir de especies vegetales que presentan mecanismos de acción diferentes al aciclovir se puede mencionar al galato de epigalocatequina (EGCG) un compuesto polifenólico que se encuentra presente en el té verde, que actúa inhibiendo la unión viral mediante la interacción con proteínas de

la membrana viral (Colpitts & Schang, 2014). Por otro lado, el compuesto denominado harmalina de estructura alcaloidal obtenido de *Ophiorrhiza nicobarica* actúa interfiriendo la unión del complejo IE que a su vez conduce a la supresión de la síntesis viral del gen IE; además harmalina ha demostrado inhibir la producción viral en modelos animales (Bag et al., 2014). Por lo tanto, está claro que las especies vegetales constituyen fuentes interesantes para la búsqueda de nuevos antivirales.

1.5. Métodos para evaluar actividad antiviral

La evaluación de la actividad antiviral *in vitro* en un nuevo candidato requiere de la cuantificación viral en dos condiciones de infección, células que fueron infectadas y tratadas con el candidato en estudio y células que fueron infectadas que no recibieron tratamiento, a fin de poder compararlos. El método estándar de titulación viral es el ensayo de reducción de placa de lisis que se fundamenta en la capacidad del virus de formar placa de lisis en un medio semisólido. Este método es procedimentalmente engorroso y necesita de profesional calificado para su desarrollo, además de la inversión de una gran cantidad de material, por lo cual su utilización como método para buscar nuevos antivirales a gran escala lo hace poco conveniente (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004).

Debido a esto se han desarrollado otras técnicas que sirvan como opción para la evaluación de la actividad antiviral, como por ejemplo la observación del efecto citopático (CPE), sin embargo, este método se fundamenta en la observación de efectos del virus sobre las células, lo cual lo convierte en un método dependiente del observador. A fin de poder realizarlo de una manera más cuantitativa, se han empleado colorantes supravitales que miden la sobrevivencia celular, lo cual es una medida indirecta del efecto tóxico del virus a la célula (McLaren, Ellis & Hunter, 1983; Schmidtke, Schnittler, Jahn, Dahse & Stelzner, 2001). También se han empleado técnicas con base inmunológica como ELISA, este método a su vez implica varios pasos haciéndolo igualmente laborioso (Leahy, Christiansen & Shellam, 1994).

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) permite no solo detectar material genético sino cuantificarlo, este método puede ser adaptado a la cuantificación viral a través del desarrollo de curvas de calibración. En este sentido en el Departamento de Biotecnología se ha estandarizado un método de cuantificación viral basado en la técnica de qPCR de tal manera a poder cuantificar virus de sobrenadantes de cultivo celular que permita determinar actividad antiviral de candidatos de una manera más sencilla (Gabaglio et al., 2019).

En el marco de esta tesis, se utilizó este método para determinar actividad antiviral de los extractos vegetales que conforman la biblioteca de extractos, obtenidos en el Departamento de Fitoquímica.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antiviral y el mecanismo de acción de extractos vegetales y sus fracciones contra el VHS-1.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar extractos metanólicos activos contra el VHS-1 a partir de una biblioteca de extractos de origen vegetal por el método de qPCR.
- Determinar la concentración citotóxica 50 (CC_{50}), la concentración efectiva 50 (EC_{50}) y el índice de selectividad (IS) contra VHS-1 de los extractos metanólicos y de las fracciones activas disponibles.
- Analizar en qué etapa del ciclo viral ejercen efecto los extractos metanólicos activos y sus fracciones.
- Identificar las fracciones con actividad antiviral y las familias de compuestos presentes en las mismas.

3. METODOLOGÍA

3.1. Virus y células

Las células epiteliales de riñón de mono verde (Vero) fueron proporcionadas por el Laboratorio Central de Salud Pública del Paraguay y son mantenidas en *Dublecco's modified eagle medium* (DMEM) suplementadas con suero bovino fetal (SBF) al 7,5%.

Se utilizaron cepas de VHS-1 (F) que fueron proporcionadas por la Dra María José Martínez de la Universidad de Chile, que se mantuvieron almacenados a -20°C en el Departamento de biotecnología de la FCQ-UNA (Ejercito, Kieff, & Roizman, 1968). Los stocks virales fueron producidos infectando células Vero susceptibles hasta la observación de efectos citopáticos. La titulación viral fue realizada por el método producción de placa de lisis. Brevemente, 2×10^5 células en placa de 6 pocillos se infectaron con 5 diluciones seriadas del virus (1×10^{-4} a 1×10^{-8}), permitiendo la adsorción viral por 1h a 37°C, posteriormente el inóculo viral se reemplazó con un medio semisólido de agarosa (DMEM 2% SBF y 0,6% de agarosa). El medio semisólido permite que el virus infecte a las células vecinas y evita la difusión viral formando así las placas de lisis. Posteriormente, las células fueron fijadas con formol 40% por 30 minutos y el medio semisólido removido. Luego las células fueron teñidas con una solución de 1% de cristal violeta y finalmente contadas.

3.2. Biblioteca de extractos

La identificación de las especies vegetales fue realizada por el Departamento de Botánica y los extractos metanólicos de las hojas fueron obtenidos en el Departamento de Fitoquímica de la FCQ-UNA. Brevemente, al polvo de las hojas secas se agregó metanol (de grado HPLC) y se sometió a 9 ciclos de sonicación de 30 minutos con reposo de 15 min, posteriormente se filtró para finalmente secar al rotavapor obteniendo un residuo sólido. Estos extractos metanólicos fueron mantenidos a 4°C en el Departamento de Biotecnología y fueron resuspendidos en dimetil sulfoxido (DMSO; Sigma-Aldrich). Posteriormente se procedió a preparar las diluciones de los extractos en medio de infección (DMEM 2%SBF) a la concentración requerida para el ensayo, como se detalla más adelante. En la **Tabla 1** se presenta el listado de extractos disponibles dentro de la biblioteca de extractos.

3.3. Fraccionamiento químico

Se seleccionaron los extractos activos para fraccionamiento químico considerando dos factores principales los resultados de EC₅₀, CC₅₀ e IS y la disponibilidad de estos. La obtención de las fracciones fue realizada en el Departamento de Fitoquímica, brevemente, el extracto metanólico se sometió a partición con solventes de polaridades crecientes, obteniendo las fracciones de hexano, cloroformo o diclorometano, acetato de etilo y butanol, y finalmente se evaporó a sequedad en el rotavapor a 40°C.

Tabla 1. Listado de las especies vegetales cuyos extractos metanólicos fueron analizados para determinar la actividad anti VHS-1

Especie	Familia	Nombre común	Uso medicinal
<i>Acacia caven</i> (Molina) Molina	Mimosaceae	aromita	no reportado uso medicinal
<i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze	Asteraceae	tapekué	antiinflamatorio. Para lavar heridas ulcerosas
<i>Acanthospermum hispidum</i> DC.	Asteraceae	tororati	antiinflamatorio
<i>Aloysia gratissima</i> (Gillies & Hook. ex Hook.) Tronc. var. <i>gratissima</i>	Verbenaceae	azafrán del campo	digestivo y antiespasmódico
<i>Aloysia virgata</i> (Ruiz & Pav.) Pers. var. <i>platyphylla</i> (Briq.) Moldenke	Verbenaceae	no reportado	digestivo y antiespasmódico
<i>Amphilophium paniculatum</i> (L.) Kunth	Bignoniaceae	ka'i cuchara	bronquitis
<i>Annona emarginata</i> (Schltdl.) H. Rainer	Annonaceae	aratiku'i	para tratar la amigdalitis.
<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.	Asteraceae	no reportado	
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	Asteraceae	chirca	antiséptico. Para tratar cólicos
<i>Baccharis notoserghila</i> Griseb.	Asteraceae	typycha guaikuru	para picaduras de insectos
<i>Baccharis punctulata</i> DC.	Asteraceae	no reportado	no reportado uso medicinal
<i>Baccharis trimera</i> (Less.)DC.	Asteraceae	jaguarete ka'a	digestivo. Emenagogo
<i>Calea uniflora</i> Less.	Asteraceae	no reportado	no reportado uso medicinal
<i>Centratherum punctatum</i> Cass.	Asteraceae	typycha botó, guayaki yvoty	para lavar granos
<i>Croton paraguayensis</i> Chodat	Euphorbiaceae	no reportado	no reportado uso medicinal
<i>Chromolaena ivifolia</i> (L.) R.M. King & H. Rob.	Asteraceae	typycha pito	no reportado uso medicinal
<i>Lessingianthus niederleinii</i> (Hieron.) H. Rob.	Asteraceae	no reportado	no reportado uso medicinal
<i>Lippia recollectae</i> Morong.	Verbenaceae	salvia moroti	no reportado uso medicinal
<i>Lippia origanoides</i> Kunth	Verbenaceae	no reportado	no reportado uso medicinal

Tabla 1. Listado de las especies vegetales cuyos extractos metanólicos fueron analizados para determinar la actividad anti VHS-1 (continuación)

Especie	Familia	Nombre común	Uso medicinal
<i>Phoradendron liga</i> (Gillies ex Hook. & Arn.) Eichler EK 149PE	Viseaceae	ka'avoty rey	no reportado uso medicinal
<i>Pluchea sagittalis</i> (Lam.) Cabrera	Asteraceae	no reportado	no reportado uso medicinal
<i>Pterocaulom angustifolium</i> DC	Asteraceae	toro ka'a	para trastornos gastrointestinales
<i>Solanum americanum</i> Mill	Solanaceae	arachichu	para tratar herpes zoster
<i>Solanum comptum</i> C. V. Morton	Solanaceae	no reportado	no reportado uso medicinal
<i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam.	Solanaceae	ñuati pyta	diurético e hipotensor
<i>Solidago chilensis</i> Meyen	Asteraceae	mbuy sayju, cola de zorro	antiinflamatorio
<i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.) Vahl	Verbenaceae	tatu ruguái	apendicitis
<i>Tessaria dodoneifolia</i> (Hook. & Arn.) Cabrera	Asteraceae	chilca dulce	en acné y salpullido

3.4. Determinación de la actividad antiviral por qPCR en extractos y fracciones

A fin de identificar extractos metanólicos con actividad antiviral por el método de qPCR, se cultivaron 1×10^4 células por pocillo en placa de 96 pocillos. Posteriormente se procedió a realizar la infección con el VHS-1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1,5. Para ello se agregó el inóculo viral en medio de infección y se procedió a la adsorción del virus incubando por 1 h a 37°C, seguidamente el inóculo viral fue reemplazado por una dilución del extracto en medio de infección (DMEM 2% SBF) a una concentración de 62,5 µg/ml. Como control de infección y normalizador se agregó medio de infección solo con DMSO. En el caso de las fracciones de los extractos que presentaron actividad antiviral la concentración de

prueba fue de 25 µg/ml. A las 72 h post infección se recogieron los sobrenadantes de todos los pocillos y el genoma viral fue cuantificado por qPCR utilizando al par de cebadores RL2_ICP0 Fw y RL2_ICP0 Rv previamente descrito (Cantero, Gabaglio & Sotelo, 2017). Posteriormente los resultados fueron analizados según una curva de calibración que nos permitió calcular el número de copias de genoma viral (VGC). Para poder determinar el porcentaje de inhibición o actividad antiviral de los extractos metanólicos se procedió a comparar la cantidad de el genoma viral en el sobrenadante de células infectadas tratadas con el extracto o fracción en estudio. Como control y normalizador se utilizaron células infectadas sin tratamiento. El ensayo se realizó por triplicado para cada condición

Para la obtención del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(1 - \frac{VGC \text{ infectados} + \text{tratados}}{VGC \text{ infectados sin tratamiento}} \right) \times 100$$

Donde:

VGC= Copias del gen viral

Aquellos extractos o fracciones cuyo porcentaje de inhibición fueron superior al 60% fueron considerados activos. Como control positivo de actividad antiviral se utilizó aciclovir a 0.5 µg/ml

Condiciones para la reacción de qPCR

La reacción de PCR en tiempo real se realizó en dos pasos utilizando el kit de BIO-RAD SSO Advanced Universal SYBR®Green supermix que contiene: dNTPs, MgCl₂, SYBR Green I dye, potenciadores, estabilizadores, 500 nM de los respectivos cebadores y 2,5µL de la muestra con un volumen final de reacción de 10 µL, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron en el termociclador en

tiempo real Lightcycler nano, (Roche), utilizaron los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 95° por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturalización por 15 segundos, unión de los cebadores y extensión a 60° por 30 segundos. Por último, se realizó una curva de desnaturalización de los productos, para el análisis de especificidad, iniciando a 60 °C por 20 s, para luego ir incrementando a 0,1 °C/s hasta 95 °C, para luego finalizar a 95 °C por 20 s.

3.5. Evaluación de la citotoxicidad de extractos y fracciones

Los extractos o fracciones además de ser efectivos contra VHS-1 deben ser inocuos para las células, por lo tanto, es necesario evaluar la toxicidad celular. Para ello, se sembraron 1×10^4 células en placa de 96 pocillos, posteriormente el medio de cultivo fue reemplazado por una dilución del extracto a 62,5 µg/ml o fracciones a 25 µg/ml en medio de infección. Como control y normalizador se utilizó células tratadas con medio de infección con DMSO. Posterior a 72 h de incubación en condiciones mencionadas anteriormente, se procedió al agregado de resazurina a una concentración de 0,15 mg/ml para obtener una concentración final de 0,0025% en cada pocillo, luego de 3 h de incubación se midieron las absorbancias en el equipo Multiskan™GO (ThermoScientific™) a 570 y 630 nm. El ensayo se realizó por triplicado para cada condición.

Para calcular el porcentaje de citotoxicidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \left(1 - \frac{E_{ox\lambda 2} \cdot A_{\lambda 1} - E_{ox\lambda 1} \cdot A_{\lambda 2 \text{ tratado}}}{E_{ox\lambda 2} \cdot A_{\lambda 1} - E_{ox\lambda 1} \cdot A_{\lambda 2 \text{ DMSO}}} \right) \times 100$$

Donde:

E_{ox} = coeficiente de oxidación, constante

$\lambda 1$ = longitud de onda a 570nm

$\lambda 2$ = longitud de onda a 630 nm

A = Absorbancia

Los extractos o fracciones con citotoxicidad menor al 20% fueron considerados para análisis posteriores.

3.6. Determinación de la concentración efectiva 50 (EC₅₀) y concentración citotóxica 50 (CC₅₀)

Para determinar el EC₅₀ y CC₅₀ se ensayaron diferentes concentraciones de extractos o fracciones de extractos y se midieron la respuesta de citotoxicidad y actividad antiviral como se mencionó anteriormente. Las curvas de dosis-respuesta fueron realizadas en el programa estadístico GhapsPad prism 5.01 y finalmente se calculó el IS, mediante la siguiente fórmula.

$$IS = \frac{CC50}{EC50}$$

3.7. Evaluación de la etapa a la cual ejercen acción los extractos y fracciones activos

El ensayo se dividió en tres grupos donde el extracto se agrega en momentos diferentes que se relacionan con el ciclo infeccioso (**Figura 3**). Todos los grupos fueron evaluados en células Vero a MOI 1,5. En el primer grupo (preadsorción), el extracto o fracción a 62,5 o 25 µg/ml respectivamente, se agregó a las células y se incubó por dos horas, posteriormente se retiró el medio y se agregó el inóculo viral, luego de una hora de adsorción viral, el inóculo fue removido y se agregó DMEM 2% SBF. En el segundo grupo de tratamiento (durante la adsorción) el extracto o fracción se agregó junto con el inóculo viral, posteriormente se incubó por 1h a 37°C, luego se retiró el inóculo y se agregó DMEM 2% SBF. Finalmente, para el tercer grupo (posadsorción) se agregó el inóculo viral, luego de una hora de adsorción viral, el inóculo fue removido y se agregó DMEM 2% SBF con el extracto o fracción. Para todos los tratamientos se incubaron por 72 h luego de lo cual se obtuvieron los sobrenadantes para su cuantificación como se explicó anteriormente. El ensayo se realizó por triplicado para cada condición.

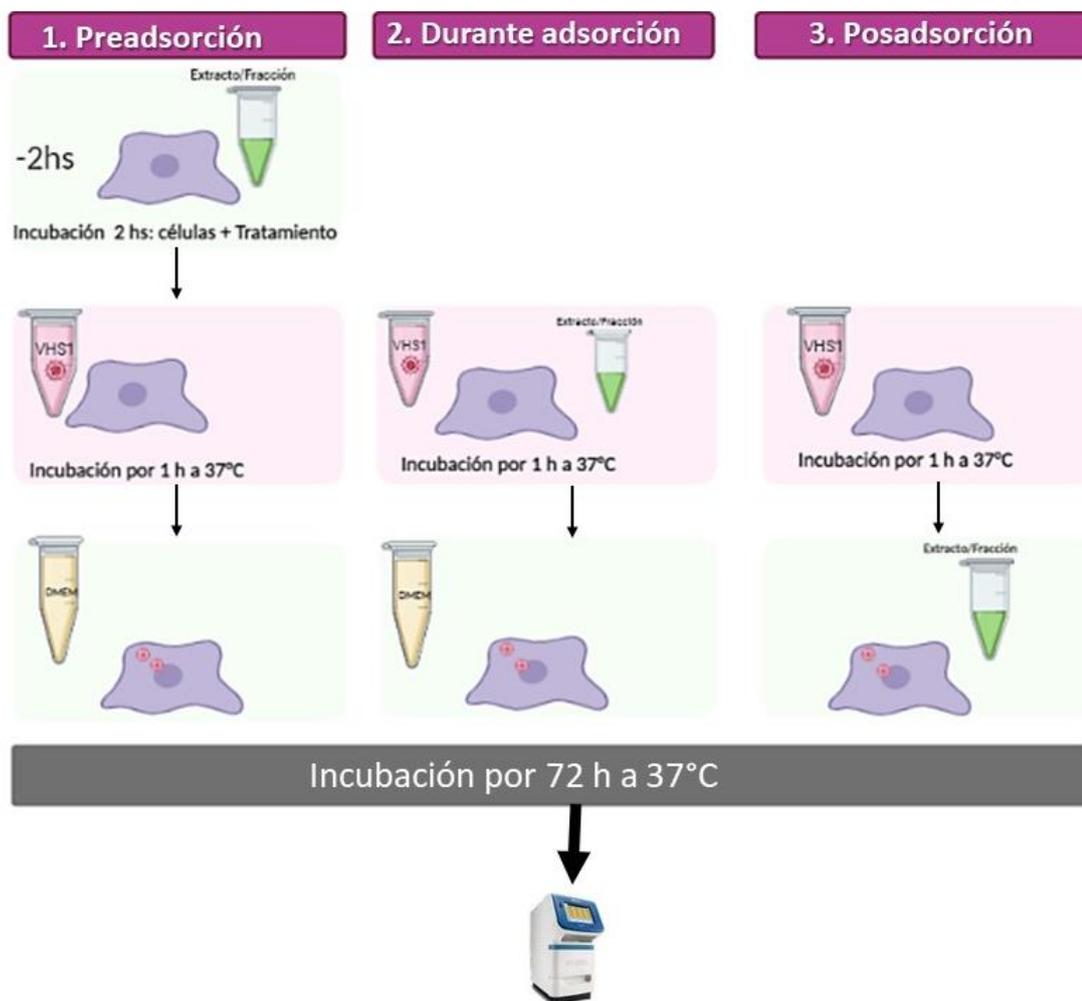


Figura 3. Esquema representativo del ensayo de tiempo de infección. Los extractos y fracciones fueron evaluados a 62,5 y a 25 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente a fin de conocer a que etapa del ciclo viral ejercen acción.

3.8. Evaluación del efecto de las fracciones activas en la etapa de unión del VHS-1 a las células

A fin de evaluar el efecto de las fracciones clorofórmicas del género *Acanthospermum* sobre la unión del virus, placas de 24 pocillo con 5×10^4 células Vero se incubaron con VHS-1 a MOI 10 por 1h a 4°C en presencia o ausencia de 50 µg/ml de las fracciones cloroformicas de *A. australe* y *A. hispidum* permitiendo la unión viral pero no la penetración. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS frío para eliminar las partículas virales que no se unieron y finalmente las partículas virales unidas fueron recuperadas con buffer citrato pH=3 (135 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 40 mM Na₃C₆H₅O₇) y neutralizadas con buffer Tris 3 M. Las partículas recuperadas fueron cuantificadas por qPCR como fue descrito anteriormente.

El porcentaje de unión se obtuvo comparando los VGC obtenidas en las muestras tratadas con las fracciones clorofórmicas con respecto al control de células infectadas a MOI 10 en presencia solo de DMSO. Como control de inhibición se utilizaron células infectadas en presencia de heparina a 50 µg/ml, el cual posee una estructura similar al heparan sulfato y posee la capacidad de unirse a las glicoproteínas virales inhibiendo la adsorción viral. El ensayo se realizó por quintuplicado para cada condición.

3.9. Análisis de las componentes de las fracciones por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

Las fracciones activas contra VHS-1 del género *Acanthospermum* fueron sometidas a análisis por LC-MS a fin de identificar a los componentes mayoritarios mediante determinación de la masa molecular. Para ello las muestras se disolvieron en acetonitrilo grado LCMS (Merck KGaA, Alemania) a una concentración de 10 mg / mL y se filtraron con un filtro de nailon para muestras de 0,22 µ de diámetro de poro (Microclar, Argentina). Posteriormente se inyectaron en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (Xevo-TQD, Waters Corporation, EE. UU.) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y en las siguientes

condiciones: columna Kinetex EVO C18 (100 x 2,1 mm x 1,7 μ m, Phenomenex, EE. UU.), Flujo de 0,3 mL / min, elución en gradiente usando una mezcla de agua (con ácido fórmico al 0,1%, formato de amonio 10 mM) y acetonitrilo (con ácido fórmico al 0,1%, formato de amonio 10 mM). Todos los reactivos fueron de grado LCMS (Merck KGaA, Alemania). Las condiciones de gradiente fueron: inicial 100% A, manteniendo estas condiciones durante 1 minuto, luego disminuyendo A a 0% a los 7,75 minutos y manteniendo esas condiciones hasta 10 minutos, luego aumentando A a 50% a los 15 minutos, aumentando nuevamente a 95% a 18 minutos y manteniendo estas condiciones hasta el final (20 minutos).

Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: ionización en modo negativo, se utilizó un voltaje de cono en rampa de 18,80 a 30 V, voltaje capilar -3,90 kV, temperatura de la fuente 150 °C, temperatura de desolvatación 500 °C y flujo de gas de desolvatación 1000 L / h. La masa molecular obtenida experimentalmente fue comparada con las masas moleculares de los compuestos descritos en la bibliografía del género *Acanthospermum*. Para ello primeramente se realizó una búsqueda bibliográfica en bases de datos como Pubmed y Google scholar utilizando como palabras claves *Acanthospermum*; *Chemical composition*; *Phytochemical composition*. En muchos casos los compuestos identificados para el género *Acanthospermum* fueron reportados, pero no así la masa molecular; por lo tanto, se realizó la búsqueda de la masa molecular de los compuestos descritos para el género en la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST).

4. RESULTADOS

4.1. Tamizaje de extractos con actividad antiviral

A fin de identificar los extractos activos contra VHS-1 en la biblioteca de extractos de especies vegetales detalladas en la **Tabla 1**. Se realizó el tamizaje de actividad antiviral por el método de qPCR. Para ello, las células de la línea celular Vero fueron puestas en contacto con VHS-1 y 1h después de la adsorción el inóculo viral fue reemplazado por los diferentes extractos a la concentración de 62,5 µg/ml y la actividad antiviral analizada como se describe en materiales y métodos.

La citotoxicidad del extracto fue evaluada utilizando la misma concentración que en el ensayo de actividad antiviral, a fin de descartar que la disminución en el número de copias de genoma se deba a efectos citotóxicos del extracto. Los resultados de citotoxicidad y actividad antiviral a concentración fija se presentan en la **Tabla 2**. Se puede observar que, de los 28 extractos metanólicos analizados, 10 presentaron actividad antiviral mayor al 60% y una citotoxicidad menor al 20% a la concentración de 62,5 µg/ml. Estos extractos activos corresponderían al 36% de la biblioteca de extractos, y fueron caracterizados como procedentes de las familias Annonaceae, Asteraceae y Solanaceae

Tabla 2. Resultados de la evaluación de la actividad antiviral y citotoxicidad de los extractos que componen la biblioteca de extractos

Extracto	Citotoxicidad a 62,5 µg/ml	Actividad antiviral a 62,5 µg/ml
<i>Acacia caven</i>	4,49	12,89
<i>A. australe</i>	2,59	71,78
<i>Acanthospermum hispidum</i>	5,24	80,05
<i>Aloysia gratissima</i>	0,24	5,50
<i>Aloysia virgata</i>	7,01	43,96
<i>Amphilophium paniculatum</i>	85,38	2,77
<i>Annona emarginata</i>	7,80	94,90
<i>Austroeupatorium inulifolium</i>	0,90	5,67
<i>Baccharis dracunculifolia.</i>	13,85	79,79
<i>Baccharis notoserghila</i>	4,24	82,39
<i>Baccharis punctulata</i>	38,61	14,94
<i>Baccharis trimera</i>	0,60	72,44
<i>Calea uniflora</i>	2,82	0,00
<i>Centratherum punctatum</i>	81,13	3,18
<i>Croton paraguayensis</i>	1,76	8,11
<i>Chromolaena ivifolia</i>	0,00	21,04
<i>Lessingianthus niederleinii</i>	3,89	69,24
<i>Lippia recolletae.</i>	15,23	11,62
<i>Lippia organoides</i>	17,09	18,07
<i>Phoradendron liga</i>	13,53	10,39
<i>Pluchea sagittalis</i>	26,96	15,95
<i>Pterocaulom angustifolium</i>	29,56	19,21
<i>Solanum americanum.</i>	6,30	76,73
<i>Solanum comptum</i>	0,00	80,05
<i>Solanum sisymbriifolium</i>	6,41	92,36
<i>Solidago chilensis</i>	15,00	8,08
<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	11,24	8,84
<i>Tessaria dodoneifolia</i>	19,87	0,00
Aciclovir (0,5 µg/ml)	0,00	99,83

Citotoxicidad y actividad antiviral expresados en %

4.2. Niveles de citotoxicidad y actividad antiviral e índice de selectividad.

Una vez identificados los extractos que presentan actividad antiviral se procedió a preparar diluciones seriadas de cada extracto y se midió la respuesta de citotoxicidad y actividad antiviral a fin de poder determinar la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) y la concentración efectiva 50 (EC₅₀), para posteriormente calcular el índice de selectividad (IS). El IS consiste en la relación entre la CC₅₀ y la EC₅₀ y es una medida del nivel de seguridad del extracto. En la **Tabla 3** se presentan los resultados de CC₅₀, EC₅₀ e IS obtenidos para los extractos metanólicos activos. Los valores de IS más altos se obtuvieron con los extractos representantes de la familia Solanaceae (IS>100) debido principalmente a su baja citotoxicidad. Además, es de resaltar que dentro de un mismo género los extractos activos presentan IS muy variables como los observados con el género *Acanthospermum*, la especie *Acanthospermum australe* arrojó el valor más bajo de IS (IS= 9,71), mientras que el extracto metanólico de la especie *A. hispidum* presentó un IS >100.

Tabla 3. Resultados de CC50, EC50 e IS de los extractos activos

Extracto	CC ₅₀ µg/ml	EC ₅₀ µg/ml	IS
<i>Acanthospermum australe</i>	178,60	18,40	9,71
<i>Acanthospermum hispidum.</i>	255,60	1,94	131,96
<i>Annona emarginata</i>	127,10	4,48	28,39
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	175,30	8,01	21,89
<i>Baccharis notoserghila</i>	175,40	7,62	23,01
<i>Baccharis trimera</i>	275,00	22,62	12,16
<i>Lessingianthus niederleinii</i>	352,30	8,66	40,68
<i>Solanum americanum</i>	475,00	3,26	145,71
<i>Solanum comptum</i>	1590,00	7,62	208,55
<i>Solanum sisymbriifolium</i>	2206,00	18,40	119,90

Donde: CC50= concentración citotóxica 50 expresada en µg/ml; EC50= concentración efectiva 50 expresada en µg/ml; IS= Índice de selectividad

4.3. Determinación del efecto de los extractos activos sobre el ciclo viral

Los extractos con actividad antiviral fueron evaluados en el ensayo de tiempo de infección a fin de establecer a que etapa del ciclo viral ejercen su acción. El ensayo de tiempo de infección se divide en evaluar el efecto sobre tres etapas: preadsorción, durante la adsorción y posadsorción. En el tratamiento preadsorción el extracto es adicionado 2 hs antes de la infección y evalúa la capacidad del candidato antiviral de inducir un estado antiviral a las células ya sea por bloqueo de receptores o activación de vías de defensa, entre otros. En el ensayo durante la adsorción, el extracto se encontraba presente solo durante la adsorción viral y permite evaluar la capacidad del candidato de interferir con la entrada viral. Finalmente, para evaluar eventos posteriores a la entrada viral el extracto es agregado posterior a la adsorción viral. En todos los casos los sobrenadantes se recogieron posterior a 72 hs de incubación y se cuantificaron por qPCR.

El extracto metanólico de *A. emarginata* demostró actividad antiviral actuando en todas las etapas del ciclo viral como se puede ver en la **Figura 4**, con porcentajes de inhibición mayores al 60%, esto puede deberse a que el extracto metanólico constituye una mezcla compleja de estructuras que pueden actuar en diferentes etapas realizando sinergia en el modo de acción antiviral.

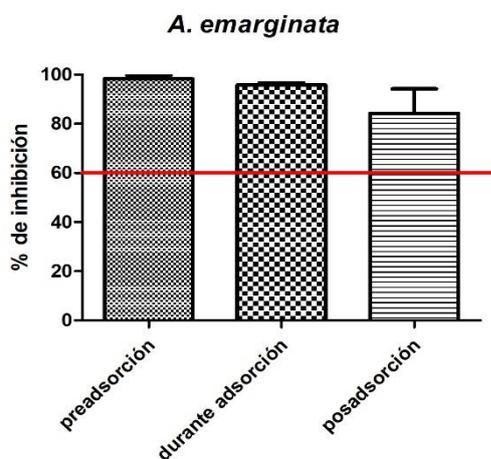


Figura 4. Determinación del efecto de *A. emarginata* sobre el ciclo viral el extracto fue ensayado a 62,5 $\mu\text{g/ml}$. Los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

Los extractos metanólicos, tanto de *A. australe* como *A. hispidum* demostraron actuar en todas las etapas del tratamiento, con porcentajes de inhibición mayores al 60% como se puede ver en la **Figura 5 A y B**.

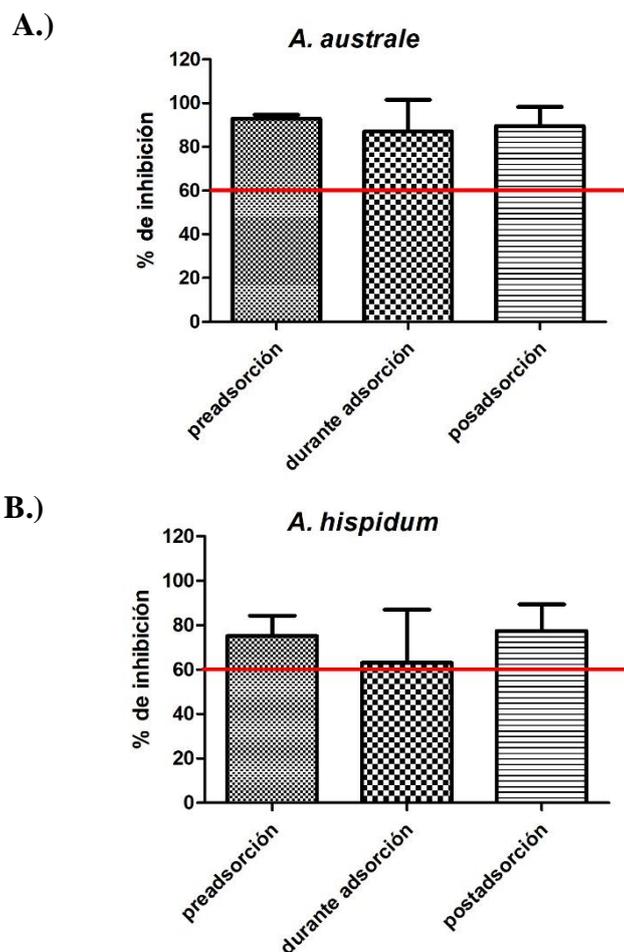


Figura 5. Determinación del efecto de *A. australe* en (A) y *A. hispidum* en (B) sobre el ciclo viral. Los extractos fueron ensayados a 62,5 $\mu\text{g/ml}$, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

Los extractos metanólicos de *B. dracunculifolia* y *B. trimera* presentaron actividad antiviral mayor al 60%, y afectaron todas las etapas del ciclo viral como se puede ver en la **Figura 6 A** y **C** al igual que los extractos ya mencionados. El extracto metanólico de *B. notoserghila* presentó actividad antiviral en la etapa de preadsorción y posadsorción como se puede ver en la **Figura 6B**.

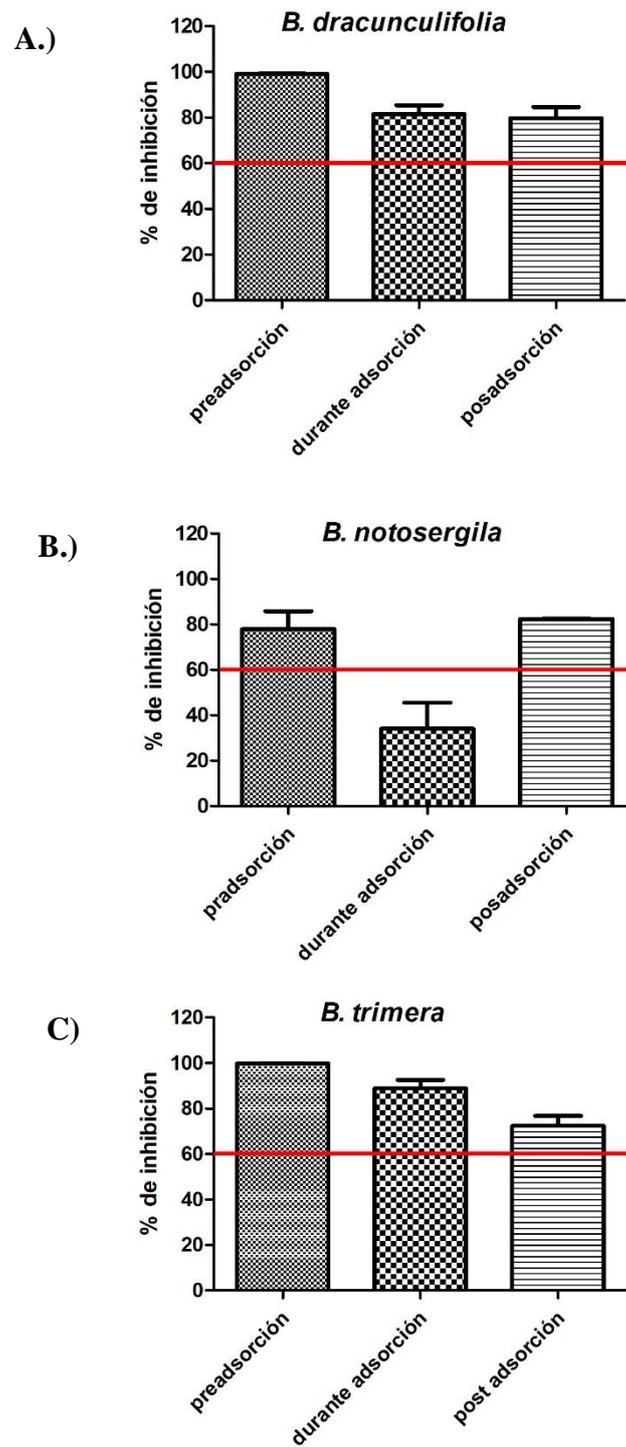


Figura 6. Determinación del efecto de *B. dracunculifolia* en (A), *B. notoserqila* en (B) y *B. trimera* en (C) sobre el ciclo viral. Los extractos fueron ensayados a 62,5 $\mu\text{g/ml}$, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

El extracto metanólico de *L. niederleinii* presentó actividad antiviral mayor al 60% en la etapa de preadsorción y posadsorción. Sin embargo, como se puede ver en la **Figura 7** el porcentaje de inhibición en el tratamiento durante la adsorción presenta valores cercanos al 60%.

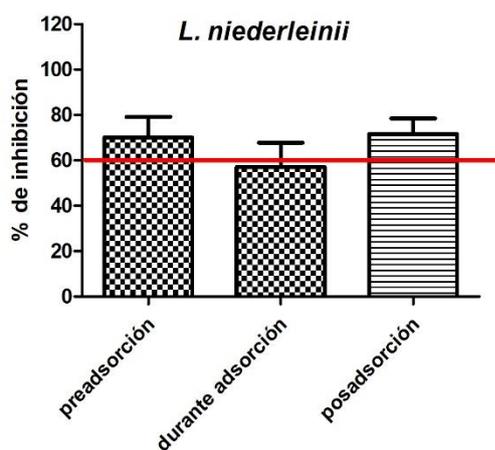


Figura 7. Determinación del efecto de de *L. niederleinli* sobre el ciclo viral. El extracto fue ensayado a 62,5 $\mu\text{g/ml}$, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

Los extractos metanólicos de *S. americanum*, *S. comptum* y *S. sismbriifolium* presentaron un comportamiento homogéneo en el ensayo de tiempo de infección como se puede ver en la **Figura 8** de tal manera que se observó actividad antiviral en la etapa de preadsorción y posadsorción.

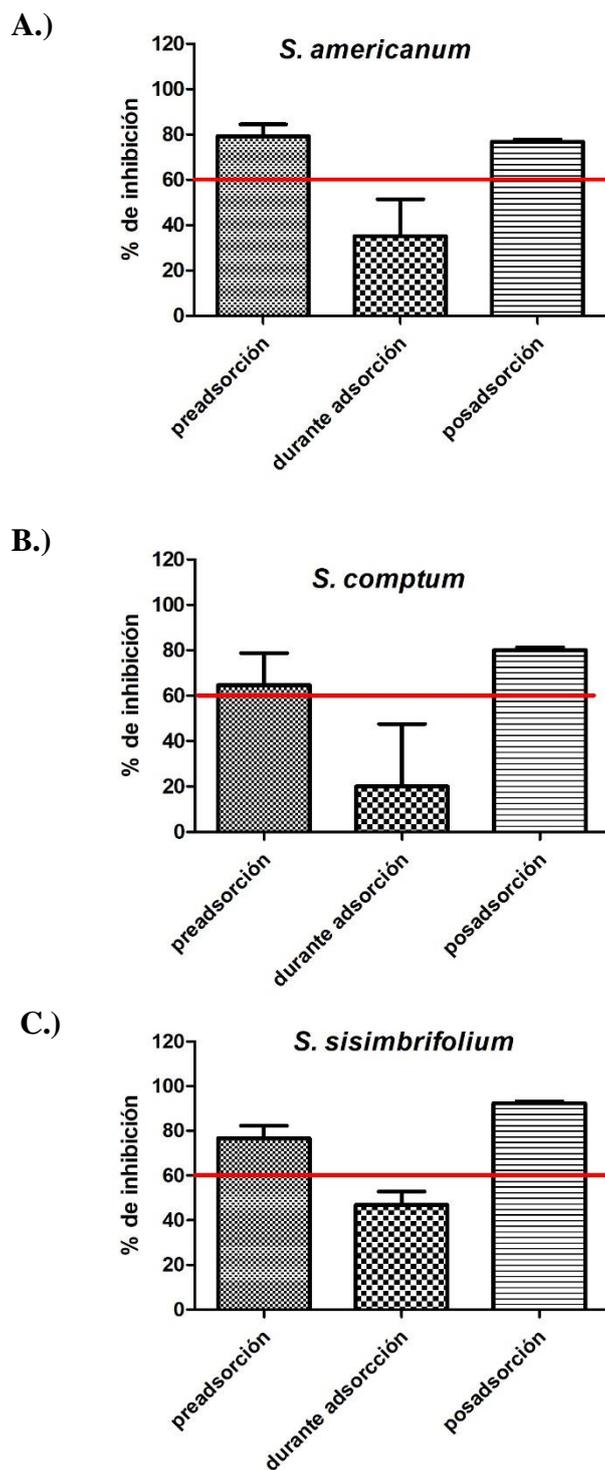


Figura 8. Determinación del efecto de *S. americanum* en (A), *S. comptum* en (B) y *S. sisimbrifolium* en (C) sobre el ciclo viral. Los extractos fueron ensayados a 62,5 $\mu\text{g/ml}$, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

En general los extractos metanólicos presentaron dos tipos de respuestas al ensayo de tiempo de infección. Por un lado, presentaron actividad antiviral mayor al 60% en todas las etapas del ciclo viral y por otro lado presentaron actividad antiviral en la etapa de preadsorción y posadsorción viral.

4.4. Búsqueda de actividad antiviral en los productos de fraccionamiento químico del género *Baccharis*

Un primer paso para el aislamiento del compuesto bioactivo procedente de especies vegetales constituye el fraccionamiento del extracto crudo. Si bien fueron activos 10 extractos metanólicos procedentes de diversas familias, solo fue posible el fraccionamiento químico de las especies *A. australe*, *A. hispidum*, *B. trimera*, *B. punctulata*, *B. dracunculifolia* y *B. notoserghila*. Por lo tanto, se procedió a realizar la evaluación de la actividad antiviral y citotoxicidad de las fracciones de dichas especies a 25 µg/ml, como se explicó anteriormente. En la **Tabla 4** se muestran los resultados de actividad antiviral y citotoxicidad para las fracciones del género *Baccharis* disponibles.

Las fracciones del género *Baccharis* presentaron resultado heterogéneo entre las diferentes especies. Entre las fracciones acuosas analizadas, sólo *B. punctulata* presentó una actividad antiviral superior al 60%. En el caso de las fracciones butanólicas, *B. notoserghila* y *B. trimera* fueron activas. Para las fracciones de acetato de etilo todas las fracciones excepto la de *B. notoserghila* presentaron actividad antiviral mayor al 60%. En cuanto a las fracciones de diclorometano, tres especies de las cuatro ensayadas presentaron actividad antiviral mayor al 60% (*B. dracunculifolia*, *B. notoserghila* y *B. punctulata*). Finalmente, de las fracciones hexánicas, solo la de *B. dracunculifolia* presentó una actividad antiviral superior al 60%. Para análisis posteriores se seleccionaron las fracciones con actividad antiviral mayor al 60% y citotoxicidad menor al 20%.

Tabla 4. Resultados de la actividad antiviral y citotoxicidad de las fracciones del género *Baccharis*

Extracto	Fracción	Citotoxicidad a 25 µg/ml	Actividad antiviral a 25 µg/ml
<i>B. dracunculifolia</i>	acuosa	0,00	51,49
	butanólica	0,00	54,73
	acetato de etilo	6,61	72,65
	diclorometano	0,00	85,10
	hexánica	0,00	84,51
<i>B. notoserghila</i>	acuosa	0,00	n.d.
	butanólica	5,60	61,11
	acetato de etilo	0,00	58,95
	Diclorometano	0,00	89,53
	hexánica	0,00	36,90
<i>B. trimera</i>	acuosa	0,00	50,82
	butanólica	0,00	69,58
	acetato de etilo	0,00	69,69
	Diclorometano	0,00	15,03
	hexánica	0,00	40,02
<i>B. punctulata</i>	acuosa	0,00	60,30
	butanólica	0,00	54,77
	acetato de etilo	1,46	67,44
	diclorometano	0,00	64,5
	hexánica	0,00	n.d.

n.d. no detectado

Una de las limitantes en el momento de realizar los análisis de IS constituye la necesidad imperante de realizar diluciones seriadas de las mismas para obtener el CC50 y EC50. Para las fracciones del género *Baccharis* no fue posible obtener cantidad del material suficiente para estos análisis.

4.5. Determinación del efecto de las fracciones activas sobre el ciclo viral

Dentro de las fracciones hexánicas, solo la de *B. dracunculifolia* presentó actividad antiviral mayor al 60%, dicha fracción fue evaluada en el ensayo de tiempo de infección. Como se puede ver en la **Figura 9**, la fracción hexánica de *B. dracunculifolia* actúa en todas las etapas del ciclo viral con porcentajes de inhibición mayor al 60%.

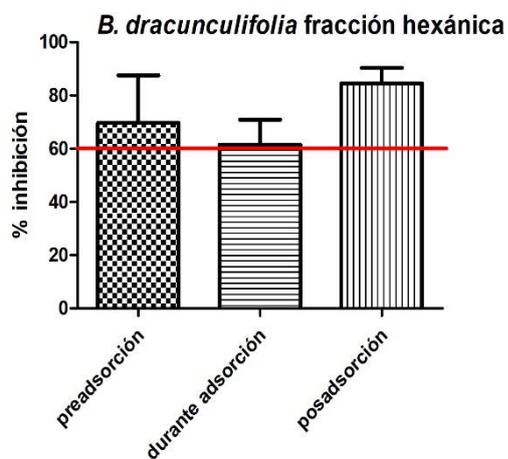
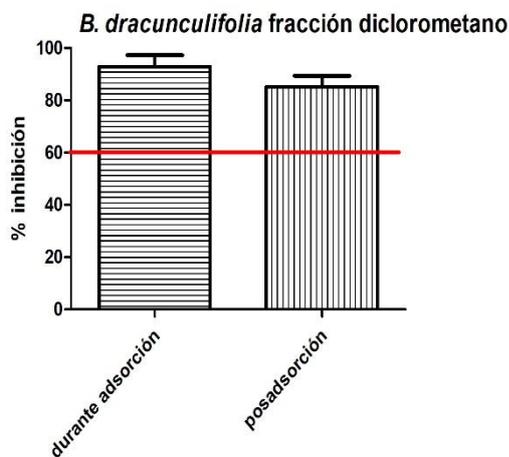


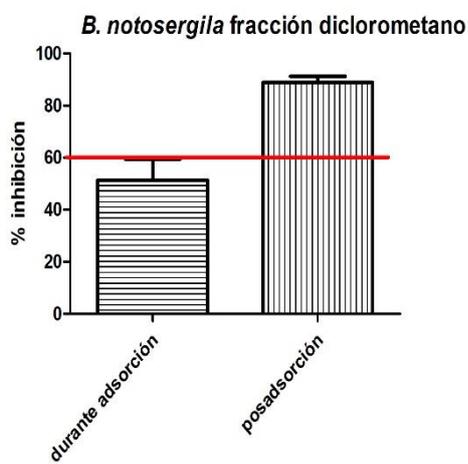
Figura 9. Determinación del efecto de la fracción hexánica de *B. dracunculifolia* sobre el ciclo viral. La fracción fue ensayada a 25 $\mu\text{g/ml}$, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

Se evaluaron las fracciones en diclorometano de *B. dracunculifolia*, *B. notoserghila* y *B. punctulata* a fin de conocer el modo de acción. Como se observa en la **Figura 10** solo se presentan los resultados de porcentaje de inhibición del tratamiento durante la adsorción y posadsorción, esto es debido a que en el tratamiento preadsorción se observó que indujo una muerte celular lo cual impidió la determinación del porcentaje de inhibición considerando que la muerte celular puede brindar una falsa inhibición asociada a la falta de replicación viral, las demás etapas del tratamiento en su mayoría demostraron fuerte inhibición. Como se puede observar en la **Figura 10 A**, la fracción diclorometano de *B. dracunculifolia* presentó una fuerte actividad antiviral en la etapa durante la adsorción y posadsorción, donde la inhibición de la entrada viral podría estar involucrada en el mecanismo de acción, además de eventos posteriores a la entrada. Así mismo la fracción diclorometano de *B. punctulata* que llamativamente presentó actividad antiviral, (a pesar de que el extracto metanólico no fue activo), demostró una fuerte actividad antiviral debido a una inhibición en la etapa de entrada viral como se puede ver en la **Figura 10 C**. A diferencia de *B. dracunculifolia* y *B. punctulata* la fracción de diclorometano de *B. notoserghila* presentó una actividad antiviral en etapas posteriores a la entrada viral como se puede ver en la **Figura 10 B**.

A.)



B.)



C.)

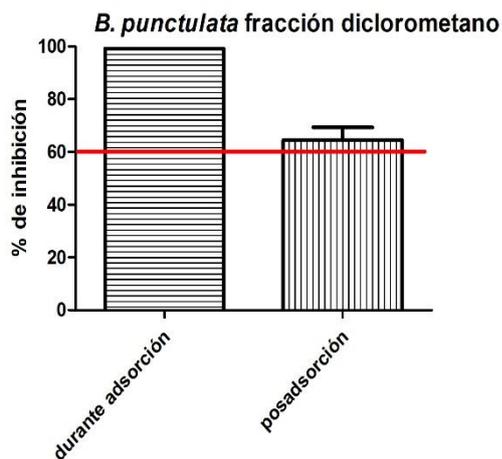


Figura 10. Determinación del efecto de las fracciones en diclorometano de *B. dracunculifolia* en (A), *B. notosergha* en (B) y *B. punctulata* en (C) sobre el ciclo viral. Las fracciones fueron ensayadas a 25 µg/ml, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

Al analizar las fracciones en acetato de etilo de *B. dracunculifolia*, *B. trimera* y *B. punctulata* (**Figura 11**) se puede observar que las mismas actúan principalmente en la etapa de preadsorción y posadsorción siendo más notoria para la fracción de acetato de etilo de *B. trimera* como se puede ver en la **Figura 11 B**.

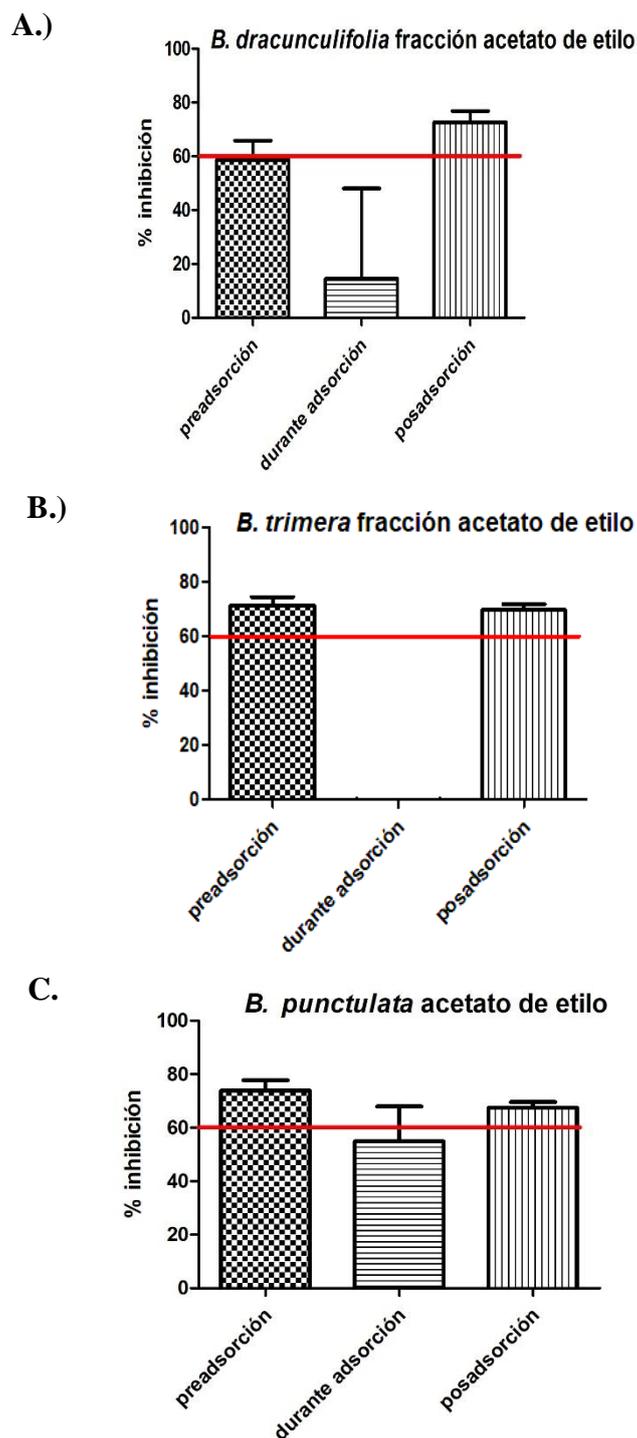


Figura 11. Determinación del efecto de las fracciones en acetato de etilo de *B. dracunculifolia* en (A), *B. trimera* en (B) y *B. punctulata* en (C) sobre el ciclo viral. Las fracciones fueron ensayadas a 25 $\mu\text{g/ml}$, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

Las fracciones en butanol de *B. notoserghila* y *B. trimera* fueron evaluadas en el ensayo de tiempo de infección. Como se puede ver en la **Figura 12 A** la fracción butanólica de *B. notoserghila* presentó actividad antiviral en todas las etapas del ciclo viral, mientras que la fracción butanólica de *B. trimera*, brindó actividad antiviral en la etapa de preadsorción y posadsorción como se puede ver en la **Figura 12 B**.

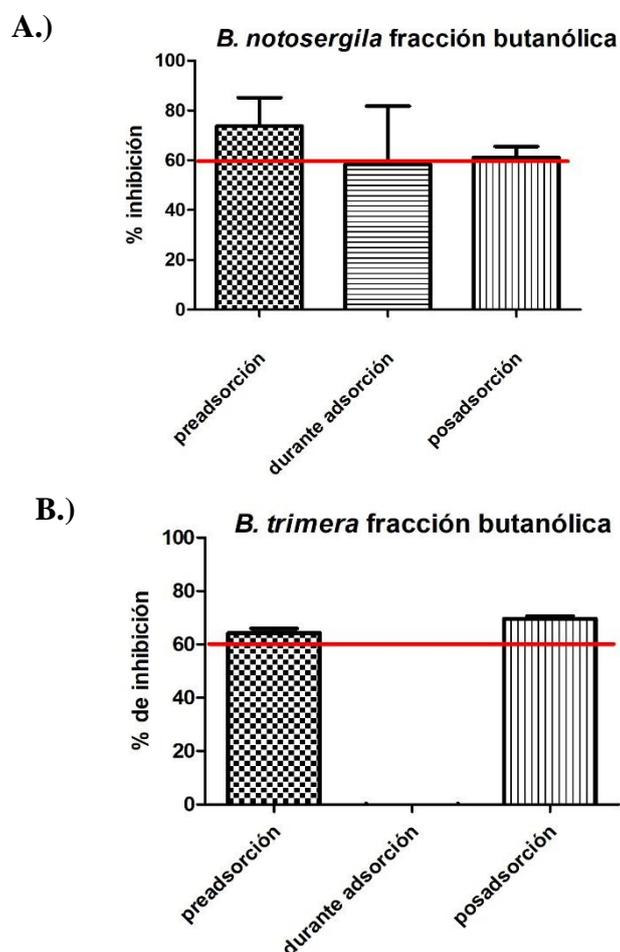


Figura 12. Determinación del efecto de las fracciones en butanol de *B. notoserčila* en (A) y *B. trimera* en (B) sobre el ciclo viral. Las fracciones fueron ensayadas a 25 $\mu\text{g/ml}$, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

En el caso de la fracción acuosa solo la correspondiente a la especie de *B. punctulata* presentó actividad antiviral mayor al 60%. Si bien, esta actividad antiviral fue apenas superior al 60% fue evaluada en el ensayo de tiempo de infección. Como se puede ver en la **Figura 13** la actividad antiviral leve solo se observó en la etapa de posadsorción.

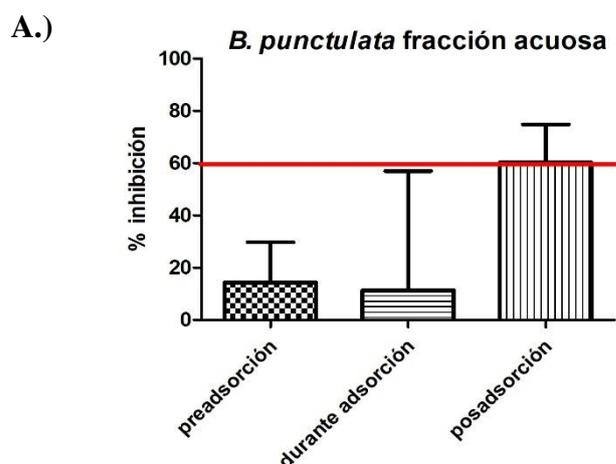


Figura 13. Evaluación del mecanismo de acción de la fracción acuosa de *B. punctulata*. La fracción acuosa de *B. punctulata* fue evaluada en el ensayo de tiempo de infección a 25 $\mu\text{g/ml}$, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

4.6. Determinación de actividad antiviral en las fracciones de extractos del género *Acanthospermum*

El producto del fraccionamiento químico del género *Acanthospermum* rindió cuatro fracciones: butanólica, clorofórmica, hexánica y acetato de etilo, las cuales fueron evaluadas a 25 $\mu\text{g/ml}$ a fin de determinar actividad antiviral y citotoxicidad. Como se puede observar en la **Tabla 5** las fracciones de *Acanthospermum* analizadas presentaron una baja o nula citotoxicidad con valores por debajo del 20%. En cuanto a la actividad antiviral las fracciones de cloroformo y hexano tanto de *A. australe* y *A. hispidum* presentaron porcentajes de inhibición mayor al 60%. Estas fracciones fueron seleccionadas para un análisis más exhaustivo.

Tabla 5. Determinación de la actividad antiviral y citotoxicidad de las fracciones del género *Acanthospermum*

Especie	Fracción	Citotoxicidad a 25 $\mu\text{g/ml}$	Actividad antiviral a 25 $\mu\text{g/ml}$
<i>Acanthospermum australe</i>	butanólica	0,00	53,47
	clorofórmica	11,62	84,30
	hexánica	0,00	84,27
	acetato de etilo	0,00	11,87
<i>Acanthospermum hispidum</i>	butanólica	0,00	63,29
	clorofórmica	6,79	90,23
	hexánica	0,00	84,89
	acetato de etilo	0,00	37,92

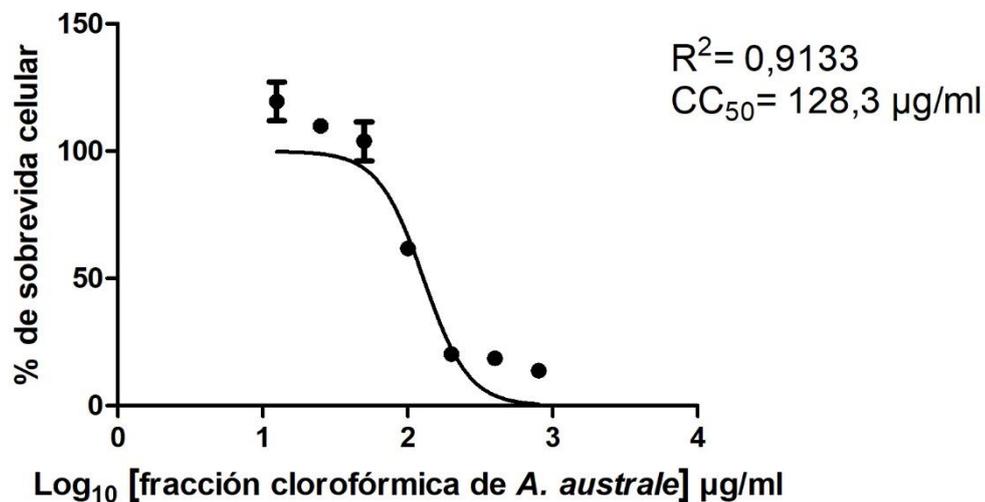
Citotoxicidad y actividad antiviral expresados en porcentaje (%)

4.7. Determinación del IS para las fracciones del género *Acanthospermum*

Una vez identificadas las fracciones de *Acanthospermum* que poseen actividad antiviral, se procedió a realizar diluciones seriadas de las mismas y se midió las respuestas de citotoxicidad y actividad antiviral, de la misma manera a la realizada con los extractos metanólicos, a fin de poder determinar CC_{50} , EC_{50} e IS.

Considerando primeramente el análisis de la fracción clorofórmica de *A. australe*, se puede observar en la **Figura 14 A** el gráfico dosis-respuesta para la determinación del valor de CC_{50} el cual arrojó un valor de 128,3 $\mu\text{g/ml}$ con un $R^2= 0,9133$. En cuanto a la determinación de la EC_{50} de la fracción clorofórmica de *A. australe* se realizó el gráfico de dosis-respuesta representado en la **Figura 14 B** donde se observa una relación lineal, obteniendo un valor de $EC_{50}= 2,6 \mu\text{g/ml}$ con un $r^2= 0,9520$. A partir de los datos de CC_{50} y EC_{50} fue posible determinar la relación entre ellos representado por el IS con un valor de 49,35 como se puede observar en la **Tabla 6**.

A.



B.

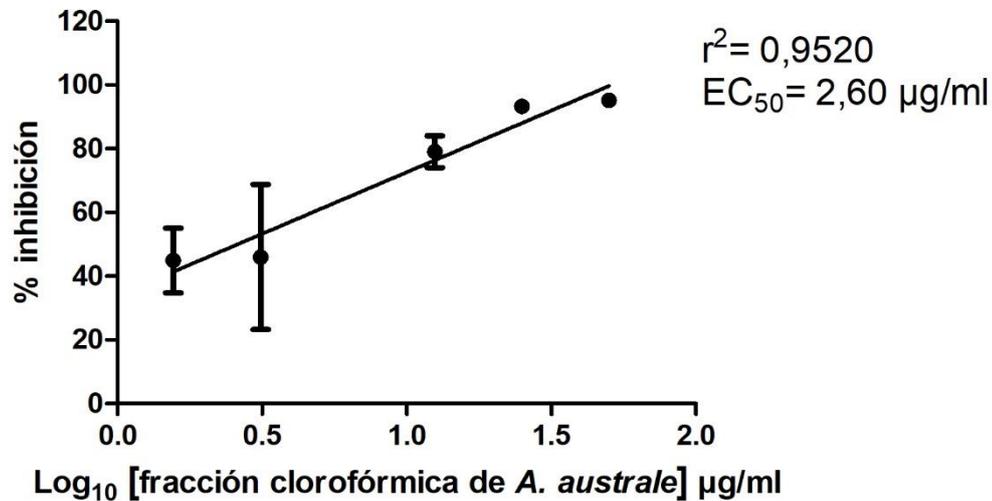
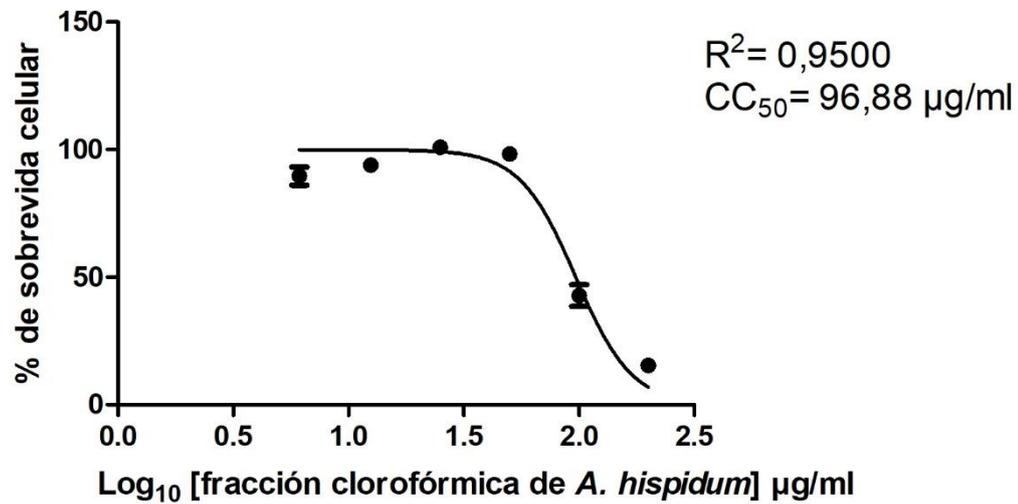


Figura 14. Determinación de CC_{50} en (A) y EC_{50} en (B) de la fracción clorofórmica de *A. australe*. Diluciones seriadas de las fracciones fueron agregadas en presencia o ausencia de infección y fueron incubadas por 72 hs, posteriormente la respuesta de citotoxicidad y actividad antiviral fue evaluada mediante el agregado de resazurina y qPCR respectivamente.

La evaluación de la fracción clorofórmica de *A. hispidum* presentó un valor de $CC_{50}=96,88 \mu\text{g/ml}$ con un $R^2=0,9500$ (**Figura 15 A**) y un valor de $EC_{50}=0,22 \mu\text{g/ml}$ con un $r^2=0,9124$, **Figura 15 B**. El IS fue de 430,58. Al comparar los IS obtenidos en la fracción clorofórmica, se puede ver que *A. hispidum* presentó un valor de IS mayor al obtenido para *A. australe* como se puede observar en la **Tabla 6**.

A.)



B.)

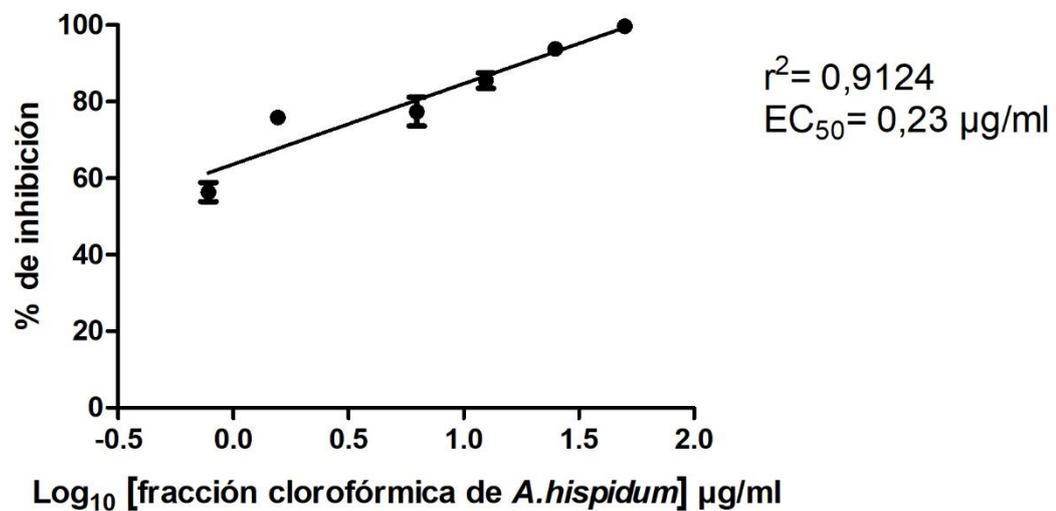
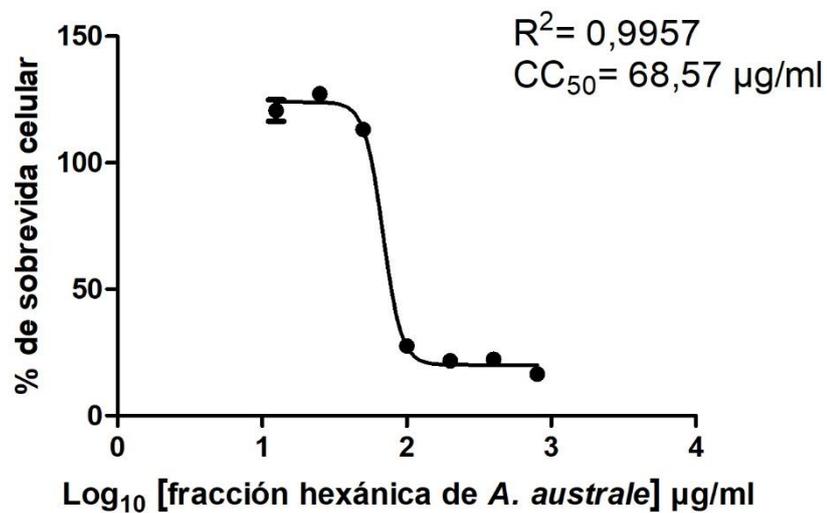


Figura 15. Determinación de A CC_{50} B EC_{50} para la fracción clorofórmica de *A. hispidum*. Diluciones seriadas de las fracciones fueron agregadas en presencia o ausencia de infección y fueron incubadas por 72 hs, posteriormente la respuesta de citotoxicidad y actividad antiviral fue evaluada mediante el agregado de resazurina y qPCR respectivamente.

La fracción hexánica de *A. australe* fue evaluada a fin de determinar los valores de CC_{50} y EC_{50} . Como se puede observar en la **Figura 16 A** se obtuvo un CC_{50} de 68,57 $\mu\text{g/ml}$ y con un $R^2= 0,9957$. La **Figura 16 B** se observa los resultados de actividad antiviral, con un EC_{50} de 5,54 $\mu\text{g/ml}$ y un $R^2= 0,9106$, que a diferencia de las demás curvas de EC_{50} observadas tuvo un comportamiento no lineal a los valores ensayados.

A.)



B.)

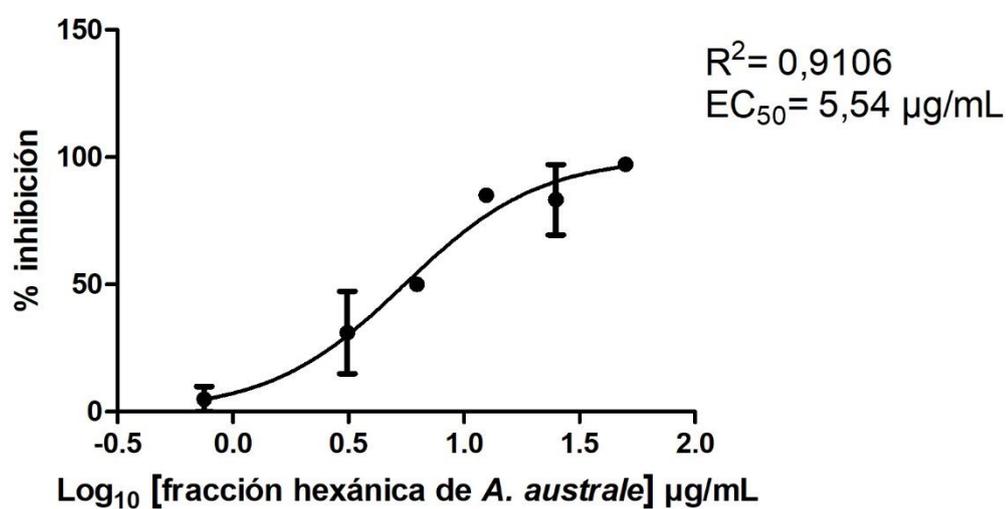
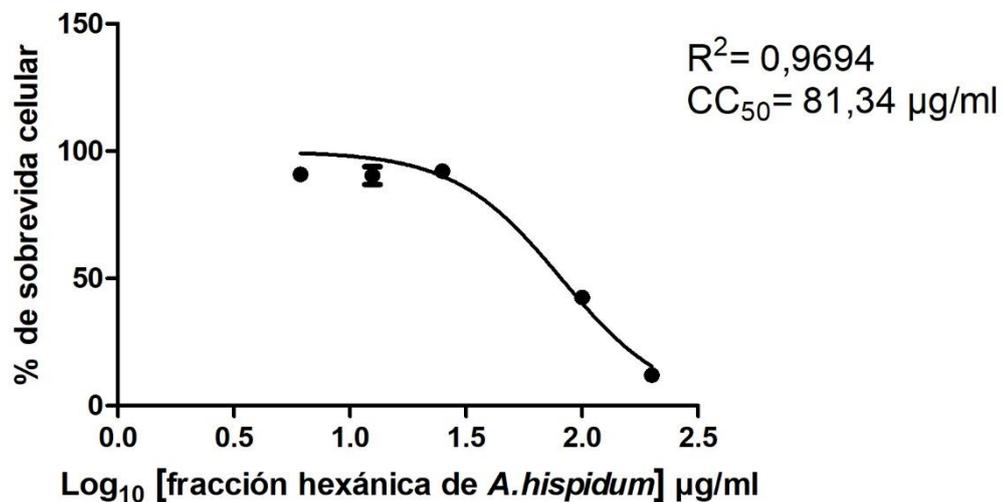


Figura 16. Determinación de CC_{50} en (A) y EC_{50} en (B) de la fracción hexánica de *A. australe*. Diluciones seriadas de las fracciones fueron agregadas en presencia o ausencia de infección y fueron incubadas por 72 hs, posteriormente la respuesta de citotoxicidad y actividad antiviral fue evaluada mediante el agregado de resazurina y por qPCR respectivamente.

En la figura 17 se observan los resultados de la fracción hexánica de *A. hispidum* donde se observó una CC_{50} de 81,34 $\mu\text{g/ml}$ con un $R^2=0,96$ y una EC_{50} de 0,16 $\mu\text{g/ml}$ con un $r^2= 0,9130$.

El IS obtenido a partir de los datos se encuentra en la **Tabla 6** siendo nuevamente mayor para *A. hispidum*.

A.)



B.)

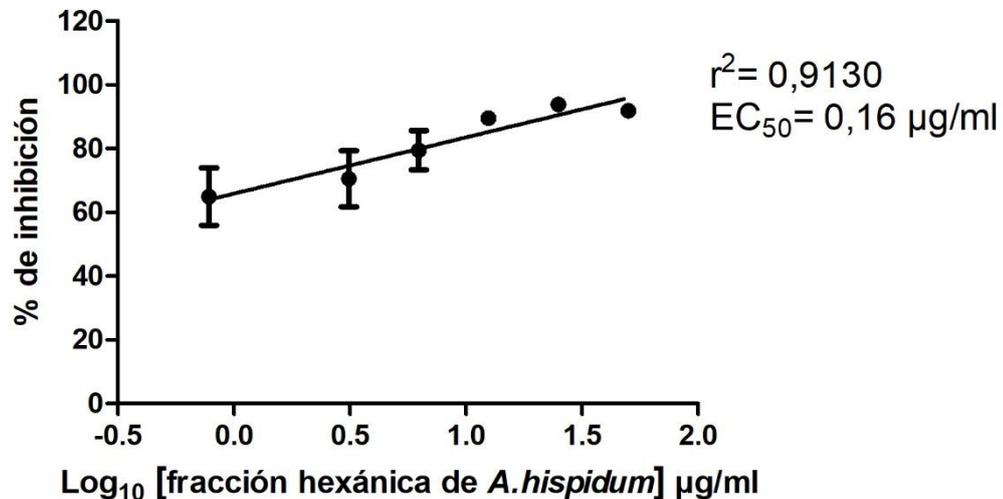


Figura 17. Determinación de A.) CC_{50} B.) EC_{50} para la fracción hexánica de *A. hispidum*. Diluciones seriadas de las fracciones fueron agregadas en presencia o ausencia de infección y fueron incubadas por 72 hs, posteriormente la respuesta la respuesta de citotoxicidad y actividad antiviral fue evaluada mediante el agregado de resazurina y por qPCR respectivamente.

En resumen, los IS de las fracciones de *Acanthospermum* fueron mayores a sus respectivos extractos metanólicos, principalmente debido a una actividad antiviral más potente. Por otra parte, las fracciones de *A. hispidum* presentaron mejores IS que las respectivas fracciones de *A. australe*.

Tabla 6. Resultados de CC₅₀, EC₅₀ e IS para las fracciones del género *Acanthospermum*

Especie	Fracción	CC ₅₀	EC ₅₀	IS
<i>Acanthospermum australe</i>	Cloroformo	128,30	2,60	49,35
	Hexano	68,57	5,54	12,38
<i>Acanthospermum hispidum</i>	Cloroformo	96,88	0,23	430,58
	Hexano	81,34	0,16	521,41

CC₅₀= concentración citotóxica 50, en µg/ml; EC₅₀=concentración efectiva 50, en µg/ml; IS= índice de selectividad

4.8. Evaluación del modo de acción de las fracciones activas del género *Acanthospermum*

A fin de comprender el mecanismo de acción de las fracciones clorofórmicas de *A. australe* y *A. hispidum* éstas fueron evaluadas en el ensayo de tiempo de infección. Como se observa en las **Figuras 18 A y B** las fracciones clorofórmicas de *A. australe* y *A. hispidum* presentan respuestas similares en el ensayo de tiempo de infección actuando a todas las etapas del ciclo viral.

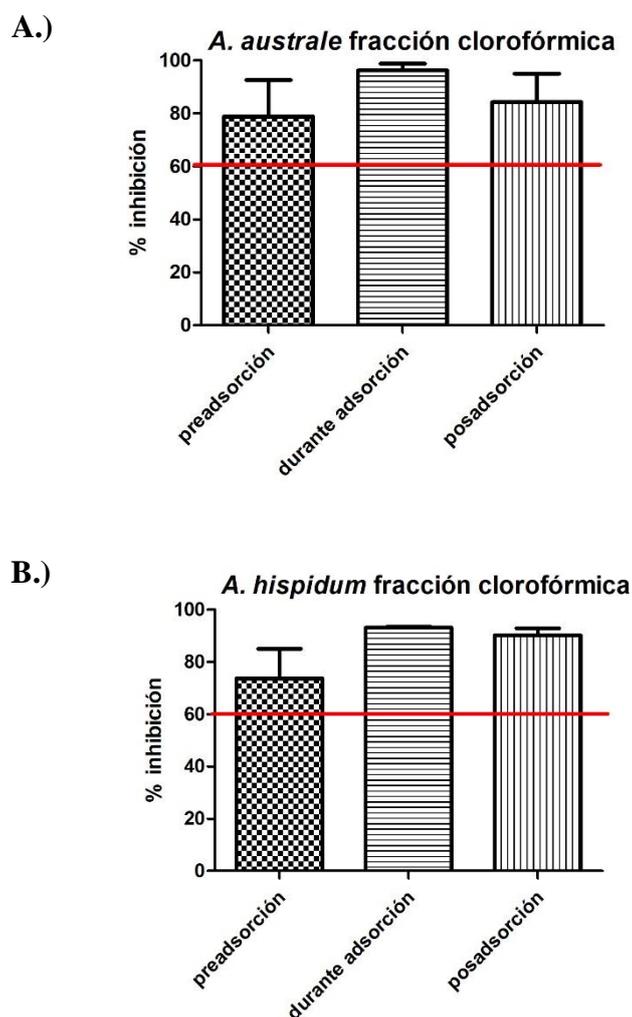
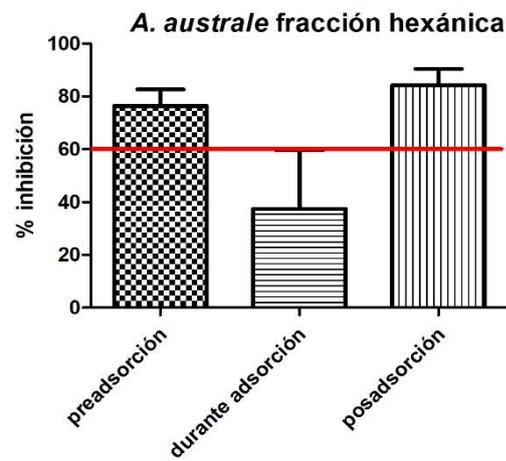


Figura 18. Determinación del efecto de las fracciones clorofórmicas de *A. australe* en (A) y *A. hispidum* en (B), sobre el ciclo viral. Las fracciones fueron ensayadas a 25µg/ml, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

Las fracciones hexánicas de *A. australe* y *A. hispidum* también fueron evaluadas en el ensayo de tiempo de infección, como se puede ver en las **Figuras 19 A y B**. las fracciones hexánicas de *A. australe* y *A. hispidum* presentaron comportamientos similares con una actividad antiviral mayor al 60% en las etapas de preadsorción y posadsorción viral.

A.)



B.)

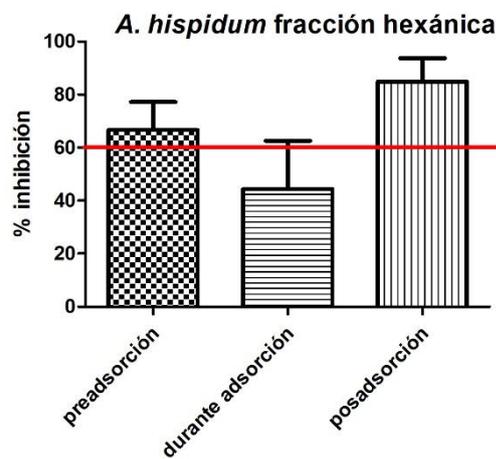


Figura 19. Determinación del efecto de las fracciones hexánica de *A. australe* en (A) y *A. hispidum* en (B), sobre el ciclo viral. Las fracciones fueron ensayadas a 25µg/ml, los sobrenadantes fueron recuperados a las 72 hs y cuantificados por qPCR. Se grafican el promedio de tres replicas biológicas y el SD.

Evaluación del efecto sobre la unión del VHS-1 a las células Vero, en las fracciones clorofórmicas del género *Acanthospermum*

El VHS-1 es un virus con envoltura que ingresa a las células Vero por el mecanismo de fusión de membranas, la cual se desarrolla en dos etapas unión y fusión. La unión implica el reconocimiento de los receptores celulares por parte de las glicoproteínas virales. Esta interacción puede ocurrir a 4°C, sin embargo, la penetración a la célula solo ocurre a 37°C, ya que la fusión de membranas es inhibida a 4°C. Por ello se incubaron células Vero al VHS-1 en presencia o ausencia de las fracciones clorofórmicas del género *Acanthospermum* a 4°C. Posteriormente se procedió a recuperar el virus unido y cuantificarlo por qPCR. Como control, se utilizó heparina un análogo de heparán sulfato que se sabe inhibe la infección de VHS-1. Como puede observarse en la **Figura 20** tanto la fracción clorofórmica de *A. australe* como *A. hispidum* tiene la capacidad de inhibir la unión viral, al igual que heparina.

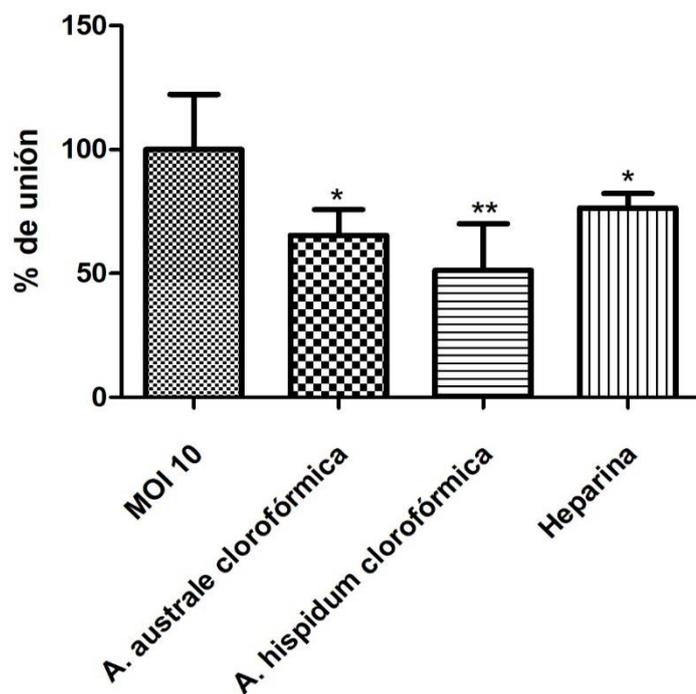


Figura 20. Análisis de la capacidad de unión del virus a la célula. Las fracciones clorofórmicas de *A. australe* y *A. hispidum* además de Heparina, el cual fue utilizado como un control positivo, fueron evaluadas a 50 µg/ml por qPCR. Se grafican el promedio de cinco replicas biológicas y el SD. Prueba t de Student de una cola con un 95% de confianza, * $p < 0,05$ ** $p < 0.01$.

4.9. Identificación de los componentes mayoritarios de las fracciones activas de *Acanthospermum*

La identificación de los compuestos presentes en las fracciones del género *Acanthospermum* se realizó a través de una separación por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). De esta manera se procedió a identificar los compuestos mayoritarios presentes en las diversas fracciones. En la **Figura 21 A y B** se presentan el cromatograma de las fracciones clorofórmicas de *A. australe* y *A. hispidum* respectivamente, es de notar que la fracción clorofórmica de

A. hispidum presentó un perfil más complejo con mayor cantidad de picos con respecto a la fracción clorofórmica de *A. australe*.

El cromatógrafo líquido se encuentra asociado a un espectrómetro de masas como detector, esto permite obtener su masa molecular basado en su relación masa/carga (m/z) y con ello poder realizar una identificación en el caso de hallar coincidencia con las descritas en la bibliografía para la misma especie. Para ello, se realizó una búsqueda bibliográfica a fin de hallar los compuestos descritos para el género *Acanthospermum* y poder comparar la masa de dichas moléculas con las masas moleculares obtenidas experimentalmente. En muchos casos fue necesario la búsqueda de las masas de las moléculas descritas en la bibliografía en bases de datos como NIST.

La fracción clorofórmica de *A. australe* presentó cuatro picos principales los cuales son enumerados en la **Figura 21 A** de estos picos tres pudieron ser asociados a moléculas ya descritas previamente para el género *Acanthospermum*, sugiriendo que el pico 1 con tiempo de retención (t_r) de 4,204 corresponde al compuesto 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3,6-dimetoxiflavona o axilarina; el pico 2 con $t_r = 4,681$ corresponde al compuesto 5,7,4'trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona o 3,6 dimetoxiapigenina y el pico 3 con $t_r = 5,099$ corresponde al compuesto 5, 4' dihidroxi 3,6,7 trimetoxi flavona o penduletina. El caso de la fracción clorofórmica de *A. hispidum*, si bien presentó más picos como se puede ver en la **Figura 21 B**, solo fue posible identificar cuatro compuestos; de los cuales dos se encuentran presentes también en la fracción cloroformica de *A. australe*, con tiempos de retención muy similares.como: 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3,6-dimetoxiflavona o axilarina y 5,7,4'trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona o 3,6 dimetoxiapigenina, adicionando la presencia de: crisosplenol D el cual corresponde al pico numero 2 con $t_r = 4,607$ y el compuesto (Z,Z) 9,12-octadecadienoato de metilo que corresponde al pico 4 con $t_r = 6,01$.

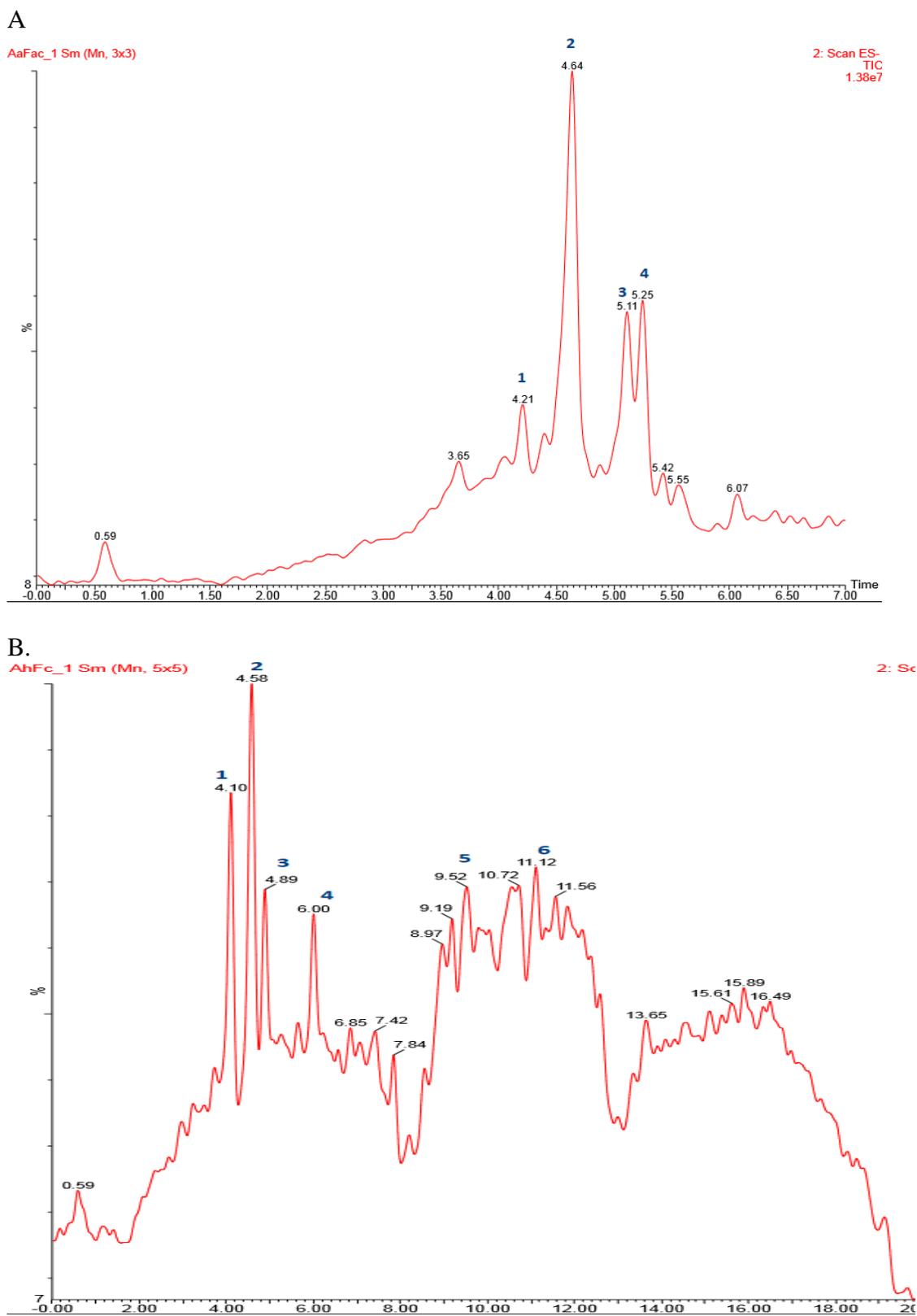
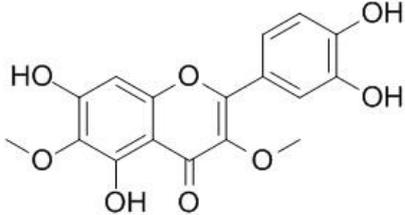
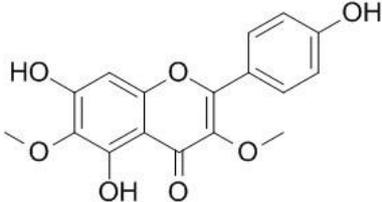
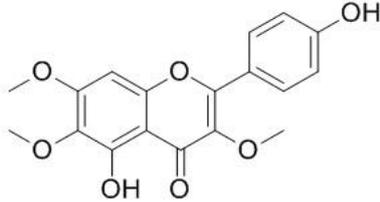


Figura 21. Cromatograma de las fracciones clorofórmicas de *A. australe* en (A.) y *A. hispidum* en (B.)

Tabla 7. Identificación de los compuestos presentes en la fracción clorofórmica de *A. australe*

Pic o N°	T retención	M- H	Compuesto	Estructura
1	4,204	34 5	5,7,3',4'-tetrahidroxi- 3,6- dimetoxiflavona/axilarina	
2	4,681	32 9	5,7,4'trihidroxy-3,6- dimetoxiflavona/3,6 dimetoxiapigenina	
3	5,099	34 3	5, 4' dihidroxi 3,6,7 trimetoxi flavona/ Penduletina	

T retención= en minutos

Tabla 8. Identificación de los compuestos presentes en la fracción clorofórmica de *A. hispidum*

Pic o N°	T retención	M- H	Compuesto	Estructura
1	4,109	34 5	5,7,3',4'-tetrahidroxi-3,6-dimetoxiflavona/axilarina	
2	4,607	35 9	3',4',5-trihidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona/Crisosplenol D	
3	4,886	32 9	5,7,4'trihydroxy-3,6-dihydroxiflavona/ 3,6 dimetoxiapigenina	
4	6,01	29 3	(Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metilo	

T retención= en minutos

De la misma manera las fracciones hexánicas de *A. australe* y *A. hispidum* fueron analizadas a fin de conocer los compuestos presentes en las mismas. Como se puede ver en la **Figura 22 A y B** el perfil cromatográfico de las fracciones hexánicas de *A. australe* y *A. hispidum* reveló la presencia de cinco picos principales en ambas fracciones. En el caso de la fracción hexánica de *A. australe* de los cinco picos principales fue posible asignar tres iones moleculares con una relación $[M-H]^-$ de 293; 295 y 299 correspondientes a los picos 1, 3 y 4 señalados en la **Figura 22 A**. En el caso de la fracción hexánica de *A. hispidum* se asignaron cuatro iones moleculares con una relación $[M-H]^-$ de 293; 295; 299 y 313 los cuales corresponden a los picos 1, 3 y 5 señalados en la **Figura 22 B**. En ambos casos, la búsqueda bibliográfica indicó la presencia de (Z,Z) 9,12-octadecadienoato de metilo y fitol. En el caso de los iones moleculares con relación m/z de 299 y 313 no fué posible relacionarlos a un compuesto específico decripto en la bibliografía para el género de *Acanthospermum*.

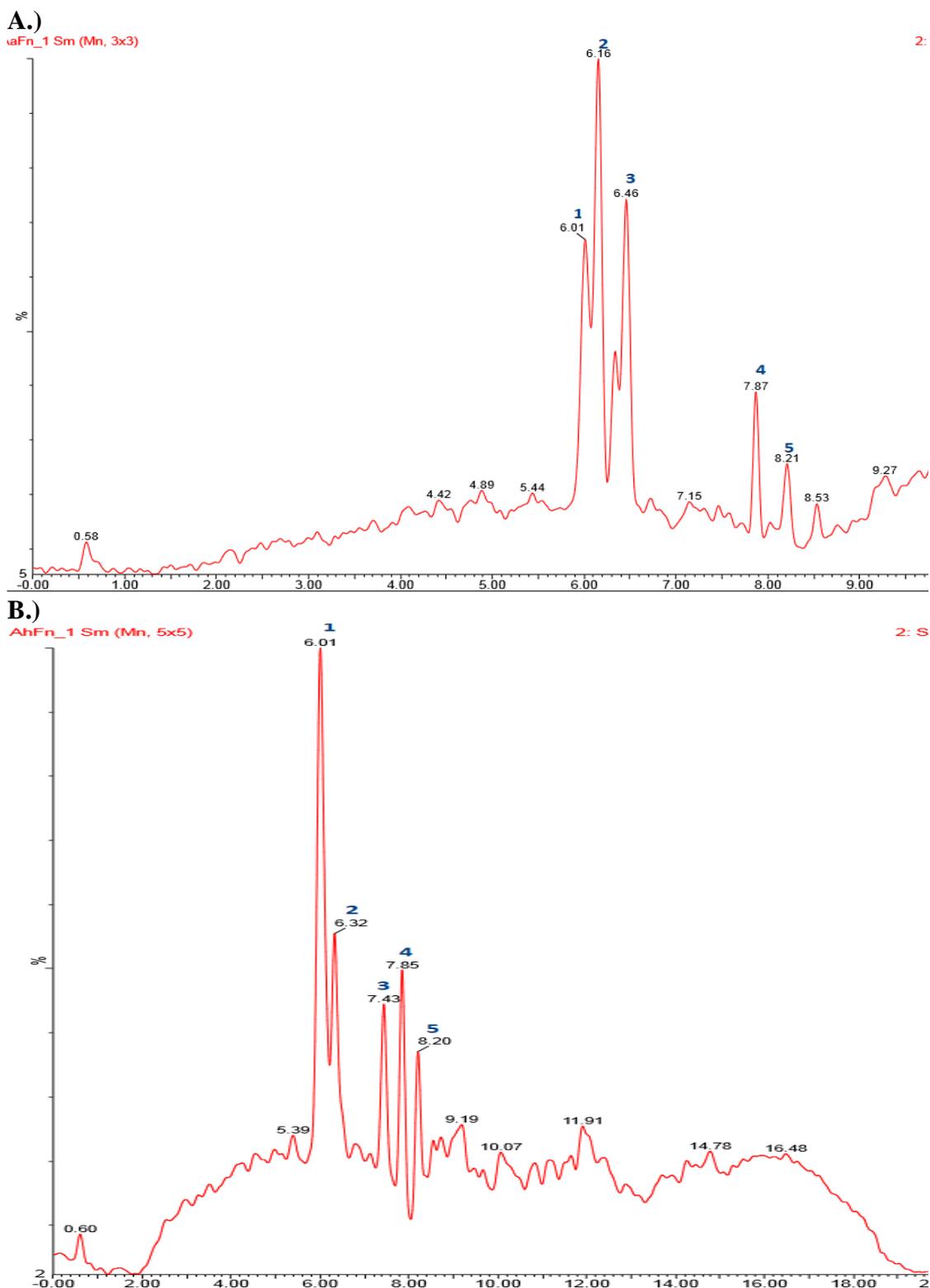
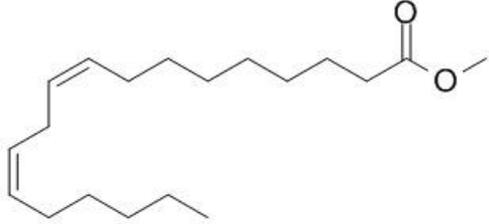
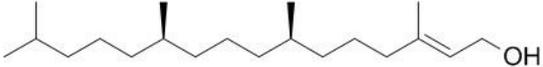


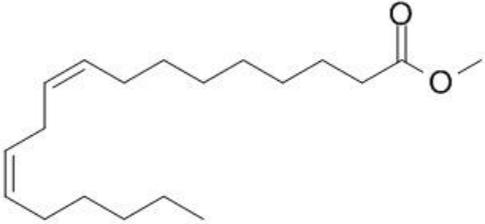
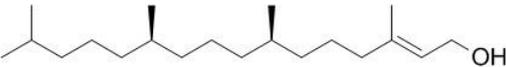
Figura 22. Cromatograma de las fracciones hexánicas de *A. australe* en (A) y *A. hispidum* en (B)

Tabla 9. Identificación de los compuestos presentes en la fracción hexánica de *A. australe*

Pic o N°	T retención	M- H	Compuesto	Estructura
1	5,987	293	(Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metilo	
3	6,324	295	Fitol	
4	7,858	299	No asignado	No asignado

T retención= en minutos

Tabla 10. Identificación de los compuestos presentes en la fracción hexánica de *A. hispidum*

Pico N°	T retención	M-H	Compuesto	Estructura
1	6,016	293	(Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metilo	
2	6,339	295	Fitol	
4	7,85	299	No asignado	No asignado
5	8,203	313	No asignado	No asignado

T retención= en minutos

5. DISCUSIÓN

En el ámbito de esta tesis se realizó el tamizaje amplio de extractos de vegetales contra el VHS-1, que permitió la evaluación de 28 extractos metanólicos (Gabaglio, Cantero et al., 2019). El 36% de los extractos que componen la biblioteca de extractos presentaron actividad antiviral mayor al 60% y citotoxicidad menor al 20%, la identidad y los porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos se presentan en la **Tabla 2**. Además de evaluar actividad antiviral es importante evaluar la citotoxicidad de los candidatos en estudio principalmente a fin de demostrar su seguridad, pero también a fin de poder descartar un falso efecto antiviral debido a una muerte celular. Los extractos que presentaron actividad antiviral representan a la familia Asteraceae, Solanaceae y Anonaceae y fueron considerados para análisis posteriores.

Una vez identificados los extractos metanólicos activos es necesario caracterizarlos en términos de IS a fin de determinar su nivel de seguridad, cuanto mayor sea este valor es indicativo que el candidato en estudio ejerce acción preferentemente hacia una actividad antiviral que efectos a nivel celular, por lo tanto, es considerado más seguro. En la **Tabla 3** se presentaron los resultados de IS para todos los extractos metanólicos activos, como se puede observar se obtuvieron valores variables y prometedores de IS para todos los extractos activos. El género *Solanum* presentó IS superior a 100, de la misma manera la especie de *A. hispidum* proporcionó un IS superior a 100, es de resaltar que para *A. australe* se obtuvo el menor IS con valor por debajo de 10. De tal manera todos los extractos activos son considerados antivirales basados en IS mayor a 4 (Tsuchiya et al., 1985). El método desarrollado y los resultados obtenidos de este estudio fueron publicados en la revista Natural Products Research (Gabaglio, Cantero et al., 2019).

En este estudio, el extracto metanólico de *Annona emarginata* demostró potencial como antiviral (IS=28,39, **Tabla 3**). Se ha reportado previamente que el extracto hidroalcohólico de *A. muricata* una especie del mismo género posee la capacidad de inhibir los efectos citopáticos de la infección por el VHS-2 (Padma, Pramod,

Thyagarajan & Khosa, 1998). Se observó que la respuesta de *A. emarginata* en el ensayo de tiempo de infección, tuvo actividad antiviral en todas las etapas del ciclo viral (**Figura 4**), esto puede deberse a que el extracto crudo es una mezcla compleja y los diversos compuestos actúan a diferentes niveles.

Así también el extracto metanólico de *L. niederleinii* (anteriormente conocido como *Vernonia niederleinii*) demostró ser candidato antiviral con un IS= 40,68. El IS obtenido con el extracto metanólico fue mayor que los reportados anteriormente para los compuestos tipo poliacetilenos de *V. scorpiodes* (Pollo et al., 2013). En cuanto al modo de acción el extracto metanólico de *L. niederleinii* presentó actividad antiviral en la etapa de preadsorción y posadsorción viral (**Figura 7**).

Los extractos metanólicos de *S. americanum*, *S. comptum* y *S. sisimbrifolium* presentaron los IS más altos fundamentalmente debido a su baja citotoxicidad (**Tabla 3**) con un IS de 145,71; 208,55 y 119,90 respectivamente. La actividad antiviral para el género *Solanum* ha sido descrita ampliamente, sin embargo, este constituye el primer reporte de actividad antigerpética para las especies de *S. comptum* y *S. sisimbrifolium*. La evaluación del mecanismo de acción reveló que dichos extractos actúan principalmente en la etapa de preadsorción y posadsorción viral (**Figura 8**). La actividad antiherpética del género *Solanum* ha sido atribuida a extractos ricos en compuestos polifenólicos, y se ha asociado a la inhibición del estrés oxidativo inducido por la infección viral (Rich et al., 2018; Sebastianoa, Chastel, Thoisy, Eens & Costantini, 2016). Nuestros resultados están en concordancia con estos antecedentes, ya que se observó una actividad antiviral en el tratamiento posadsorción de 92,3%, 76,7% y 80,0% para *S. sisimbrifolium*, *S. americanum* y *S. comptum* respectivamente. Por otro lado, la presencia de compuestos tipo glucósidos de esteroides en el género *Solanum* ha sido relacionado con una actividad del tipo virucídica (Ikeda et al., 2000; Valadares, Brandão, Kroon, & Souza, 2009). Sin embargo, en nuestros resultados al ensayo de tiempo de infección las especies de *Solanum* presentaron actividad antiviral baja en el ensayo durante la adsorción, por lo que la inactivación de la partícula viral no constituye el mecanismo principal de actividad antiviral (**Figura 8**).

Los extractos metanólicos de *B. dracunculifolia*, *B. notoserghila* y *B. trimera* presentaron actividad antiviral a la concentración ensayada, sin embargo, el extracto metanólico de *B. punctulata* no fue activo contra VHS-1. Varias especies del género *Baccharis* han sido descritas con actividad antiviral contra VHS-1 como el extracto acuoso de *B. genistelloide* provenientes de Bolivia, fue capaz de inhibir la replicación del VHS-1 con concentraciones muy cercanas a las concentraciones tóxicas (Abad, Bermejo, Gonzales & Iglesias, 1999). Por lo tanto, podemos considerar que los extractos metanólicos del género *Baccharis* evaluados aquí presentan mejores propiedades antivirales que los informados por dicho grupo. El extracto acuoso de *B. trinervis* proveniente del Ecuador demostró inhibir la replicación del VHS-1 a concentraciones no tóxicas (Abad et al., 1999), sin embargo en dicho trabajo no se determinó el IS por lo cual no es posible comparar con nuestros resultados. Por otro lado, la fracción acuosa de *B. gaudichaudiana* procedente de Argentina demostró inhibir la replicación del VHS-1, asociada a un alto IS superior a 100 debido principalmente a su baja citotoxicidad (Visintini et al., 2013). En este trabajo hemos obtenido valores de IS de 21,89, 23,01 y 12,16 para *B. dracunculifolia*, *B. notoserghila* y *B. trimera* respectivamente (**Tabla 3**) fueron inferiores a los obtenidos por Visintini et al, este fenómeno podría asociarse a la naturaleza del extracto, se ha observado que por lo general los extractos alcohólicos resultan más tóxicos que los extractos acuosos (Abad et al., 1999). A diferencia de los resultados reportados previamente donde la fracción acuosa de muchas especies del género *Baccharis* presentan actividad antiherpética, en nuestros resultados solo la fracción acuosa de *B. punctulata* presentó actividad antiviral con valores cercanos al 60% (**Figura 13**). Es de notar que el extracto metanólico de dicha especie no fue activo contra VHS-1, lo cual nos hace pensar que en nuestras condiciones los compuestos altamente polares se encuentran poco involucrados en la actividad antiviral contra el VHS-1.

El análisis del modo de acción de los extractos activos demostró resultados diferentes entre especies, donde los extractos de *B. dracunculifolia* y *B. trimera* actúan inhibiendo todas las etapas del ciclo viral (**Figura 6**). El perfil de actividad antiviral del extracto metanólico de *B. dracunculifolia* se podría deber a sinergias entre las

fracciones activas. Por un lado, la fracción hexánica actúa en todas las etapas del ciclo viral (**Figura 9**). La fracción de diclorometano actúa en la etapa durante la adsorción y posterior a la adsorción viral (**Figura 10**). Finalmente, la fracción de acetato de etilo actúa en la etapa de preadsorción y posadsorción viral (**Figura 11**). El extracto metanólico de *B. trimera* si bien se determinó que actúa en todas las etapas del ciclo viral, las fracciones activas actúan a nivel celular antes del ingreso viral y posterior al mismo (**Figura 11 B y 12 B**). Por otro lado, el extracto metanólico de *B. notoserghila* actúa principalmente en la etapa de preadsorción y posadsorción (**Figura 6**), la fracción butanólica demostró el mismo perfil de actividad, mientras que la fracción de diclorometano actúa a etapas posteriores de la entrada viral (**Figura 10 y 12**) por lo cual los compuestos presentes en dichas fracciones podrían ser los responsables del perfil de actividad del extracto metanólico de *B. notoserghila*. Los estudios publicados hasta la actualidad se han centrado en la actividad antiherpética de la fracción acuosa del género *Baccharis* las cuales contienen moléculas altamente polares, en este trabajo hemos aportado la inclusión del tamizaje de fracciones menos polares que podrían contener compuestos con características diferentes. Sin embargo, no se observó resultados similares entre las diferentes fracciones esto puede deberse a la variedad de compuestos con diferentes características que pueden estar relacionados con diferentes tipos de actividad antiviral.

La actividad antiviral de los extractos metanólicos de las especies de *A. australe* y *A. hispidum* frente a otros virus miembros de la subfamilia Alphaherpesvirinae que infecta a animales, ha sido descrita previamente (Rocha Martins et al., 2011; Summerfield et al., 1997). Como se puede observar en la **Tabla 3** los extractos metanólicos de *A. australe* y *A. hispidum* presentaron IS de 9,71 y 131,96 respectivamente, ambos extractos son considerados candidatos antivirales potentes (Tsuchiya et al., 1985).

En busca de identificar los posibles compuestos responsables de la actividad antiviral se evaluaron las fracciones disponibles de *A. australe* y *A. hispidum*. Se disponía de cuatro fracciones (butanólica, clorofórmica, hexánica y acetato de etilo) de las cuales

la fracción hexánica y clorofórmica presentaron una fuerte actividad antiviral con IS superiores a los observados para los extractos metanólicos (**Tabla 3** y **Tabla 4**).

Al comparar las fracciones en un mismo disolvente para cada especie hemos notado que la especie de *A. hispidum* presentó IS más altos que *A. australe*, esto puede deberse a diferencias en la composición de cada material. En este sentido el análisis de cromatografía líquida demostró que las fracciones de *A. hispidum* son más complejas con mayor cantidad de picos que la de *A. australe* (**Figura 21** y **22**). La mayor cantidad de picos observados en el cromatograma de *A. hispidum* indica la presencia de una mayor cantidad de compuestos, lo cual a su vez podría explicar un IS más alto obtenido con dicha fracción.

Tanto los extractos metanólicos como las fracciones activas del género *Acanthospermum* fueron evaluados en el ensayo de tiempo de infección. Los extractos metanólicos de *A. australe* y *A. hispidum* presentaron actividad antiviral mayor al 60% en todas las etapas del ciclo viral (**Figura 5**). En cuanto a la inhibición de la entrada viral se encuentra mediada por los compuestos presentes en la fracción clorofórmica de ambas especies (**Figura 18**), asociado a la inhibición de la interacción entre glicoproteínas virales y receptores celulares (**Figura 20**). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente por Summerfield et al, donde determinaron que el extracto acuoso de *A. hispidum* inhibe la entrada del virus de la pseudorrabia porcina (PRV), debido a la interacción con gC (Summerfield et al., 1997). Si bien VHS-1 y PRV pertenecen a diferentes géneros son clasificados dentro de la subfamilia Alphaherpesvirinae. Los miembros de esta subfamilia comparten el mismo mecanismo de entrada, la unión o adsorción viral en ambos virus se encuentra mediada por la interacción de gC con los receptores tipo heparán sulfato (Spear, 1993). Los compuestos presentes en las fracciones clorofórmicas fueron mayoritariamente flavonoides. Se ha demostrado que los compuestos polifenólicos poseen la capacidad de unirse a proteínas a través de los grupos hidroxilos por puentes de hidrógeno o interacción covalente, permitiendo su unión a proteínas virales o receptores celulares (McManus, Davis, Lilley & Haslam, 1981). De hecho, la evaluación de la fracción rica en compuestos fenólicos obtenidas de la piel de

almendra contra VHS-1 reveló que el mecanismo de inhibición se debe a la inhibición de la adsorción viral (Bisignano et al., 2017).

Si bien la inhibición de la adsorción viral puede ser atribuida a la presencia de compuestos polifenólicos, también hemos identificado la presencia de (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metilo, un éster de metilo del ácido linoleico en la fracción clorofórmica de *A. hispidum* (**Tabla 8**). Se ha descrito que el ácido linoleico posee actividad antiviral contra virus con envoltura como el VHS-2, debido a un efecto virucídico asociado a la desestabilización de la membrana viral con pérdida de la capacidad de unión a la célula blanco (Sands, Auperin & Snipes, 1979). La presencia de los compuestos polifenólicos junto con (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metilo explicarían el mecanismo de acción asociado a la inhibición de la entrada viral, y a su vez sugiere estudiar el efecto virucídico como un posible mecanismo de acción para dichas fracciones.

Los flavonoides identificados en la fracción clorofórmica del género *Acanthospermum* corresponden al grupo de las 3-metoxiflavonas. Se ha demostrado que las 3-metoxiflavonas como axilarina y penduletina poseen actividad antiviral contra virus de ARN como el rinovirus y enterovirus 71 respectivamente (Tsuchiya et al., 1985; Zhu et al., 2011). En cuanto a la actividad antiviral específica contra el VHS, se demostró que axilarina posee actividad antiviral inhibiendo la replicación del VHS-2, sin embargo no se ha establecido su mecanismo de inhibición (Álvarez et al., 2011). Además de presentar actividad antiviral contra virus de ARN, las estructuras del tipo metoxi-flavonoides han demostrado inhibir virus de ADN. Los virus de ARN y ADN tienen mecanismos de replicación diferentes. Las 3-metoxiflavonas presentes en las fracciones clorofórmicas del género *Acanthospermum* podrían ser responsables de la actividad antiviral observadas cuando las mismas se encuentran presentes antes o después de la adsorción viral, por mecanismos asociados a la afectación de vías celulares necesarias para la propagación viral (Ortega et al., 2019).

Mediante comparación del ion molecular obtenido de la fracción hexánica con los iones moleculares de los compuestos descritos para el género *Acanthospermum* se han identificado en primera instancia a los compuestos como (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metilo y fitol. Como se mencionó anteriormente (Z,Z)-9,12-octadecadienoato podría estar involucrado en la inhibición de la entrada viral por un efecto virucídico, sin embargo, para la fracción hexánica la inhibición de la entrada viral no constituyó el principal mecanismo de acción antiviral. El fitol es un alcohol primario diterpénico de cadena larga insaturada componente de la clorofila, se ha demostrado que los alcoholes insaturados de cadena larga (a partir de 14 carbonos) son capaces de inactivar virus con membranas, de hecho, el fitol ha demostrado tener un efecto virucídico contra VHS-1 y 2 (Sands et al., 1979; Snipes, Person, Keller, Taylor & Keith, 1977). Sin embargo, estos resultados no se relacionan con lo observado en este trabajo, donde las fracciones hexánica de *A. australe* y *A. hispidum*, un extracto con actividad virucídica debería inhibir mayoritariamente en el grupo durante la adsorción, sin embargo, se observaron actividad antiviral mayor al 60% en las etapas de preadsorción y posadsorción viral para esta fracción (**Figura 19**). En concordancia con nuestros resultados Santoyo et al. observaron que el fitol es capaz de inhibir la replicación viral cuando las células son tratadas antes o posterior a la adsorción viral (Santoyo et al., 2010). Sin embargo, no se puede descartar la presencia de otros compuestos no identificados mediante nuestros análisis responsables de la actividad antiviral. Estos resultados justifican mayores análisis tanto en los compuestos constituyentes de las diferentes fracciones, así como en la búsqueda de los mecanismos de acción antiviral.

6. CONCLUSIÓN

Se logro obtener datos de actividad antiviral contra el VHS-1 y el índice de selectividad de diez especies no reportadas previamente. De estas, ocho presentaban antecedentes de actividad antiviral contra el VHS-1 a nivel de género (*B. dracunculifolia*, *B. notoserghila*, *B. trimera*, *L. niederleinii*, *Solanum americanum*, *S. comptum* y *S. sisymbriifolium*). Las especies estudiadas del género *Solanum* presentaron los mejores índices de selectividad.

No se observó un comportamiento homogéneo en la actividad antiviral presente en las diferentes fracciones de los miembros del género *Baccharis*, así como en el análisis de los tiempos de infección. Lo cual sugiere, que la actividad antiviral en este género es realizada por una diversidad de compuesto con diferentes polaridades y mecanismos de acción.

Se observó actividad antiviral en las fracciones clorofórmica y hexánica de *A. australe* y *A. hispidum* con IS altos, incluso mayores a los obtenidos para sus correspondientes extractos metanólicos. En este caso se observo un comportamiento similar en torno a los resultados de tiempo de infección para las fracciones en un mismo disolvente de ambas especies. Esto sugiere la presencia de compuestos activos similares en ambas especies.

Las fracciones clorofórmicas de las especies del género *Achantospermum* inhibieron todas las etapas del ciclo viral, además dicha fracción fue capaz de interferir la unión viral a la célula. En cuanto a la fracción en hexano de ambas especies actuaron en las etapas de preadsorción y posadsorción viral.

Fue posible identificar mediante el análisis cromatográfico de las fracciones clorofórmica y hexánica de *A. australe* y *A. hispidum* la presencia de 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3,6-dimetoxiflavona o axilarina, 5,7,4'trihidroxy-3,6-dimetoxiflavona o 3,6 dimetoxiapigenina, 5, 4' dihidroxi 3,6,7 trimetoxi flavona o penduletina, 3',4',5-

trihidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona o Crisosplenol D, (Z,Z)-9,12-octadecadienoato de metilo, y fitol. Los cuales pueden considerarse como posibles candidatos responsables de la actividad antiviral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, M J, Bermejo, P., Palomino, S. S., Chiriboga, X., & Carrasco, L. (1999). Antiviral Activity of some South American Medicinal Plants. *Phytotherapy Research*, 13(2), 142–146.
- Abad, María José, Bermejo, P., Gonzales, E., & Iglesias, I. (1999). Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology: The Vascular System*, 32(4), 499–503.
- Álvarez, Á. L., Habtemariam, S., Juan-Badaturuge, M., Jackson, C., & Parra, F. (2011). In vitro anti HSV-1 and HSV-2 activity of *Tanacetum vulgare* extracts and isolated compounds: An approach to their mechanisms of action. *Phytotherapy Research*, 25(2), 296–301.
- Atanasiu, D., Saw, W. T., Cohen, G. H., & Eisenberg, R. J. (2010). Cascade of events governing cell-cell fusion induced by *Herpes simplex* virus glycoproteins gD , gH / gL , and gB. *Journal of Virology*, 84(23), 12292–12299.
- Bag, P., Ojha, D., Mukherjee, H., Halder, C., Mondal, S., Biswas, A., Chattopadhyay, D. (2014). A dihydro-pyrido-indole potently inhibits HSV-1 infection by interfering the viral immediate early transcriptional events. *Antiviral Research*, 105(1), 126–134.
- Binns, S. E., Hudson, J., Merali, S., & Arnason, J. T. (2002). Antiviral activity of characterized extracts from *Echinacea* spp. (Heliantheae: Asteraceae) against *Herpes simplex* virus (HSV-I). *Planta Medica*, 68(09), 68–71.
- Bisignano, C., Mandalari, G., Smeriglio, A., Trombetta, D., Pizzo, M. M., Pennisi, R., & Sciortino, M. T. (2017). Almond skin extracts abrogate HSV-1 replication by blocking virus binding to the cell. *Viruses*, 9(7), 178.
- Boutell, C., Sadis, S., & Everett, R. D. (2002). *Herpes simplex* virus type 1 immediate-early protein ICP0 and its isolated RING finger domain act as ubiquitin E3 ligases in vitro. *Journal of Virology*, 76(2), 841–850.
- Cantero, G., Gabaglio, S., & Sotelo, P. (2017). Desarrollo del método de PCR en tiempo real capaz de cuantificar Virus del *Herpes simple* tipo 1 del sobrenadante de células infectadas utilizando SybrGreen (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

- Chakrabarti, S., Pillay, D., Ratcliffe, D., Cane, P. A., Collingham, K. E., & Milligan, D. W. (2000). Resistance to antiviral drugs in *Herpes simplex* virus infections among allogeneic stem cell transplant recipients : risk factors and prognostic significance. *Journal of Infectious Diseases*, 181(6), 2055–2058.
- Cheng, H., Lin, L., Huang, H., Yang, C., & Lin, C. (2008). Yin Chen Hao Tang , a Chinese prescription , inhibits both herpes simplex virus type-1 and type-2 infections in vitro. *Antiviral Research*, 77(1), 14–19.
- Christophers, J., Clayton, J., Craske, J., Ward, R., Collins, P., Trowbridge, M., & Darby, G. (1998). Survey of resistance of *Herpes simplex* virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(4), 868–872.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2004). CLSI. Antiviral susceptibility testing: *Herpes simplex* virus by plaque reduction assay; Approved standard M33-A.
- Coes, D., & Richman, D. (2007). Antiviral Agents. In D. M. Knipe & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* (sixth, pp. 350–352). Philadelphia.
- Colpitts, C. C., & Schang, L. M. (2014). A small molecule inhibits virion attachment to heparan sulfate- or sialic acid-containing glycans. *Journal of Virology*, 88(14), 7806–7817.
- Crump, C. (2018). Virus assembly and egress of HSV. In: Kawaguchi Y., Mori Y., Kimura H. (eds) Human Herpesviruses. Advances in *Experimental Medicine and Biology*, vol 1045. Springer, Singapore.
- Ejercito, P. M., Kieff, E. D., & Roizman, B. (1968). Characterization of *Herpes simplex* virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *The Journal of General Virology*, 2(3), 357–364.
- Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., Miranda, P. D. E., Beauchamp, L., & Schaeffert, H. J. (1977). Selectivity of action of an antiherpetic agent , 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5716–5720.
- Englund, J. A., Zimmerman, M. E., Swierkosz, E. M., Goodman, J. L., Scholl, D., & Jr, Balfour, H.H., (1990). Herpes Simplex virus resistant to acyclovir a study in a tertiary care center. *Annals of Internal Medicine*, 112(6), 416–422.

- Eriksson, B., & Oberg, B. (1982). Pyrophosphate analogues as inhibitors of DNA polymerases of cytomegalovirus, *Herpes simplex* virus and cellular origin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 696(2), 115–123.
- Gabaglio, S., Alvarenga, N., Cantero-González, G., Degen, R., Ferro, E. A., Langjahr, P., Sotelo, P. H., (2019). A quantitative PCR assay for antiviral activity screening of medicinal plants against Herpes simplex 1. *Natural Product Research*, 1–5.
- Gaudreau, A., Hill, E., Balfour, H. H., Erice, A & Boivin, G. (1998). Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant *Herpes simplex* viruses from immunocompromised patients. *Journal of Infectious Diseases*, 178(2), 297–303.
- Ghaemi, A., Soleimanjahi, H., Gill, P., Arefian, E., Soudi, S & Hassan, Z. (2009). *Echinacea purpurea* polysaccharide reduces the latency rate in *Herpes simplex* virus type-1 infections. *Intervirology*, 52(1), 29–34.
- Gianni, T., Amasio, M., & Campadelli-Fiume, G. (2009). *Herpes simplex* virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH / gL in part through the C-terminal profusion domain. *Journal Of Biological Chemistry*, 284(26), 17370–17382.
- Gnann, J. W., Barton, N. H., & Whitley, R. J. (1983). Acyclovir: Mechanism of action, pharmacokinetics, safety and clinical applications. *The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 3(5), 275–283.
- Heldwein, E., Lou, H., Bender, F., Cohen, G., Eisenberg, R., & Harrison, S., (2006). Crystal structure of glycoprotein B from *Herpes simplex* virus 1. *Science*, 313(5784), 217–220.
- Morgan, C., Ellison, A., Rose, M., (1954). Structure and development of viruses as observed in the electron microscope. I Herpes simplex virus. *Journal of Experimental Medicine*, 100(2), 195–202.
- Honess, R. W., & Roizman, B. (1974). Regulation of Herpesvirus macromolecular synthesis I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *Journal of Virology*, 14(1), 8–19.
- Ibáñez, F. J., Farías, M. A., Gonzalez-troncoso, M. P., & Corrales, N. (2018). Experimental dissection of the lytic replication cycles of *Herpes simplex* viruses in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–23.

- Ikeda, Tsuyoshi Ando, Jun Miyazono, Akiko Zhu, X.-H. (2000). Anti-herpes virus activity of *Solanum* Steroidal Glycosides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 363, 364.
- Kalamvoki, M., & Roizman, B. (2010). Circadian CLOCK histone acetyl transferase localizes at ND10 nuclear bodies and enables *Herpes simplex* virus gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(41), 17721–17726.
- Karaoglu, T., Yesilada, E., & Gurbuz, I. (2009). Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis*. *Microbiological Research*, 164(5), 545–552.
- Katz, D. H., Marcelletti, J. F., Khalil, M. H., Pope, L. E., & Katz, L. R. (1991). Antiviral activity of 1-docosanol, an inhibitor of lipid-enveloped viruses including *Herpes simplex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), 10825–10829.
- Katz, D. H., Marcelletti, J. R., Pope, L. E., Khalil, M. H., Katz, L. R., & McFadden, R. (1994). n-Docosanol: Broad spectrum anti-viral activity against lipid-enveloped viruses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 724(1), 472–488.
- Fife, K. H., Crumpacker, C. S., Mertz, G. J., Hill, E. L., Boone, G. S., Acyclovir Study Group. (1994). Recurrence and resistance patterns of herpes simplex virus following cessation of ≥ 6 years of chronic suppression with acyclovir. *Journal of Infectious Diseases*, 169(6), 1338–1341.
- Koca, U., & Ozcelik, B. (2009). Antiviral, antibacterial, and antifungal activities of *Centaurea tchiahatcheffii* extracts. *Turkish Journal Pharm. Sci*, 6(2), 125–133.
- Langston, A. A., Redei, I., Caliendo, A. M., Somani, J., Hutcherson, D., Lonial, S., & Waller, E. K. (2002). Development of drug-resistant *Herpes simplex* virus infection after haploidentical hematopoietic progenitor cell transplantation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 99(3), 1085–1088.
- Leahy, B. J., Christiansen, K. J., & Shellam, G. (1994). Standardisation of a microplate in situ ELISA (MISE-test) for the susceptibility testing of *Herpes simplex* virus to acyclovir. *Journal of Virological Methods*, 48(1), 93–108.

- Looker, K. J., Magaret, A. S., May, M. T., Turner, K. M. E., Vickerman, P., Gottlieb, S. L., & Newman, L. M. (2015). Global and regional estimates of prevalent and incident *Herpes simplex* virus type 1 infections in 2012. *PLoS ONE*, *10*(10), 1–17.
- McLaren, C., Ellis, M. N., & Hunter, G. A. (1983). A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of *Herpes simplex* viruses to antiviral agents. *Antiviral Research*, *3*(4), 223–234.
- McManus, J. P., Davis, K. G., Lilley, T. H., & Haslam, E. (1981). The association of proteins with polyphenols. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (7), 309–311.
- Morgan, C., Rose, H. M., & Mednis, B. (1968). Electron microscopy of *Herpes simplex* virus. I entry. *Journal of Virology*, *2*(5), 507–516.
- Nicola, A. V., McEvoy, A. M., & Straus, S. E. (2003). Roles for endocytosis and low pH in *Herpes simplex* virus entry into HeLa and chinese hamster ovary cells. *Journal of Virology*, *77*(9), 5324–5332.
- Ojala, I. V. I. M., Sodeik, B., Ebersold, M. W., Kutay, U., & Helenius, A. R. I. (2000). *Herpes simplex* virus type 1 entry into host cells: Reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Journal of Virology*, *20*(13), 4922–4931.
- Onozato, T., Nakamura, C. V., Aparício, D., Cortez, G., Prado, B., Filho, D., & Ueda-nakamura, T. (2009). *Tanacetum vulgare*: Antiherpes virus activity parthenolide. *Phytotherapy Research*, *23*(6), 791–796.
- Ortega, J. T., Serrano, M. L., Suárez, A. I., Baptista, J., Helene, F., Cavallaro, L. V., & Rangel, H. R. (2019). Antiviral activity of flavonoids present in aerial parts of *Marcetia taxifolia* against Hepatitis b virus, Poliovirus, and *Herpes simplex* virus In Vitro. *EXCLI Journal*, *18*, 1037–1048.
- Padma, P., Pramod, N. P., Thyagarajan, S. P., & Khosa, R. L. (1998). Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on *Herpes simplex* virus. *Journal of Ethnopharmacology*, *61*(1), 81–83.
- Pellett, Philip E. Roizman, B. (2007). Herpesviridae. In *Fields Virology sixth edition volume II* (pp. 1804–1810).

- Pereira, L., Wolff, M. H., Fenwick, M., & Roizman, B. (1977). Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis V. Properties of α polypeptides made in HSV-1 and HSV-2 infected. *Virology*, 77(3), 733–749.
- Pollo, L. A. E., Bosi, C. F., Leite, A. S., Rigotto, C., Kratz, J., Simões, C. M. O., & Biavatti, M. W. (2013). Phytochemistry polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities. *Phytochemistry*, 2–10.
- Rich, A. P., Sotto, A. Di, Giacomo, S. Di, Amatore, D., Id, M. L., Vitalone, A., & Nencioni, L. (2018). A polyphenol rich extract from *Solanum melongena* L. DR2 peel exhibits antioxidant properties and anti-herpes simplex Virus Type 1 Activity In Vitro. *Molecules*, 23(8), 1–25.
- Rocha Martins, L. R., Brenzan, M. A., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P., Nakamura, T. U., Ranieri Cortez, L. E., & Garcia Cortez, D. A. (2011). In vitro antiviral activity from *Acanthospermum australe* on herpesvirus and poliovirus. *Pharmaceutical Biology*, 49(1), 26–31.
- Roizman, B., Carmichael, L. E., Deinhardt, F., de- The, G., Nahmias, A. J., Plowright, W., & Wolf, K. (1981). Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. *Intervirology*, 16(4), 201–217.
- Roizman, Bernard, Aurelian, L., & Roane, P. (1963). The multiplication of *Herpes simplex* virus. I. The programming of viral DNA duplication in HEp-2 cells. *Virology*, 2(2), 482–498.
- Roizman, Bernard, & Zhou, G. (2015). The 3 facets of regulation of *Herpes simplex* virus gene expression: a critical inquiry. *Virology*, 176(0), 562–567.
- Sands, J., Auperin, D., & Snipes, W. (1979). Extreme sensitivity of enveloped viruses, including *Herpes simplex*, to long-chain unsaturated monoglycerides and alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(1), 67–73.
- Santoyo, S., Plaza, M., Jaime, L., Ibañez, E., Reglero, G., & Señorans, F. J. (2010). Pressurized liquid extraction as an alternative process to obtain antiviral agents from the edible microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8522–8527.
- Schneider, S., Reichling, J. urgen, Stintzing, Florian Messerschmidt, S., Meyer, U., & Schnitzler, P. (2010). Anti-herpetic properties of hydroalcoholic extracts and

pressed juice from *Echinacea pallida*. *Planta Medica*, 76(3), 265–272.

- Schmidtke, M., Schnittler, U., Jahn, B., Dahse, H. M., & Stelzner, A. (2001). A rapid assay for evaluation of antiviral activity against coxsackie virus B3, influenza virus A, and *Herpes simplex* virus type 1. *Journal of Virological Methods*, 95(1–2), 133–143.
- Sebastianoa, M., CHastel, O., Thoisy, B., Eens, M., & Costantini, D. (2016). Oxidative stress favours herpes virus infection in vertebrates : a meta-analysis. *Current Zoology*, 62(March), 325–332.
- Sharma, M., Anderson, S. A., Schoop, R., & Hudson, J. B. (2009). Induction of multiple pro-inflammatory cytokines by respiratory viruses and reversal by standardized *Echinacea*, a potent antiviral herbal extract. *Antiviral Research*, 83(2), 165–170.
- Shi, S., Huang, K., Zhang, Y., Zhao, Y., & Du, Q. (2007). Purification and identification of antiviral components from *Laggera pterodonta* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*, 859(1), 119–124.
- Snipes, W., Person, S., Keller, G., Taylor, W., & Keith, A. (1977). Inactivation of lipid-containing viruses by long-chain alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 11(1), 98–104.
- Spear, P. G. (1993). Entry of alphaherpesviruses into cells. *Virology*, 4, 167–180.
- Summerfield, A., Keil, G. M., Mettenleiter, T. C., Rziha, H. J., & Saalmüller, A. (1997). Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. *Antiviral Research*, 36(1), 55–62.
- Tareq, M., Khan, H., Ather, A., Thompson, K. D., & Gambari, R. (2005). Extracts and molecules from medicinal plants against *Herpes simplex* viruses, 67, 107–119.
- Thompson, K. D. (1998). Antiviral activity of Viracea ® against acyclovir susceptible and acyclovir resistant strains of *Herpes simplex* virus. *Antiviral Research*, 39(1), 55–61.
- Torres, C., Domínguez, M., Carbonari, J., Sabini, M., Sabini, L., & Zanon, S. (2011). Study of antiviral and virucidal activities of aqueous extract of *Baccharis*

- articulata* against Herpes suis virus. *Natural Product Communications*, 6(7), 993–994.
- Tsuchiya, Y., Shimizu, M., Hiyama, Y., Itoh, K., Hashimoto, Y., Nakayama, M., & Morita, N. (1985). Antiviral activity of natural occurring flavonoids in vitro. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, (43), 2091.
- Uzuncar, S. (2016). Evaluation of in vitro antiviral activity of *Centaurea kotschyi* var. *Decumbens* extracts against Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1). *International Journal of Scientific and Technological Research*, 2(2), 20–28.
- Valadares, Y. M., Brandão, G. C., Kroon, E. G., & Souza, J. D. (2009). Antiviral activity of *Solanum paniculatum* extract and constituents. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 64(11–12), 813–818.
- Venturi, C. R., Bordignon, S. A. D. L., Roehe, P. M., Montanha, J. A., Cibulski, S. P., & Gosmann, G. (2018). Chemical analysis and antiviral activity evaluation of *Baccharis anomala*. *Natural Product Research*, 32(16), 1960–1962.
- Vimalanathan, S., Kang, L., Amiguet, V. T., Arnason, J. T., Hudson, J., Vimalanathan, S., & Arnason, J. T. (2005). *Echinacea purpurea*. Aerial parts contain multiple antiviral compounds. *Pharmaceutical Biology*, 43(9), 740–745.
- Visintini Jaime, M. F., Redko, F., Muschietti, L. V., Campos, R. H., Martino, V. S., & Cavallaro, L. V. (2013). In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. *Virology Journal*, 10, 1–10.
- Wacker, A., & Hilbig, W. (1978). Virushemmung mit *Echinacea purpurea*. *Planta Medica*, 33(1), 89–102.
- Weller, S. K., & Coen, D. M. (2012). *Herpes simplex* viruses: Mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9).
- Zanon, S., & Rovera, M. (1998). Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. *Revista Latinoamericana De Microbiologia-Mexico*, 41(2), 59–62.
- Zheng, K., Xiang, Y., Wang, X., Wang, Q., Zhong, M., Wang, S., & Wang, Y. (2014). Epidermal growth factor receptor-PI3K signaling controls cofilin activity to facilitate *Herpes simplex* virus 1 entry into neuronal cells. *MBio*, 5(1), 1–15.

- Zhu, Q. C., Wang, Y., Liu, Y. P., Zhang, R. Q., Li, X., Su, W. H., & Peng, T. (2011). Inhibition of enterovirus 71 replication by chrysosplenetin and penduletin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *44*(3), 392–398.
- Ziyaeyan, M., Alborzi, A., Japoni, A., Kadivar, M., Davarpanah, M. A., Pourabbas, B., & Abassian, A. (2007). Frequency of acyclovir-resistant *Herpes simplex* viruses isolated from the general immunocompetent population and patients with acquired immunodeficiency syndrome. *International Journal of Dermatology*, *46*(12), 1263–1266.