



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias de la Salud
Carrera de Licenciatura en Farmacia**

**Descripción de la actividad antiviral de
Microcina J25 y Fragarina contra virus de
importancia sanitaria**

Nº 97

Yanina Lorena Rosenberg

Tutora: Mónica B. Wachsman

**Departamento de Investigación
Abril 2004**

A mis padres por su incondicional apoyo en este y todos mis emprendimientos.

A mi novio por estar a mi lado en cada momento, ayudándome siempre.

A mis compañeros de carrera porque con ellos el camino se me hizo más fácil.

A quien inspiro en mí este tipo de trabajo.

Agradecimientos.

- A la Dra. Mónica B. Wachsman por su gran dedicación y paciencia, por ayudarme y confortarme constantemente y por haber confiado en mí para hacer este trabajo. Mi especial agradecimiento por mostrarme el mundo de la virología más de cerca y por mantener siempre un excelente e incomparable trato. También le agradezco por la revisión crítica de este trabajo.
- A la Dra. Celia E. Coto por haberme dado la posibilidad de trabajar en el laboratorio de Virología del Departamento de Química Biológica, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires y por su trato tan cordial.
- A la Lic. Laura Talarico por su gran colaboración y ayuda.

Indice

Resumen abstract	7
Introducción	9
1- Antivirales	9
1.1- Generalidades	9
1.2- Mecanismo de acción	9
1.3- Búsqueda de nuevos antivirales	10
1.4- Características de un antiviral ideal	10
1.5- Aplicaciones clínicas de los antivirales	10
1.6- Antivirales de uso clínico	10
1.6.1- Inhibidores de la ADN polimerasa viral	10
1.6.2- Inhibidores de la transcriptasa reversa	11
1.6.3- Bloqueantes de los canales iónicos	13
1.6.4- Bloqueo de la adsorción y del desnudamiento del virión	13
1.6.5- Inhibidores de la proteasa viral	13
1.6.6- Oligonucleótidos específicos	13
1.6.7- Inhibidores de proteínas reguladoras	13
1.6.8- Interferón	13
1.7- Limitaciones de la quimioterapia antiviral	14
1.8- Mutantes resistentes	14
2- Virus	14
2.1- Virus Herpes Simplex	15
2.1.1- Características	15
2.1.2- Estructura del virión	15
2.1.3- Ciclo de multiplicación viral	15
2.1.4- Epidemiología	16
2.1.5- Sintomatología y tratamiento	16
2.2- Virus de la Poliomielitis	16
2.2.1- Características	16
2.2.2- Estructura del virión	16
2.2.3- Ciclo de multiplicación viral	16
2.2.4- Epidemiología	17
2.2.5- Sintomatología y tratamiento	17
2.3- Virus del Sarampión	17
2.3.1- Características	17
2.3.2- Estructura del virión	17
2.3.3- Ciclo de multiplicación viral	17
2.3.4- Epidemiología	18
2.3.5- Sintomatología y tratamiento	18
2.4- Virus de la estomatitis vesicular (VSV)	18
2.4.1- Características	18
2.4.2- Estructura del virión	18
2.4.3- Ciclo de multiplicación viral	18
2.4.4- Epidemiología	18
2.4.5- Sintomatología y tratamiento	18
2.5- Arnavirus	18
2.5.1- Características	18
2.5.2- Estructura del virión	19
2.5.3- Ciclo de multiplicación viral	19
2.5.4- Epidemiología	19
2.5.5- Sintomatología y tratamiento	19
3. Microcina J25 y Fragarina	20
3.1- Compuestos antivirales de origen natural	20
3.2- Péptidos antimicrobianos	20
3.2.1- Clasificación	20
3.2.2- Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos	22

3.3- Microcina J25	22
3.4- Fragarina	25
Objetivos	25
Materiales y Métodos	25
1- Medios de cultivo	25
2- Células	25
3- Virus	26
4- Compuestos ensayados	26
5- Obtención de los stocks virales	26
6- Ensayo de viabilidad celular	26
7- Ensayos antivirales	26
7.1- Titulación de la infectividad viral	26
7.2- Ensayo de inhibición del rendimiento viral	27
8- Actividad virucida	27
Resultados	27
1- Preparación de stocks virales	27
2- Evaluación del efecto de la MccJ25 y fragarina sobre la viabilidad celular	27
3- Evaluación de la actividad antiviral de la MccJ25 y fragarina	28
4- Evaluación de la actividad virucida de la Mcc J25 y fragarina	35
Discusión	36
Referencias	37
Abreviaturas	40

Resumen

Todas las especies animales y vegetales poseen ciertos mecanismos de defensa ante agentes extraños. Algunos de estos son secretados en respuesta a una agresión. Mientras que otros, como los compuestos aquí estudiados, son producidos en condiciones normales. La Microcina J25 es un ciclo péptido antibacteriano de 2.107Da producido por *Escherichia coli* AY25. La Fragarina es un compuesto de 306Da, también con actividad antimicrobiana, aislado de hojas de frutilla *Fragaria ananassa*.

En este trabajo, se describe una serie de ensayos en los cuales ambos compuestos muestran indicios de actividad antiviral contra virus Herpes simplex 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), virus de la estomatitis vesicular (VSV), poliovirus (PV), sarampión (SARV) y los arnavirus Junín (VJ) y Tacaribe (TAC) en células Vero. Esta actividad se observó, a través del ensayo de inhibición del rendimiento viral, a concentraciones muy por debajo de las citotóxicas. La microcina J25, con índices de selectividad mayores a 42,3 y 71,5, es el compuesto que mejor actividad antiviral manifestó contra PV y VSV respectivamente. La fragarina inhibió la replicación de SARV y HSV-2 mejor que la de los otros virus, aunque con menores índices de selectividad: 14,2 y 10 respectivamente. Ambos compuestos, inhibieron la multiplicación viral de forma dosis-dependiente y mostraron una acción antiviral no virucida.

Abstract

All animal and vegetal species possess several defense mechanisms against foreign agents. Some of these are secreted in response to an aggression. Whereas others, such as the ones studied here, are produced in normal conditions. Microcin J25 is an antibacterial cyclopeptide produced by *Escherichia coli* AY25. Fragarin is a compound of 306Da, also with antimicrobial activity, isolated from the leaves of the strawberry *Fragaria ananassa*.

In this paper, a series of assays are described in which both compounds show antiviral activity against Herpes simplex viruses type 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2), vesicular stomatitis virus (VSV), poliovirus (PV), measles virus (MV) and the arnaviruses Junín (VJ) and Tacaribe (TAC) in Vero cells. This activity was observed using the yield reduction assay, at concentrations much lower than cytotoxic ones. Microcin J25, with selectivity indexes higher than 42.3 and 71.5, is the compound with the best antiviral activity manifested against PV and VSV, respectively. Fragarin inhibited the replication of SARV and HSV-2 better than that of the other viruses, but with lower selectivity indexes: 14.2 and 10 respectively. Both compounds, inhibited the viral multiplication in a dose-dependent manner without virucidal effect.

Introducción

1- Antivirales.

1.1- Generalidades.

Los antivirales son aquellos compuestos capaces de inhibir una o varias etapas del ciclo de multiplicación viral dentro de la célula huésped. En la práctica se procura, para una quimioterapia selectiva, que una droga inhiba la replicación viral a concentraciones no tóxicas para el huésped. Sin embargo, el desarrollo de este tipo de drogas se encuentra obstaculizado por la dificultad que presenta el virus al utilizar la maquinaria intracelular para su replicación. La clave para una quimioterapia exitosa, sería entonces, la inhibición de la replicación viral sin afectar el funcionamiento de la célula huésped. Y de esta forma minimizar la aparición de efectos adversos.

La forma más efectiva de combatir las enfermedades virales es a través de vacunas. Pero la prevención no siempre es posible ya que hay enfermedades para las cuales no se han podido desarrollar las mismas. Es por eso que surge la necesidad de nuevas drogas antivirales.

En la actualidad, se dispone de un número reducido de drogas antivirales si se compara con la cantidad de antibióticos en el mercado [1]. A pesar de la gran cantidad de compuestos ensayados, la mayoría resultan tóxicos durante su uso in vivo. A este inconveniente se le suma la problemática del surgimiento de cepas resistentes por el uso de antivirales en tratamientos prolongados. Esto conlleva a la utilización de terapias combinadas así como a una acelerada y más diversificada búsqueda de nuevas drogas que eliminen o atenúen la enfermedad evitando el surgimiento de resistencias.

1.2- Mecanismo de acción.

El mecanismo de acción de los antivirales se centra en la inhibición de algún proceso esencial para la replicación viral que no involucre ningún paso del metabolismo celular. La adsorción, la penetración y el desnudamiento son eventos que no ocurren en células no infectadas. La transcripción y traducción del genoma viral y clivaje de proteínas precursoras mediadas por enzimas virales son también blancos para los antivirales. Por ejemplo, la inhibición de la proteasa codificada por HIV evita el clivaje del precursor gag (que contiene a las tres proteínas virales principales) y la posterior generación de viriones infecciosos [2]. En el cuadro 1 se muestran algunos ejemplos de drogas y sus respectivos blancos.

De acuerdo al mecanismo de acción específico de cada compuesto, los antivirales pueden ser clasificados en: compuestos que interactúan directamente con sus blancos de acción o compuestos que necesitan primero una activación intracelular. La amantadina, la rimantadina y el foscarnet actúan con sus blancos de acción sin necesidad de una activación previa. Por el contrario, los análogos de nucleósidos, como el aciclovir, necesitan ser activados mediante la fosforilación por quinasas celulares y/o virales para luego interactuar con sus blancos. A su vez, los análogos de nucleósidos pueden inhibir competitivamente la

Compuesto	Activación intracelular	Blanco de acción	Proceso inhibido
Aciclovir	Es fosforilado a monofosfato por la TK*1 y luego a formas di y tri fosfato por quinasas celulares.	ADN polimerasa viral	Replicación del ADN
Inhibidores de proteasa	Ninguna	Proteasa viral	Clivaje post-traducciona.
Zidovudina, inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa reversa	Es fosforilado a trifosfato.	Transcriptasa reversa	Transcripción reversa.
Rimantadina	Ninguna	Proteínas de membrana	Ensamblaje de los viriones.
Ribavirina	Es fosforilada a trifosfato por enzimas celulares	Varios	Procesamiento de los ARN transcritos.
Interferones	Ninguna	ARNm	Traducción
Foscarnet	Ninguna	ADN polimerasa viral	Replicación del ADN.

Cuadro 1. Blancos de acción. Ejemplos de drogas antivirales y sus respectivos blancos de acción.

elongación de la cadena de ADN o ser incorporados a la misma produciendo la terminación de esta cadena, interfiriendo de esta forma con la replicación viral.

1.3- Búsqueda de nuevos antivirales.

Durante los últimos años los métodos de búsqueda de drogas antivirales fueron evolucionando considerablemente. Las técnicas de screening, hoy en día, pueden lograr que se prueben cientos de compuestos contra un blanco específico en muy poco tiempo.

Una aproximación lógica al descubrimiento de nuevos antivirales sería aislar o sintetizar sustancias cuyo blanco se pueda predecir. Para esto, se podría utilizar como punto de partida la estructura de un sustrato de una enzima viral [3]. En la actualidad es posible conocer en detalle estas estructuras gracias a la cristalografía de rayos-x. Conociendo las estructuras primaria y secundaria de dicha enzima es posible predecir, mediante programas computacionales de modelado molecular, si cierto compuesto podría interactuar con la enzima. También, es posible saber de qué forma y las variables que se podrían modificar para optimizar no sólo la actividad antiviral del compuesto sino sus parámetros de solubilidad, hidrofobicidad, etc. De esta forma, se puede llegar a obtener una librería de compuestos análogos a una sustancia de origen natural, algunos de los cuales podrían resultar novedosos en la terapéutica.

La propuesta más reciente en la terapia antiviral es la utilización de compuestos basados en oligonucleótidos, así como también el uso de aquellos que puedan modular el sistema inmune [3].

1.4- Características de un antiviral ideal.

Para que una droga sea considerada para el tratamiento de una infección viral debe cumplir ciertos requisitos. La droga debe ser específicamente activa contra el virus target, inhibiendo algún paso esencial de su metabolismo y debe poder debilitar a las cepas resistentes que puedan surgir. Además, debe tener ciertos parámetros que permitan a la droga ser de alta biodisponibilidad oral, rápida penetración en los tejidos infectados y atóxica para las células normales y el organismo en general a corto y largo plazo. La droga debe ser transformada a su forma activa solamente en células infectadas, debe ser excretada sin ser metabolizada o sin generar metabolitos tóxicos, y tener baja frecuencia de administración. Por último, la droga debe tener bajo costo para que pueda estar disponible para toda la población. Todas estas características, entre otras, dificultan el descubrimiento de nuevas drogas efectivas para el tratamiento de las enfermedades virales.

1.5- Aplicaciones clínicas de los antivirales.

En la práctica la utilización de antivirales es determinada por las características de la enfermedad. Las enfermedades para las cuales no hay una vacuna disponible, incluyendo las enfermedades causadas por varios agentes etiológicos, son las que tienen prioridad en el desarrollo de drogas antivirales. También es importante encontrar drogas para el tratamiento de las reactivaciones de infecciones latentes, tales como el herpes simplex y zoster (a pesar de que de esta forma el virus no puede ser eliminado). Tampoco se deben olvidar aquellas enfermedades mortales, como la fiebre hemorrágica argentina y la rabia, para las cuales la existencia de una droga antiviral puede significar salvar vidas.

1.6- Antivirales de uso clínico.

A continuación se describen brevemente algunas de las drogas utilizadas para la quimioterapia antiviral y sus principales mecanismos de acción. En la figura 1 se muestran sus estructuras.

1.6.1- Inhibidores de la ADN polimerasa viral.

Muchos de los agentes antivirales utilizados en la terapéutica son análogos de nucleósidos, la mayoría de los cuales están dirigidos a los herpesvirus. Los primeros prototipos inhibían indiscriminadamente la síntesis de ADN viral y celular produciendo numerosos efectos adversos.

En 1977, Elion *et al*, desarrollaron una prodroga que depende de una enzima viral para su activación, llamada acilguanósina (aciclovir). La acilguanósina (9-(2-hidroxietoximetil)guanina), más conocida como aciclovir, es un derivado de guanina con una cadena lateral acíclica [4]. Su ventaja respecto de los primeros derivados de nucleósidos es que se requiere de la enzima viral, timidin quinasa (TK) para fosforilar a la acilguanósina intracelularmente a acilguanósina monofosfato (AG-P). Luego, la AG-P necesita de una quinasa celular dependiente de GMP para ser activada completamente a acilguanósina trifosfato (AG-PPP). Este, inhibe a la ADN polimerasa viral competitivamente y es incorporada al ADN, causando la terminación de la cadena. Esto es porque el aciclovir carece del grupo hidroxilo en el extremo 3' que se requiere para la elongación de la cadena. Debido a que la prodroga requiere la activación de una enzima viral, el aciclovir no es tóxico para células no infectadas.

Los virus Herpes simplex 1 y 2 son muy susceptibles al aciclovir. También lo es el virus de la varicela zoster (VZV) a mayores concentraciones. Otros virus humanos, deficientes en TK, son susceptibles al aciclovir en forma limitada debido a la producción de la acilguanósina monofosfato por la quinasa celular dependiente de GMP.

El aciclovir puede ser administrado por vía oral, por vía intravenosa o tópicamente como una crema acuosa. Se registraron mutantes resistentes al aciclovir in vivo y en cultivos celulares. Generalmente, la mutación se localiza en el gen codificante de la TK. Este mutante puede resultar deficiente en la producción de TK o puede tener modificada su especificidad por el sustrato, por lo que no puede fosforilar al aciclovir. Menos frecuentemente, se encuentra una mutación en el gen que codifica para la ADN polimerasa. Cabe resaltar que estos mutantes resistentes no son encontrados en pacientes con inmunidad normal. Por el contrario, en pacientes transplantados es fácil encontrar cepas resistentes [5].

Algunos derivados del aciclovir tienen mayor actividad contra HSV y VZV. Por ejemplo, el Valaciclovir, tiene mayor absorción oral.

El ganciclovir (9-(1,3-dihidroxi-2-propoxi)metilguanina) es un derivado del aciclovir y es la primera droga en ofrecer un tratamiento satisfactorio para la infección con citomegalovirus (CMV). El mecanismo de acción del ganciclovir es similar al del aciclovir, excepto que no produce terminación de cadena. Esta droga es principalmente utilizada para tratar infecciones severas por CMV tales como retinitis, colitis y neumonía en pacientes con SIDA y en pacientes transplantados. La droga se administra por vía intravenosa durante varias semanas, pero la enfermedad es recurrente con el retiro de la droga. Dada la alta toxicidad de la droga la droga se administra sólo en casos severos de individuos inmunocomprometidos.

La ribavirina (1-b-D-ribofuranosil-1,2,4-triazol-3-carboxamida, virazol) es un análogo de guanósina. No tiene licencia para uso general por su alta toxicidad. La droga, de amplio espectro antiviral contra virus ARN y ADN parecería tener un mecanismo de acción múltiple. La ribavirina inhibe a la enzima celular IMP deshidrogenasa y a la guanililtransferasa, sugiriendo una posible acción en caminos celulares críticos para el virus. Por ejemplo, inhibiendo la síntesis de ARN viral, induciendo la formación del CAP en el extremo 5' del ARN e interfiriendo en la elongación del ARN.

La administración oral e intravenosa de ribavirina reduce considerablemente la mortalidad por virus Lassa y Hantaan y tiene actividad contra los virus sincicial respiratorio, influenza A y B y HIV in vitro.

El foscarnet (fosfonoformato trisódico), un análogo de pirofosfato, inhibe a la ADN polimerasa de herpesvirus [6] y hepatitis B y a la transcriptasa reversa de HIV, bloqueando el sitio de unión de la enzima. La administración de foscarnet por vía tópica acelera la cura de las lesiones provocadas por herpes facial y genital recurrentes y por vía sistémica disminuye la progresión de la infección por citomegalovirus en pacientes inmunocomprometidos. A pesar de la selectividad del foscarnet para inhibir la ADN polimerasa celular y viral a altas y bajas concentraciones respectivamente, el compuesto tiende a la acumulación provocando toxicidad en los riñones. Por eso, esta droga sólo se administra en aquellos casos donde esta en juego la vida del paciente. La resistencia al foscarnet es debida a mutaciones en el gen de la ADN polimerasa viral.

La idoxiuridina (5-yodo-2'-deoxiuridina, IDU) y la trifluridina (5-trifluoro-2'-deoxitimidina, TFF) poseen una alta toxicidad (posee efectos mielosupresivos, mutagénicos y teratogénicos tras su administración sistémica) por lo que su uso está limitado al tratamiento por vía tópica. La trifluridina se utiliza en forma de gotas para tratar la queratitis herpética, mientras que la idoxiuridina se utiliza para tratar lesiones en la piel. Ambas drogas son inhibidoras de la timidilato sintetasa viral, reduciendo la síntesis de novo de dTTP.

La vidarabina (arabinosido de adenina, Vira-A) es un nucleósido de purina y fue el primer compuesto antiviral que se usó sistémicamente. Marcó un cambio en el tratamiento de la encefalitis herpética y el herpes neonatal, reduciendo la mortalidad y las secuelas neurológicas. Esta droga también se puede utilizar para el tratamiento de la queratitis herpética. Debido a la escasa hidrosolubilidad, la droga debe administrarse en grandes volúmenes por vía endovenosa provocando serios efectos adversos (temblor, ataxia, náuseas, vómitos y diarrea).

La vidarabina es fosforilada por quinasa celulares a la forma trifosfato inhibiendo a la ADN polimerasa viral. A pesar de que no se registraron mutantes resistentes en la clínica, en la actualidad, esta droga fue reemplazada por el aciclovir, que posee mayor eficacia.

1.6.2- Inhibidores de la transcriptasa reversa.

El primer compuesto aprobado para uso humano contra el HIV con suficiente actividad antiviral in vivo fue el AZT (3'-azido-2',3'-dideoximidina o zidovudina). El AZT, luego de ser fosforilado a su forma trifosfato, inhibe a la transcriptasa reversa de HIV por incorporación a la cadena creciente de ADN provocando su terminación. Además, el AZT monofosfato, compite por la TK, disminuyendo el pool intracelular de TTP. Debido a la persistencia indefinida del virus en las células, con esta droga sólo se suprime la replicación viral pero no se elimina el virus del organismo.

La gran cantidad de efectos adversos (dolor de cabeza, náuseas, insomnio, anemia y neutropenia, entre otros) puede conducir a la suspensión del tratamiento, reducción de las dosis o a la utilización de terapias combinadas con otro análogo de nucleósido, interferón u otros como inhibidores de proteasas.

Los primeros ensayos clínicos en 1986 dieron fuertes evidencias de mayor supervivencia y menor incidencia de enfermedades oportunistas en pacientes a los cuales se les había administrado la droga, así como también se produjo la recuperación de las células T helpers y reducción de los niveles de antígeno de HIV en sangre [4].

Se aislaron cepas resistentes con mutaciones en el gen que codifica para la transcriptasa reversa. Otros dideoxynucleósidos, tales como la dideoxicitidina y la dideoxiinosina no muestran resistencia cruzada con el AZT, por lo que terapias combinadas ayudarían a disminuir la aparición de mutantes resistentes.

Algunos inhibidores de la transcriptasa reversa no nucleosídicos disponibles son la nevirapina (Viramune®), efavirenz (Sustiva®) y delavirdina (Rescriptor®). Algunos de los nucleosídicos son: lamivudine or 3TC (Epivir®), stavudine o d4T (Zerit®), abacavir (Ziagen®), zalcitabine or ddC (Hivid®), didanosine or ddi (Videx®) y zidovudine or AZT or ZDV (Retrovir®).

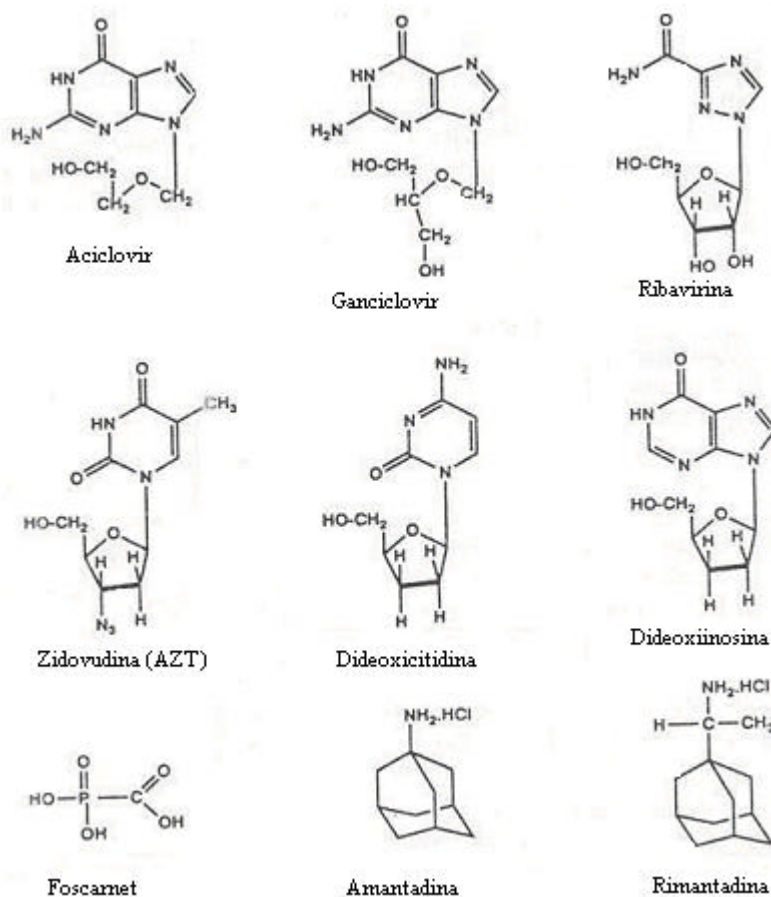


Fig. 1. Compuestos antivirales. Estructura de algunos de los compuestos antivirales usados en clínica.

1.6.3- Bloqueantes de los canales iónicos.

La amatadina (1-amadantanamina) inhibe la replicación del virus de la influenza A [4]. El blanco principal de esta droga es la proteína M2, que es un componente de la envoltura viral, que se supone es la encargada de estabilizar la hemaglutinina viral. Esta proteína forma un canal iónico transmembrana que sirve para reducir el gradiente de pH en endosomas acidicos. Y estos endosomas están involucrados en el desnudamiento de los viriones y en el transporte de nueva hemaglutinina hacia la membrana plasmática. La amantadina, aumenta el pH del endosoma, evitando que se produzca el cambio conformacional en la hemaglutinina requerida para la fusión de la envoltura viral con la membrana del endosoma para liberar ribonucleoproteínas del virión. La amantadina también evita que la hemaglutinina adquiera su conformación correcta para ser incorporada en la envoltura de los viriones emergentes.

La administración temprana de amantadina reduce la severidad de los síntomas en un 50%. Pero varios efectos adversos fueron registrados: falta de concentración, insomnio, ansiedad, mareos, etc.

La rimantadina (α -metil-1-adamantano-metilamina hidrocloreuro) posee menos efectos adversos que la amantadina y casi su misma eficacia, por lo que la rimantadina es la droga de elección.

Este tipo de compuestos puede servir como prototipo para aquellos otros virus que también poseen proteínas hidrofóbicas transmembrana de bajo peso molecular, tales como vpu de HIV o LMP del virus Epstein-Barr.

1.6.4- Bloqueo de la adsorción y del desnudamiento del virión.

La inhibición de las primeras etapas de la replicación viral pueden lograrse mediante el diseño de sustancias que imiten al receptor celular o al ligando viral [4]. Por ejemplo, la adsorción del HIV a su receptor (CD4) puede ser bloqueada por CD4 soluble o por un péptido sintético que corresponde al ligando de la glicoproteína viral de la envoltura gp120. El problema de estos imitadores de ligandos es que la saturación del receptor puede interferir con las funciones celulares.

Otro ejemplo de esto es el uso de sialiloligosacáridos que imitan al receptor de la hemaglutinina viral bloqueando la adsorción de los viriones a la célula huésped. Esto es en el caso de los virus influenza para los cuales se conoce la estructura tridimensional de las glicoproteínas de la envoltura.

1.6.5- Inhibidores de la proteasa viral.

Las proteasas, codificadas por los virus, cumplen la función de clivar proteínas para activación de enzimas, fusión de glicoproteínas de envoltura, maduración de viriones, etc. Algunos de los compuestos utilizados en clínica que inhiben a dichas proteasas son [2]: indinavir (Crixivan®), saquinavir (Invirase®), nelfinavir (Viracept®) y amprenavir (Agenerase®).

1.6.6- Oligonucleótidos específicos.

En la teoría, pequeños oligodeoxinucleótidos sintéticos complementarios con la secuencia del ARN viral deberían inhibir la expresión de los genes virales [4]. Cortas secuencias de ADN de una sola hebra demostraron actividad antiviral contra HIV, HSV e influenza virus en cultivos celulares. Pero en la práctica, aún se describen problemas de estabilidad y especificidad de los oligodeoxinucleótidos.

1.6.7- Inhibidores de proteínas reguladoras.

La función principal de las genes reguladores es controlar la expresión de otros genes. Por ejemplo, el producto protéico del gen tat de HIV se une específicamente a un elemento llamado TAR presente en el cDNA integrado de HIV y en todos los ARNm del mismo virus. Esto resulta en el aumento de la expresión de los genes de HIV, incluyendo al tat, produciendo un feedback positivo que permite la producción de un número mayor de viriones. Un compuesto que se pueda unir a la proteína tat o a la secuencia nucleotídica TAR podría resultar un efectivo inhibidor de la replicación del HIV [4].

1.6.8- Interferón.

Los interferones, descubiertos en 1957 por Isaacs y Lindemman [7], son productos celulares naturales de la infección viral y tienen amplio espectro contra todos los virus. Los primeros ensayos clínicos se realizaron con cantidades inadecuadas de interferones semipurificados que habían sido producidos por tratamiento de fibroblastos humanos con un paramixovirus. Sin embargo, en 1980 se clonó el gen para un interferón humano y se expresó en *Escherichia coli*. Desde entonces, las cantidades obtenidas de interferones son mayores y su costo es mucho menor.

Los interferones no son administrables por vía oral, por lo que se requiere su administración por vía intramuscular. Se observan efectos adversos tóxicos tales como fiebre, fatiga, mialgia, náuseas, vómitos, pérdida de peso, alopecia, sequedad bucal, neuropatía sensorial periférica reversible, mielosupresión y función hepática anormal en altas concentraciones durante períodos prolongados.

El tratamiento con interferón para hepatitis C resulta exitoso en el tratamiento a largo plazo pero la enfermedad reincide con el retiro de la droga. También se registraron casos en los cuales el tratamiento con interferón produjo una regresión en ciertos tipos de cáncer [4]. Por lo tanto, se espera que en un futuro no muy lejano se administren combinaciones de interferón con drogas antivirales y con drogas anticancerígenas.

1.7- Limitaciones de la quimioterapia antiviral.

El mayor problema de las drogas antivirales es la presencia de efectos tóxicos. Pero también existen otros inconvenientes. Por ejemplo, cuanto más selectiva sea una droga, más reducido es su espectro de acción. Además, la quimioterapia antiviral es imposible de llevar a cabo en el estado latente de un virus, por lo que este tipo de infecciones son, hasta el momento, imposibles de erradicar. Es importante detectar rápidamente la enfermedad para poder iniciar un tratamiento sin demoras y evitar mayores daños. Por último, existe el problema del surgimiento de mutantes resistentes, lo que impulsa la búsqueda de nuevos compuestos.

1.8- Mutantes resistentes.

Está evidenciado el surgimiento de mutantes resistentes para todos los compuestos con actividad antiviral específica [8]. Las cepas mutantes resistentes surgen tanto in vitro como in vivo durante el tratamiento antiviral, especialmente en las terapias de larga duración y en pacientes inmunocomprometidos. Generalmente, la resistencia es el resultado de una mutación en el gen que codifica para la proteína blanco de la droga. La sensibilidad de una droga puede ser analizada por crecimiento de una cepa en un cultivo celular en presencia de diluciones seriadas del compuesto. La indicación de resistencia a la droga a través de este ensayo durante su desarrollo es un hecho que puede frenar la fase clínica de investigación.

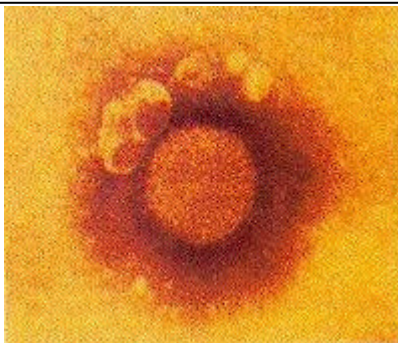
La emergencia de mutantes resistentes se diferencia entre los distintos grupos de virus. Para determinar de la resistencia se debe analizar la frecuencia de mutación, el estado de bienestar del virus y la potencia de la droga. Las cepas mutantes existen aún antes de empezar el tratamiento, sólo que dicho tratamiento alienta el dominio de las cepas mutantes sobre la población viral. Dado que la ARN polimerasa carece de prueba de lectura, los virus ARN tienen mayor frecuencia de mutación que los virus ADN. A esto se le puede adicionar el hecho de administrar drogas inmunosupresivas, que pueden incrementar el riesgo de resistencia como resultado de una mayor replicación.

Una droga poco potente permite la replicación viral con un lento desarrollo de resistencia. Mientras que una droga más potente va a inducir resistencia más rápidamente, a menos que se inhiba la replicación completamente [8].

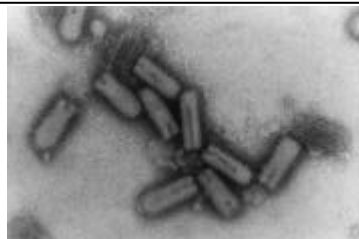
Los procedimientos a seguir tras el surgimiento de resistencias está determinado por la evolución y tipo de enfermedad, el estado físico del paciente y la droga administrada, entre otras cosas. Pero generalmente suelen aumentarse las dosis orales en primera instancia para luego pasar a la administración intravenosa del medicamento, cambio de la droga o combinación de terapias [9].

2- Virus

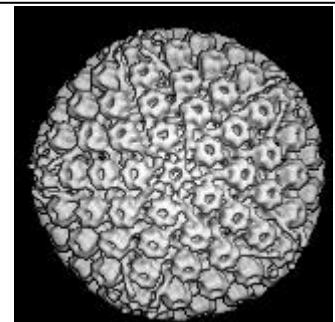
VIRUS NO ENVUELTOS.



Arenaviridae
Su genoma consiste en ARN simple cadena



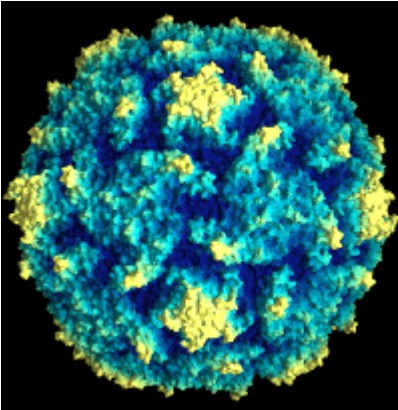
Rhabdoviridae
Su genoma consiste en ARN simple cadena



Herpesviridae.
Su genoma consiste ADN doble cadena.

Paramixoviridae
Su genoma consiste en ARN simple cadena.

VIRUS NO ENVUELTOS.



Picornaviridae.

Su genoma consiste en
ARN simple cadena.

Fig 2. Composición genómica de los virus utilizados en este trabajo.

2.1- Virus Herpes Simplex:

2.1.1- Características.

El virus herpes simplex pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*. Esta familia incluye numerosos virus patógenos para el hombre como el herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2), el herpesvirus B, el virus varicela-zoster (VZV), el citomegalovirus (subfamilia *betaherpesvirinae*) y el virus Epstein-Barr (subfamilia *Gammaherpesvirinae*) [10].

Existen dos tipos virales dentro del género herpes simplex: HSV-1 y HSV-2. El HSV-1 está asociado con las lesiones orales y oculares y se transmite a través de secreciones orales y respiratorias. En cambio, el HSV-2 está asociado a lesiones genitales y anales y su transmisión es fundamentalmente sexual.

La infección inicial del virus se produce a través de una mucosa erosionada (labios, boca, ojo, genitales) o de la piel, donde comienza la multiplicación. Luego, el virus difunde a los ganglios linfáticos donde se produce la multiplicación secundaria. La latencia viral explica las recurrencias de las lesiones, que en este caso está asociada a las neuronas de los ganglios trigémino en la zona facial y sacra en la zona genital. Dado que el virus alcanza otras células epiteliales por diseminación célula-célula (es decir, por fusión de membranas de dos células contiguas), este no contacta el medio extracelular evitando encontrarse con los anticuerpos. Pero el hecho de que hayan anticuerpos evitan la diseminación viral por lo que las recurrencias de las lesiones se llevan a cabo en el lugar de la infección original [10]. Las recurrencias están asociadas a factores físicos (lesiones cortantes, irradiación solar) y factores emocionales (disgustos, stress). La reincidencia suele ser de evolución más corta y sintomatología moderada con completa regeneración del epitelio.

2.1.2- Estructura del virión.

El virión es esférico y envuelto de aproximadamente 150nm de diámetro. Contiene una cápside icosaédrica con 162 capsómeros, rodeados por un tegumento amorfo. Dentro de la cápside se encuentra un "core" electrodenso que contiene el genoma viral constituido por ADN lineal doble cadena (codifica para más de 70 proteínas en la célula infectada). El genoma de HSV que comprende aproximadamente 150 Kpb está compuesto por dos secuencias L (larga) y S (corta). La envoltura presenta espículas en su superficie.

2.1.3- Ciclo de multiplicación viral.

La glicoproteína de la envoltura gC se une a los residuos heparan sulfato que se encuentran en la superficie celular. La glicoproteína gD es también una mediadora de la unión a receptores celulares promoviendo la penetración viral por fusión pH dependiente de la envoltura viral con la membrana plasmática, proceso en el que, además, estarían involucradas las glicoproteínas gB y gH.

Proteínas del tegumento son liberadas. Una de ellas suprime la síntesis de proteínas celular, y la cápside es transportada a un poro nuclear donde el ADN viral es liberado y se circulariza. Otra proteína que se libera

al tegumento activa la transcripción de los 5 genes a. Esta proteína viral se asocia a dos proteínas celulares para formar un complejo multiprotéico que reconoce la secuencia en la región promotora del ADN viral disparando la transcripción mediante la polimerasa celular. Los a ARNm son transportados al citoplasma donde son traducidos a proteínas regulatorias de la expresión de los genes tardíos. Una proteína a inicia la transcripción de los genes b, que codifican para enzimas requeridas para incrementar el pool de nucleótidos y otras necesarias para la replicación viral.

El genoma viral se replica por un mecanismo circular. Siguiendo el ciclo de replicación, algunas proteínas b inducen la transcripción de los genes g, que al ser traducidos se generan proteínas requeridas para la formación del virión. El ensamblaje de proteínas de la cápside forman una cápside vacía en donde luego se empaqueta el ADN viral [11]. La adquisición de la envoltura se puede explicar de dos formas. La cápside dejaría el núcleo recubierta con la membrana nuclear interna y el virus sería transportado a golgi para maduración de proteínas y posterior liberación por exocitosis. O el virus perdería la envoltura de la membrana nuclear al fusionarse con el retículo endoplasmico y adquiriría una nueva envoltura de la membrana de golgi donde estarían insertas las glicoproteínas virales maduras. Finalmente, serían liberadas por exocitosis.

2.1.4- Epidemiología.

El huésped natural del HSV es el hombre. La prevalencia de la infección por virus herpes simplex es aproximadamente del 100% en la edad adulta. Es importante resaltar que existe liberación de virus infeccioso en mucosas y/o epitelios que no evidencian lesión alguna. De esta forma el virus se transmite entre personas aparentemente sanas.

2.1.5- Sintomatología y tratamiento.

Se desarrolla cierta picazón y ardor antes de la reincidencia del HSV en la zona donde se produjo la infección inicial y donde luego aparecen las lesiones vesiculares con alto contenido vírico, úlceras y costras. Las lesiones varían su gravedad de acuerdo al lugar de la infección: mucosa oral-respiratoria, mucosa genital, queratoconjuntivitis y encefalitis.

El aciclovir es el tratamiento de elección para esta viremia. Su mecanismo de acción ya fue descrito en otra sección anterior.

Desafortunadamente, todavía no existe ninguna vacuna aprobada para su utilización. Pero se encuentran en fases de desarrollo vacunas basadas en glicoproteínas de la envoltura.

2.2- Virus de la poliomielitis.

2.2.1- Características:

El virus de la poliomielitis (PV) pertenece al género *Enterovirus* que a su vez está clasificado dentro de la familia *Picornaviridae* (que incluye también *Rhinovirus* y *Hepatovirus*). Presenta tres serotipos: poliovirus 1, 2 y 3. Estos virus se multiplican en el tracto intestinal donde el pH ácido les resulta óptimo.

La poliomielitis o parálisis infantil es una infección aguda viral y el curso de la misma puede evolucionar de diversas formas: asintomático, abortiva y enfermedad paralítica [12]. El virus se transmite por vía oral, aérea y fecal de un humano infectado durante el final del período de incubación, todo el período de invasión, de estado y de convalecencia. El virus llega al organismo por la mucosa orofaríngea, siendo la replicación de mayor intensidad en las amígdalas y placas de peyer del ileon. De allí, pasan a los ganglios linfáticos cervicales y mesentéricos alcanzando la circulación sistémica provocando una viremia transitoria o viremia menor. Al alcanzar otros tejidos se produce la viremia secundaria y es cuando comienzan las manifestaciones clínicas.

2.2.2- Estructura del virión:

El virus de la poliomielitis posee una cápside proteica desnuda de estructura icosaédrica y diámetro de aproximadamente 25nm, formada por 32 capsómeros. Contiene 4 proteínas estructurales con 60 copias de cada una en el virión. El genoma consta de una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva de 7,2 a 8,4 Kpb.

2.2.3- Ciclo de multiplicación viral:

El receptor celular para los poliovirus es un miembro de la familia de inmunoglobulinas. Luego de la adsorción, penetración y desnudamiento sucede la replicación del ARN. Esta comprende la síntesis de un ARN complementario que sirve como templado para la síntesis de ARN genómico, que a su vez sirve como ARNm y se traduce a un gran polipéptido que incluye a todas las proteínas virales. Este polipéptido se cliva

autocatalíticamente a los intermediarios P1, P2 y P3. P1 es, a su vez, clivada para dar VP0, VP1 y VP3 y finalmente las cuatro proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4. La región P2 codifica para dos proteínas no estructurales y P3 para proteínas requeridas para la replicación. La terminación de la traducción se produce gracias a una proteasa que inactiva al complejo que es necesario para unir ARNm a los ribosomas. La replicación y el ensamblaje ocurre en el citoplasma y el nuevo virión se libera por lisis celular.

2.2.4- Epidemiología:

El reservorio de la enfermedad es el humano exclusivamente. Se presenta una prevalencia estacional para los meses de temperaturas cálidas en climas templados. La letalidad es de entre el 2 y el 20% para la enfermedad parálitica.

El serotipo 1 es el agente causante de poliomielitis más frecuente en la actualidad. El tipo 2 es el serotipo más controlado mediante vacunación por lo que su presencia en la población es un indicador de la falta de eficiencia en los planes de inmunización.

2.2.5- Sintomatología y tratamiento:

La enfermedad consta de un período de incubación de 3 a 6 días, un período de estado con sus respectivas complicaciones tales como insuficiencia respiratoria, hipertensión arterial, úlceras y atrofia muscular progresiva entre otras y un último período de convalecencia.

La poliomielitis no tiene un tratamiento específico por lo que es de suma importancia tomar medidas de prevención. La vacuna a virus inactivado o Salk, de administración intramuscular, se utiliza desde 1955 (actualmente, sólo para embarazadas y personas inmunocomprometidas). La vacuna oral trivalente con virus atenuado se administra desde 1964 a los 2, 4 y 6 meses de edad y se refuerzan las dosis a los 18 meses y 6 años de edad. Esta vacuna está incluida en el Programa Ampliado de Inmunizaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y en el Calendario Nacional.

2.3- Virus del Sarampión

2.3.1- Características.

El virus del sarampión (SARV) pertenece a la familia de los *Paramixoviridae*, que a su vez está dividida en dos subfamilias: *Paramixovirinae* y *Peumovirinae*. La subfamilia *Paramixovirinae* esta formada por dos géneros: Paramixovirus y Morbillivirus. Dentro de este último género se encuentra el virus del Sarampión, que tiene un solo tipo antigénico.

El sarampión es una enfermedad infecciosa aguda muy contagiosa predominante en los niños. Cursa con rinitis, conjuntivitis, bronquitis, exantema característico y exantema eritematomaculo-papular morbiliforme generalizado. El reservorio del virus es humano exclusivamente y dicho virus es transmisible durante el último período de incubación, el período de invasión y los primeros días de estado por vía aérea y contacto directo.

El virus penetra en el hombre por la mucosa respiratoria y/o conjuntival y se multiplica a nivel epitelial. La infección se extiende a los ganglios linfáticos donde continúa su replicación y constituye la viremia primaria, durante el cual el virus se disemina en los leucocitos y alcanza el sistema reticuloendotelial. La necrosis de las células reticuloendoteliales provoca reinvasión a leucocitos produciendo la viremia secundaria. El exantema se presenta junto con los anticuerpos específicos. Una característica de las lesiones son las células multinucleadas que se forman por acción de la proteína fusionante [13].

2.3.2- Estructura del virión.

El sarampión es un virus esférico, pleomórfico de un diámetro entre 120 y 170 nm. El ácido nucléico consiste en un ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado.

La nucleocápside es una ribonucleoproteína que presenta simetría helicoidal y 18nm de diámetro. Está constituida por tres proteínas estructurales, de las cuales una es la ARN polimerasa. La envoltura es una bicapa lipídica derivada de la célula huésped. En la envoltura se encuentran espículas de 10 nm constituidas por dos glicoproteínas transmembrana. Algunas de estas espículas presentan actividad de hemaglutinina. Otro grupo de espículas está formado por la proteína fusionante de membrana.

2.3.3- Ciclo de multiplicación viral.

La adsorción del virus a la superficie celular se debe a la función hemaglutinina de una espícula de envoltura. La penetración se produce por fusión mediada por la glicoproteína F de membrana. La transcripción se produce en el citoplasma utilizando la ARN polimerasa viral. El genoma se transcribe a ARN positivo y este se comporta como ARNm, que luego se traduce a proteínas específicas. Hay varios ARNm que luego se traducen. La nucleocápside helicoidal se ensambla y el virus se libera por gemación.

2.3.4- Epidemiología.

El sarampión es una enfermedad prevenible por vacunación. La prevalencia de la enfermedad es durante los meses de temperaturas más bajas. La mayor incidencia se registra entre los 0 y 9 años de edad aunque cualquier grupo de edad es susceptible a la infección a menos que haya sido vacunado o ya haya contraído la enfermedad.

2.3.5- Sintomatología y tratamiento.

El período de incubación dura aproximadamente 10 días y el de invasión 3. Este último período comienza bruscamente con alta temperatura, y triple catarro (conjuntival, nasal, faringolaringo-traqueobronquial). Al final de este período se observan manchas de Koplik, que contienen antígenos y nucleocápsides virales. El período de estado dura aproximadamente 6 días y se inicia con la aparición del exantema y pico febril. Algunas de las complicaciones pueden ser neumonía, diarrea, meningoencefalitis y otras. El período de convalecencia dura entre 2 y 4 semanas.

El sarampión no tiene tratamiento específico. En las formas no complicadas el tratamiento es higiénico-dietético y sintomático. La vacuna antisarampionosa está preparada con virus atenuado cultivado en células de embrión de pollo y se administra por vía subcutánea o intramuscular. Esta vacuna está incluida en el Programa Ampliado de Inmunizaciones de la OMS y en el Calendario Nacional y se aplica a los 12 meses de edad.

2.4- Virus de la estomatitis vesicular (VSV).

2.4.1- Características.

El virus de la estomatitis vesicular pertenece al género *Vesiculovirus*, dentro de la familia *Rhabdoviridae*. Esta familia también comprende al género *Lyssavirus*, dentro del cual se encuentra el virus de la rabia.

El VSV es zoonótico y se puede transmitir al hombre a partir de fluidos vesiculares y tejidos infectados de animales, pero no hay medidas aplicadas para evitar la infección [14].

2.4.2- Estructura del virión.

Los virus de esta familia miden aproximadamente 70 nm de ancho y 170 nm de largo y consisten en una envoltura lipídica con glicoproteínas insertas alrededor de una nucleocápside helicoidal que le confiere a los virus una forma de bala característica. El ácido nucleico es una ARN de cadena simple, de polaridad negativa, de aproximadamente 11-12kb.

2.4.3- Ciclo de multiplicación viral.

Los viriones se unen a receptores celulares vía la glicoproteína G, entra la célula por endocitosis y se desnudan, liberando la nucleocápside al citoplasma. La transcripción comprende 5 ARNm monocistrónicos: N (nucleoproteína), P (proteínas no estructurales), M (proteínas de la matriz), G (glicoproteínas) y L (ARN polimerasa). Ambas cadenas de polaridad opuesta se unen a nucleoproteínas pero sólo la de polaridad negativa se asocia con M para disparar la salida de los viriones a través de las zonas de la membrana plasmática que posee la glicoproteína G.

La replicación del VSV causa una citopatología rápida, posiblemente debido a la inhibición de la transcripción del ARNm celular por la proteína M.

2.4.4- Epidemiología.

Los reservorios son los animales como ganado y caballos pero es transmisible al hombre. Los casos reportados en el hombre son debido a descuidos durante brotes en el ganado.

2.4.5- Sintomatología y tratamiento.

La enfermedad en humanos es semejante a la influenza, presentando fiebre, escalofríos y dolor muscular. La enfermedad se resuelve sin complicaciones a los 7 o 10 días. No hay medidas de prevención desarrolladas para los humanos. El tratamiento es exclusivamente sintomatológico.

2.5- Arenavirus.

2.5.1- Características.

La familia *Arenaviridae* se divide en dos grupos: Arenavirus del Viejo Mundo, que incluye a los virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM), virus Lassa, Mopeia, Mobala, etc, aislados en el continente africano y los Arenavirus del Nuevo Mundo o complejo Tacaribe que incluye a los virus Junín (VJ), Tacaribe (TAC), Machu-

po, Pichindé, Guanarito, etc, aislados en el continente americano [15].

La fiebre hemorrágica argentina (FHA), producida por el virus Junín, es una enfermedad endémica del área central de la Pampa Húmeda. Causa infección persistente en roedores con eliminación del virus en orina [16]. Para que el hombre se infecte debe estar en íntimo contacto con el roedor. El huésped natural del virus Junín son los roedores *Calomys musculus* y *C. Laucha* pero otros roedores también pueden infectarse. La patología está delimitada al sistema circulatorio produciendo hemorragias, trombocitopenia, leucopenia, hemoconcentración, proteinuria, hipotensión y a veces muerte por shock hipovolémico.

El virus Tacaribe es el único arnavirus que fue aislado de murciélagos (*Artibeus sp.*). Este virus no es patógeno para el hombre.

2.5.2- Estructura del virión (de arnavirus)

Las partículas virales son redondeadas, ovals o pleomórficas, con un diámetro de 50-300 nm. El «core» exhibe una zona clara conteniendo un número variable de gránulos semejantes a ribosomas. La envoltura, cubierta por espículas, se forma de la membrana plasmática celular. El genoma viral comprende dos segmentos de ARN lineales de 8,2 (L) y 3,4 (S) Kb respectivamente, cada uno de los cuales forman un círculo por uniones puente de hidrógeno en sus puntas. La mayor parte del genoma es de polaridad negativa pero la mitad 5' del segmento S y una pequeña secuencia en el 5' del L tienen polaridad positiva. El segmento S codifica para las proteínas estructurales nucleoproteína N y glicoproteína precursora de glicoproteínas G1 y G2, que conforman las espículas de la envoltura.

2.5.3- Ciclo de multiplicación viral

Luego de la entrada del virión a la célula y su desnudamiento, el ARNm que codifica para la nucleoproteína N es transcrito por la transcriptasa viral desde el extremo 3' negativo del segmento S. Lo mismo ocurre con el segmento L. La traducción de las proteínas N (nucleoproteína) y L (polimerasa) se requieren antes de la replicación viral, que a su vez requiere la síntesis de copias complementarias completas de ambos segmentos. Recién después, se pueden transcribir la proteína G y la proteína Z (que une zinc) del otro extremo de los segmentos S y L, respectivamente. Luego de la glicosilación y clivaje de la proteína G, los viriones brotan a través de la membrana plasmática [17].

2.5.4- Epidemiología.

El virus penetra a través de lesiones en la piel o por inhalación. La FHA es una enfermedad ocupacional, que afecta a adultos dedicados a la cosecha del maíz. Por lo tanto, es una enfermedad estacional, prevaleciendo en los meses de Abril, Mayo y Junio, durante la época de cosecha. La mortalidad por infección con el virus Junín, sin tratamiento específico es en promedio un 13%.

2.5.5- Sintomatología y tratamiento.

La infección del hombre con un arnavirus puede producir desde síntomas parecidos a los de la influenza hasta fiebre hemorrágica, pasando por meningitis. Algunos de los síntomas incluyen: algias, mareos, constipación, dolor retro-ocular, náuseas, insomnio, vómitos, tos, dolor de garganta y fotofobia. Y entre los signos se encuentran: adenopatías axilares o inguinales, petequias, halo congestivo en encías, hipotensión arterial, halitosis, adenopatías cervicales y encías sangrantes a la presión. El período de incubación dura entre 1 y 2 semanas y es cuando la replicación viral ocurre en diversos órganos. La fiebre hemorrágica causada por estos tipos de virus parece producirse porque la coagulación intravascular diseminada no se produce hasta la fase terminal de la enfermedad. En la infección con virus Junín, es prominente el sangrado con trombocitopenia severa.

La prevención de la FHA se basa en el control de los roedores, aunque esta tarea se dificulta en zonas rurales. El curso de la enfermedad es modificable por administración de plasma de convaleciente dentro de la primera semana de la enfermedad. La ribavirina es la única droga de amplio espectro antiviral que se ensayó contra el virus Junín en animales y humanos [18]. A pesar de resultar eficaz, el compuesto no está en uso por su alta toxicidad.

Actualmente, en nuestro país, está aprobada una vacuna a virus vivo atenuado llamada Candid 1, que presenta mutaciones en el extremo amino terminal del precursor de las glicoproteínas (GPC), región correspondiente a la glicoproteína madura G1, una vez clivado el receptor. Esta vacuna demostró ser altamente eficaz [19].

3- Microcina J25 y Fragarina.

3.1- Compuestos antivirales de origen natural.

Debido a la creciente demanda de compuestos antivirales, ya sea por la necesidad de curar pandemias como el SIDA o por el surgimiento de resistencias, la comunidad científica internacional está centrando su atención en compuestos de origen natural.

Está demostrado que en el mundo vegetal y animal existen compuestos con gran potencial como antimicrobianos [20]. Muchos de ellos aún no pudieron ser aislados ni muchos otros identificados. Por ejemplo, los brasinosteroides son un grupo nuevo de esteroides aislados de plantas, en donde cumplen una función esencial para el normal crecimiento y desarrollo de las mismas. Este grupo de compuestos contiene un esqueleto en común: el 5-a-colestano. Los análogos obtenidos por variaciones de los grupos funcionales y su respectiva estereoquímica, mostraron una alta actividad antiviral contra el virus del sarampión [21] así como contra HSV-1, VJ, TAC y Pichindé [22]. También son alentadores los resultados contra HSV-2 [23]. Para los arnavirus, los índices de selectividad (razón entre concentración citotóxica cincuenta y concentración efectiva cincuenta) obtenidos fueron entre 10 y 18 veces más altos que el de la ribavirina para VJ. Cabe destacar que las modificaciones de los grupos funcionales también mostraron variaciones en la citotoxicidad [24].

Otro ejemplo de la gran variedad de compuestos presentes en la naturaleza es el de los galactanos sulfatados obtenidos de algas rojas *Gymnogongrus griffithsiae* y *Cryptonemia crenulata*. Estos compuestos también demostraron tener una alta actividad antiviral contra varias cepas de HSV-1, HSV-2 y virus dengue tipo 2 (DEN-2) [25].

El hombre, como parte del ecosistema, también posee en sus defensas compuestos con una alta actividad antimicrobiana. Varios investigadores reportaron la presencia de actividad inhibitoria contra varios virus en fluidos y tejidos corporales [26]. Aún muchos de estos compuestos no han sido identificados. Por ejemplo, en la saliva se encontraron desde peroxidases hasta péptidos antimicrobianos como las defensinas y lactoferrinas. Se sugiere la posible existencia de un inhibidor aún no descubierto en saliva ya que los compuestos identificados no inhiben al HIV lo suficientemente bien como para explicar la no transmisión del HIV a través de este fluido. [26, 27, 28].

La mayoría de los organismos multicelulares poseen péptidos antibióticos en su sistema inmune. [29]. Los péptidos maduros de humanos (LL-37) y de ratones (CRAMP) son codificados por genes similares (CAMP and Cnlp) y tienen estructuras α -helicoidales similares [30]. A pesar de las divergencias en sus secuencias y taxonomía, la mayoría de estos antibióticos comparten un mismo mecanismo de acción. Por todo esto, podría resultar de gran utilidad estudiar más profundamente esta clase de péptidos.

3.2- Péptidos antimicrobianos:

3.2.1- Clasificación.

Los péptidos antimicrobianos, ampliamente estudiados en la actualidad, pueden ser agrupados en dos grandes grupos [31]:

v Péptidos de síntesis no ribosomal: Este tipo de péptidos son producidos por bacterias y hongos. Generalmente, presentan aminoácidos modificados y son el resultado de la acción de complejos multienzimáticos constituidos por sintetasas que catalizan la formación de las cadenas peptídicas sin participación de los ribosomas. Las polimixinas, bacitracina y gramicidina S son algunos de los péptidos incluidos en este grupo.

Se demostró que la ciclosporina A, péptido producido por el hongo *Tolytlocadium inflatum* posee actividad inhibitoria contra HSV-1, HSV-2, VSV, HIV, citomegalovirus murino y vaccinia [32].

v Péptidos de síntesis ribosomal: Este tipo de péptidos tienen en común el hecho de tener carga neta positiva por ser ricos en arginina o lisina (existen algunos péptidos derivados de bacterias débilmente cargados) y ser anfipáticos. De acuerdo a su estructura también pueden ser agrupados en péptidos de estructura beta estabilizada por puentes disulfuro (por ejemplo: defensinas producidas por mamíferos, insectos, plantas), péptidos de estructura α -hélice (por ejemplo: cecropina, melitina, magainina, bomvinina) y péptidos de estructura extendida con predominio de uno o dos aminoácidos (por ejemplo: indolicidina y profenina). La falta de homología en las secuencias dificulta la predicción de la actividad de estos péptidos in vivo.

Los péptidos antimicrobianos también pueden ser agrupados de acuerdo a su lugar de obtención:

- Péptidos obtenidos de mamíferos: Generalmente, estos péptidos se encuentran en los gránulos de los neutrófilos, en las mucosas, en las secreciones de la piel o como productos de degradación de proteínas. Algunos de los péptidos antimicrobianos incluidos son lactoferrinas, indolicindinas, catelicidinas y defensinas. Las defensinas son los péptidos antimicrobianos de amplio espectro más estudiados dentro de este grupo. La familia de las defensinas contienen alfa y beta-defensinas. Su forma es similar, aunque las b-defensinas son más grandes y difieren en la posición de los residuos de cisteína. Los humanos producen seis a-defensinas diferentes y dos b-defensinas. Cuatro de las a-defensinas se encuentran en los gránulos de los neutrófilos, las otras dos en células intestinales. Las dos b-defensinas son producidas en varios epitelios gracias al estímulo de bacterias, productos bacterianos y a-TNF [33]. Algunas de las funciones descritas de las defensinas incluyen presentación de antígenos durante la inflamación, inhibición de fibrinólisis [34] y acumulación en paredes arteriales [35]. En varios trabajos se describió la actividad antiviral de las defensinas contra el HSV-1 y 2 y VSV, [36].

El pequeño tamaño y amplio espectro de estos péptidos hacen de estos compuestos posibles candidatos para desarrollo farmacéutico de nuevos medicamentos.

- Péptidos obtenidos de anfibios: Los péptidos bombinina, aislado de *Bombina variegata* y magainina de ranas *Xenopus sp* presentan una alta actividad antimicrobiana. La mayoría de estos péptidos forman a-hélices catiónica anfipáticas. Algunos péptidos derivados de magaininas demostraron su poder virucida contra el HSV-1 [37].

- Péptidos obtenidos de insectos: Los péptidos antimicrobianos de insectos pueden agruparse en dos grupos: los que son secretados dentro de los insectos o los que son secretados fuera del cuerpo de los mismos. Por ejemplo, las cecropinas se encuentran en la hemolinfa de *Hyalophora cecropia* [38] y la melitina se encuentra en el veneno excretado por las abejas de la especie *Apis mellifera*.

Se demostró que a bajas concentraciones la melitina inhibe la multiplicación in vitro de HIV-1, afectando selectivamente la expresión de los genes del virus [39]. También se encontró que un análogo de la melitina, diferenciado de esta por sólo algunas cargas, inhibe la fusión de las células inducida por HSV-1 y la dispersión del virus [40].

La cecropina es activa contra VJ, TAC y Pichindé y se sugiere que actuaría inhibiendo la morfogénesis y el egreso de partículas infecciosas de VJ al medio extracelular [41].

- Péptidos obtenidos de plantas: Las tioninas fueron los primeros péptidos antimicrobianos aislados de plantas. Son tóxicos para bacterias gram positivas y gram negativas, hongos y levaduras. También se aislaron defensinas de plantas que poseen mayoritariamente actividad antifúngica en lugar de actividad antimicrobiana [42].

Se encontró que un extracto de *Melia azerdach L.* contiene un glicopéptido llamado meliacina con marcada actividad antiviral contra PV, VSV, HSV, Junín, Pichindé y Tacaribe in vitro [43]. El mecanismo de acción involucraría la inhibición de algún paso final de la replicación [44].

- Péptidos virales: Los péptidos virales, fueron identificados por primera vez, como dos hélices altamente anfipáticas cargadas positivamente en la envoltura proteica de HIV-1. Estos péptidos y otros derivados de proteínas transmembrana de lentivirus tienen actividad antimicrobiana y citolítica [45].

- Péptidos aislados de bacterias: Péptidos antimicrobianos catiónicos y neutros son secretados por bacterias gram-positivas y gram-negativas. A estos compuestos se los llama bacteriocinas. Entre estos, se destacan la mersacidina de *Lactococcus*, que inhibe la síntesis de peptidoglicanos y las microcinas, de *Escherichia coli*, que inhiben la síntesis proteica.

Algunas bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas (lactocinas producidas por *Lactobacillus casei*) pueden inhibir el crecimiento de patógenos durante el procesamiento y fermentación de alimentos, por lo que esto sería de gran interés para la industria alimenticia [46]. Las bacteriocinas son liberadas por bacterias ácido lácticas junto con ácidos orgánicos. La incorporación de estas bacteriocinas como ingredientes biopreservativos en alimentos demostró su eficacia. Una opción aún más práctica y económica sería agregar directamente cultivos productores de bacteriocinas a las comidas [47]. Este hecho podría revolucionar al mercado alimenticio ya que en el mundo está prohibido el agregado de antibióticos a los alimentos. Pero este antibiótico carecería de toxicidad por provenir del propio organismo. También se demostró la eficiente actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2 salvaje y mutante (sin timidin quinasa) de un péptido denominado enterocina, producido por la bacteria *Enterococcus faecium* CRL35 [48].

3.2.2- Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos:

Muchos péptidos demostraron unirse a los lipopolisacáridos (u otros componentes en las bacterias gram-positivas) y permeabilizar la membrana externa para autopromover su entrada en bacterias gram-negativas. Como los péptidos catiónicos tienen tres ordenes de magnitud mayor que los cationes divalentes Ca^{+2} y Mg^{+2} , estos péptidos desplazan competitivamente a los iones y modifican las propiedades de la membrana externa [31]. La membrana presentaría rupturas que permitirían el pasaje de ciertas moléculas. Sin embargo, el mecanismo en que la bacteria se muere aún no está dilucidado. Otros estudios indicaron que las defensinas, cecropinas, bacteriocinas y indolicinas forman un canal voltaje dependiente permeable a los iones en la membrana lipídica. Hay otro mecanismo sugerido en el cual los péptidos saturan la superficie de la membrana antes de desestabilizarla.

A pesar de algunos estudios preclínicos realizados por pequeñas compañías de biotecnología, aún hay dudas respecto de los costos de producción, labilidad a proteasas in vivo y efectos adversos. De acuerdo a información provista por las diversas compañías farmacéuticas, un péptido llamado rBPI₂₁ [49], que se encuentra en fase clínica II/III sería útil en la terapia contra meningococemia.

3.3- Microcina J25.

Las microcinas son pequeños péptidos antibióticos producidos por enterobacterias [50]. En base a criterios bioquímicos, genéticos y de inmunidad cruzada se establecieron seis grupos de microcinas: A, B, C, D, E y H [51]. Una cepa de bacteria puede producir varias microcinas: la *Escherichia coli* LR05 produce microcina J25 y microcina L. Y cada microcina tiene distinta estructura y mecanismo de acción [52]. Recientemente, se aisló de heces de un lactante sano una cepa de *Escherichia coli*, AY25, productora de un antibiótico del tipo de las microcinas designado microcina J25 [53], creando un nuevo grupo de inmunidad: J. La MccJ25 es el primer péptido (PM = 2.107Da) de estructura circular producido por una bacteria gram-negativa descrito hasta el momento [53]. Las cepas productoras de MccJ25 están ampliamente distribuidas en el tracto intestinal [54].

Las microcinas también podrían reclasificarse en dos grupos. El primero estaría compuesto por las microcinas B17, C7 y J25, que son péptidos modificados post traducionalmente con masas moleculares menores a 5kDa. El segundo grupo estaría compuesto por las microcinas E492, Co1V y L, que son péptidos más largos, con masa molecular entre 8 y 10 kDa, que no sufren modificaciones post traduccionales y que son principalmente activas a través de la despolarización de membrana [52].

Esta comprobada la actividad antibiótica de la MccJ25 contra la familia *Enterobacteriaceae*, incluyendo varias cepas patógenas de *E. coli*, *Salmonella* y *Shigella* [55]. Pero esta actividad disminuye o desaparece en la forma lineal del péptido análogo sintético, indicando que la estructura circular es crucial para la bioactividad del péptido [56]. Asombrosamente, la MccJ25 linealizada por termolisina conserva su actividad antimicrobiana contra cepas de *E. coli* y *S. enteritidis* [57].

La síntesis de la microcina J25 (MccJ25) es óptima en medios mínimos y se induce al entrar las células en la fase estacionaria de crecimiento [58]. La producción de la MccJ25 está regulada por la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo, siendo inhibitoria una alta concentración del metal [59].

La MccJ25 posee un mecanismo de acción diferente a los otros péptidos antimicrobianos ya que interviene en la división celular, produciendo filamentación de las células sensibles. Esta filamentación, independiente del sistema SOS, no resulta de un daño al ADN o de interferencia en la replicación [53]. Se sugiere que el fenotipo filamentoso inducido por MccJ25 sería el resultado de la transcripción no apareada de los genes que codifican para las proteínas responsables de la división celular [60].

La producción de MccJ25 están determinadas por un plásmido de 4.8kb no conjugativo, de bajo número de copias [53]. Varios experimentos permitieron identificar tres genes de producción dentro del fragmento: mcjABC. El gen mcjD es el que provee inmunidad al antibiótico [61]. En el cuadro 2 se muestran las posibles características de las proteínas codificadas por los cuatro genes y sus posibles funciones [62].

La secuencia derivada del gen mcjD es homóloga a una variedad de proteínas de membrana de la familia de transportadores ABC. Esta similitud sugiere que la McjD funcionaría en el reflujo activo de la microcina a través de la membrana plasmática, lo que podría contribuir al mecanismo de inmunidad, al mantener la concentración interna de microcina por debajo de un nivel crítico.

La caracterización fenotípica y genética de mutantes resistentes permitió destacar a la proteína de membrana FhuA como el receptor de la MccJ25 [63]. La translocación requiere los productos de los genes *tonB*, *exb* y *sbmA*, localizados en la membrana plasmática [64]. La secuencia del gen estructural sugiere que la MccJ25 es sintetizada como un precursor de 58 aminoácidos (Fig. 3 y 4). El péptido cíclico activo está conformado por 21 residuos aminoácidos, lo que indica la remoción de 37 aminoácidos del péptido líder para producir una molécula madura [62]. Las proteínas McjB y McjC serían las encargadas de remover estos aminoácidos y de ciclar el péptido remanente o sólo ciclar el péptido previamente clivado por una

proteasa de origen cromosómico. La estructura tridimensional de la MccJ25, resuelta por RMN [68], indica una estructura muy particular. Todos los aminoácidos hidrofóbicos están expuestos hacia el exterior de la molécula (fig. 5).

Se aisló una mutante resistente a la MccJ25 con una sustitución en la posición 931 de la ARN polimerasa de una isoleucina por una treonina [60]. La resistencia residía en el gen rpoC, que codifica para la subunidad b' de la ARN polimerasa. Esto indicaría que el blanco de acción del péptido sería esta subunidad de la ARN polimerasa de *Escherichia coli* [60]. Se sugiere que la MccJ25 inhibiría la transcripción uniéndose al canal secundario de ARN polimerasa y bloquearía el acceso del sustrato al centro catalítico [65]. La MccJ25 disminuyó la síntesis de ARN tanto in vitro como in vivo [60]. La rifampicina, un antibiótico utilizado contra la tuberculosis, tiene un mecanismo de acción similar. También se encontraron mutantes resistentes de *Salmonella* tras haber sido expuesta a una cepa de *E. coli* que excretaba microcina 24. Otros estudios indicarían la acción bactericida de la MccJ25 por alteración de la permeabilidad de la membrana de *Salmonella newport* y la subsecuente disipación del gradiente, lo que iniciaría la inhibición de procesos como el consumo de oxígeno [67].

Una característica importante a destacar es que la microcina es de síntesis ribosomal y que no sufre modificaciones postraduccionales de sus aminoácidos, por lo que la obtención de análogos podría resultar sencilla. La proteína de membrana tolC estaría involucrada en la producción y secreción de la MccJ25 [69] (Fig 6.)

Algunas de las propiedades de la MccJ25 incluyen insensibilidad al tratamiento con proteinasa K, pepsina, quimiotripsina o proteasa V8 de *S aureus* y resistencia al autoclavado por más de 30 minutos a 120°C. La termolisina rompe la estructura circular exponiendo a los 21 aminoácidos. La MccJ25 tiene una solubilidad en agua de 1mg/ml y también posee solubilidad en metanol, donde adopta una estructura globular compacta que consiste en una lámina b paralela doblada atrás en sí misma [68]. La purificación de la MccJ25 originalmente consistía en adsorber el antibiótico a carbón activado y posterior elución con acetona acuosa. Actualmente, se puede purificar más eficientemente. Se precipita el antibiótico con sobrenadantes concentrados por evaporación con sulfato de amonio al 80%, seguida de una prepurificación mediante cromatografía con cartucho de C8. La purificación final se logra por HPLC.

Gen	Nº de aminoácidos.	Peso molecular.	Función.
mcjA	58	6.200	Precursor de MccJ25
mcjB	208	24.568	Procesamiento?
mcjC	442	50.433	Procesamiento?
mcjD	580	65.424	Inmunidad.

Cuadro 2. Proteínas codificadas por los genes de la MccJ25. Posibles características de las proteínas codificadas por los cuatro genes mcjABCD y sus posibles funciones

**MIKHFFHNKLS S G K K N N V P S P A K G V I Q I K K S A S Q L T K G G A G H V P E Y F V G
I G T P I S F Y G**

Fig 3. Estructura primaria de la MccJ25. El péptido precursor está conformado por 58 aminoácidos. En la secuencia están subrayados los aminoácidos correspondientes a la composición aminoacídica del péptido cíclico activo, conformado por 21 aminoácidos.

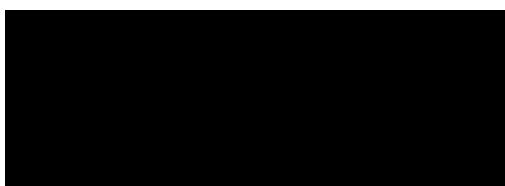


Fig 4. Estructura secundaria de la MccJ25.

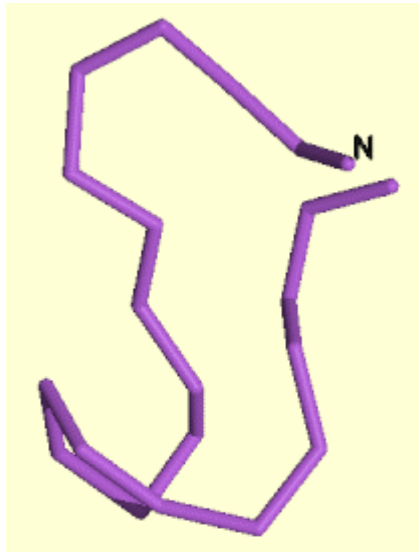


Fig 5. Estructura tridimensional de la MccJ25 en solución. La microcina J25 adopta una estructura compacta bien definida que consiste en una lámina beta antiparalela deformada, la cual es enrollada y plegada hacia atrás en sí misma, resultando en tres rulos. Los residuos 7-10 y 17-20 forman la parte más regular de la lámina beta. La región que contiene los residuos Gly 11-His16 consisten en una horquilla beta distorsionada, que se divide en dos pequeños rulos y es estabilizada por una vuelta gamma inversa y una vuelta beta. El reverso de la cadena que muestra un rulo en Phe21-Pro6 resulta de una vuelta mixta beta/gamma. Una cavidad, en donde se encuentra la cadena lateral hidrofílica de Ser8, es limitada por dos regiones similares a dos pinzas de cangrejo que incluye a los residuos 6-8 y 18-1 [68].

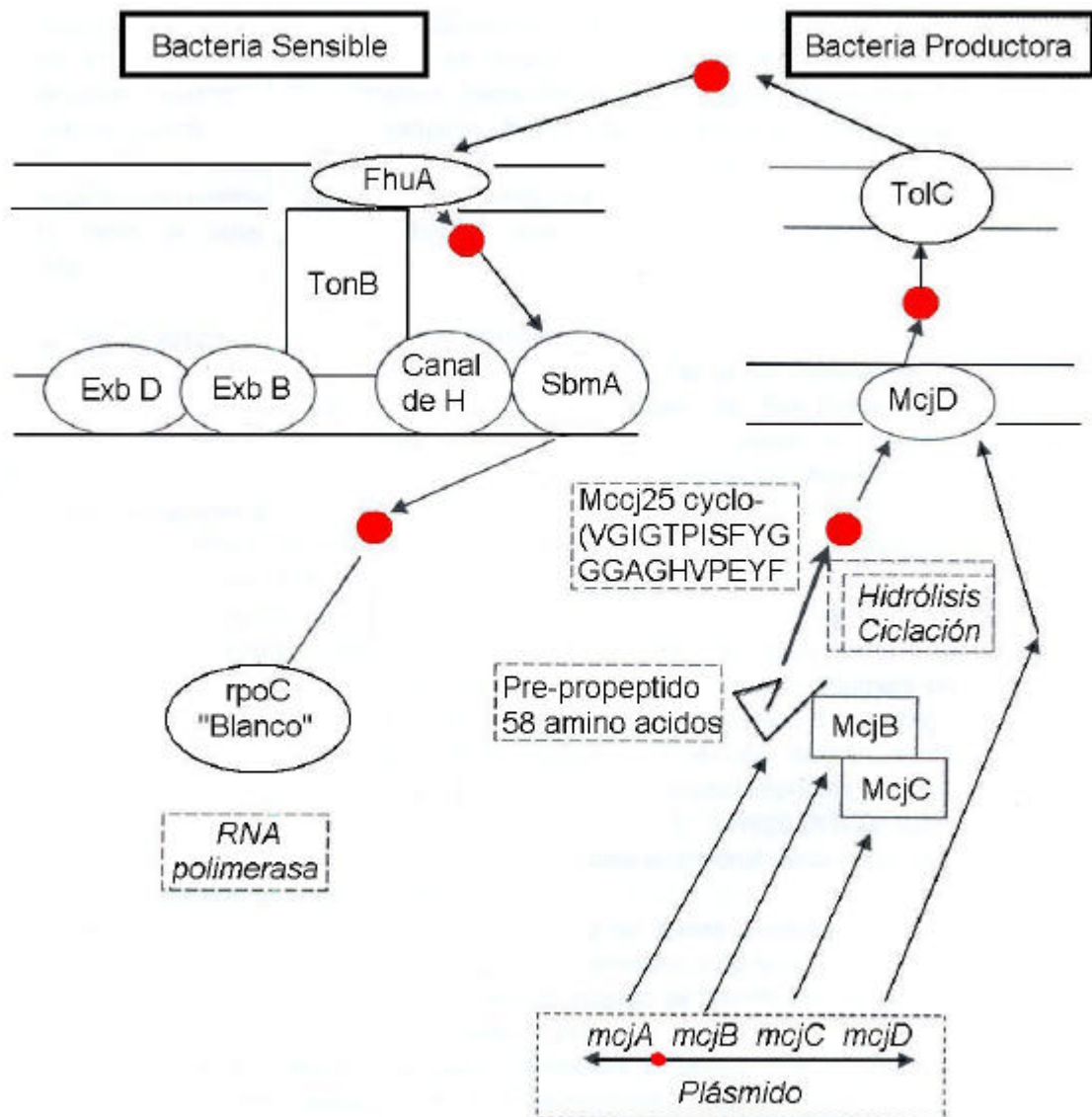


Fig 6. Sistema MccJ25. El plásmido responsable de la producción de la MccJ25 está formado por 3 genes *mjABC*. Un cuarto gen, *mjD*, es el responsable de otorgarle inmunidad a la MccJ25. En su conjunto, codificarían para un pre-peptido de 58 aminoácidos. No está totalmente dilucidado el mecanismo por el cual se cliva dicho péptido y luego se cicla para formar el ciclo-peptido de 21 aminoácidos con actividad antimicrobiana. La MccJ25 excretada, penetra en la bacteria blanco por medio del receptor de membrana FhuA. La traslocación es mediada por el producto de los genes *SbmA*, *tonB*, *exb*. Una vez adentro, la MccJ25 interactúa con el gen *rpoC*, inhibiendo la acción de la ARN polimerasa.

3.4- Fragarina

Las plantas, en su ambiente natural, están expuestas a una gran cantidad de microorganismos. Para resistir al ataque microbiano y continuar con su crecimiento normal, las plantas fabrican compuestos químicos. Estos compuestos pueden formarse por inducción (fitoalexinas) o pueden estar preformados (fitoanticipinas). Pueden ser, a su vez, de origen peptídico o no peptídico. La distribución de estos compuestos es determinada por el tipo de tejido. Generalmente, se encuentran en las células localizadas en las capas externas de los tejidos de las plantas, sugiriendo que estos compuestos forman parte de la defensa contra ataques de patógenos.

La fragarina es un antibiótico aislado y purificado de una fracción citosólica soluble de hojas de frutilla *Fragaria ananassa*. Estudios indicaron que se trata de un nuevo tipo de compuesto antimicrobiano preformado (fitoanticipina) ya que la planta no había sido expuesta a ninguna situación estresante. La fragarina demostró ser entre 10 y 100 veces más activa contra bacterias que contra hongos [70].

La caracterización del compuesto indica la presencia de una molécula anfipática con un peso molecular de 306 Da. La fragarina demostró ser completamente estable al tratamiento con proteasa y a la hidrólisis alcalina a 120°C durante 20 minutos. Esto indica claramente que la fragarina no posee estructura peptídica [70]. Sin embargo, se puede afirmar la presencia de aminas primarias en la estructura y que no tiene actividad hemolítica, por lo que se sugiere que la fragarina sería una saponina.

La adición de fragarina a cultivos celulares de *Clavibacter michiganensis* demostró una rápida inhibición del crecimiento y consumo de oxígeno. También, se observó la disipación del potencial de membrana y un aumento de la permeabilidad de esta en presencia del compuesto. La sugerencia de que la fragarina actuaría a nivel de la membrana celular se correlaciona con el descenso de la viabilidad celular [71]. La fragarina demostró ser activa contra bacterias con una concentración efectiva cincuenta (CE_{50}) del orden de 0.5mM aproximadamente [70].

Actualmente se está investigando si la fragarina se encuentra asociada a algún ligando protéico de mayor peso molecular dentro de las hojas debido a indicios de esto obtenidos durante la purificación [70].

Objetivos

Considerando que la microcina J25 y la fragarina son compuestos de origen natural y poseen una marcada actividad antimicrobiana se decidió investigar su potencial actividad antiviral.

Para esto se plantearon los siguientes objetivos:

- Familiarización con técnicas de cultivo de tejidos y titulación de virus.
- Preparación de stocks correspondientes a los virus HSV-1, HSV-2, VSV, VJ, TAC, SARV y PV.
- Determinación de la citotoxicidad de la microcina J25 y de la fragarina.
- Screening de ambos compuestos frente a diversos ARN y ADN virus.
- Determinar si los compuestos presentan actividad virucida.

Materiales y métodos.

1- Medios de cultivo.

- Medio de crecimiento (MC): Medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado con 5% de suero de ternera inactivado y 50µg/ml de gentamicina.*
- Medio de mantenimiento (MM): Medio mínimo esencial de Eagle suplementado con 1,5% de suero de ternera inactivado y 50µg/ml de gentamicina.*
- Medio de plaqueo: Medio mínimo esencial de Eagle doblemente concentrado (MEM 2X) suplementado con 4% de suero de ternera inactivado y 100µg/ml de gentamicina. En el momento de utilizarse se mezcla con igual volumen de metilcelulosa 1,4% para obtener un medio semisólido.*

*Los cultivos que se incubaron en estufa con 4% de CO₂, se suplementaron con 20mM de buffer ácido N-[2-hidroxi-etil] piperazin-N'-[2-etansulfónico] (HEPES) y bicarbonato de sodio.

2- Células.

Se utilizó la línea celular Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), crecidas en monocapa en MC a 37°C y mantenidas en MM.

3- Virus.

Se utilizó la cepa F de HSV-1 y la cepa G de HSV-2, que fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (Rockville, USA). El virus de la poliomielitis tipo VI utilizado fue la cepa vacunal sabin, obtenido del Instituto Carlos G. Malbrán. La cepa atenuada del virus del sarampión fue MV/BRAZIL/001/91 (cedida gentilmente por la Dra. Baumeister del Instituto Carlos G. Malbrán). El virus VSV utilizado fue cepa Indiana. La cepa atenuada del VJ fue IV₄₄₅₄ y del virus Tac fue TRLV₁₁₅₇₃.

4- Compuestos ensayados.

La MccJ25 y la Fragarina fueron aportados por el Dr. Ricardo Farías de la Universidad Nacional de Tucumán. La microcina se disolvió en agua destilada estéril obteniéndose una solución madre de concentración 1092mM (2300mg/ml). La fragarina se disolvió en agua destilada estéril obteniéndose una solución madre de concentración 6329mM (2000mg/ml). En el momento de utilizar ambas soluciones, se efectuaron las correspondientes diluciones en MM. Todas las soluciones se conservaron a -20°C hasta su utilización.

5- Obtención de los stocks virales.

Células Vero crecidas en botellas planas de 25 cm² de superficie se infectaron con una multiplicidad de infección (m.i) de 0,2 UFP/célula. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C, se descartó el inóculo y se cubrieron las células con 6ml de MM, que posteriormente se incubaron a 37°C. A las 30 hs post-infección (p.i), los cultivos infectados con HSV-1, HSV-2, VSV, polio y sarampión, que mostraban un alto grado de acción citopática (ACP), se sometieron a ciclos de congelado (-70°C) y descongelado. Luego, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y los stocks fueron obtenidos a partir del sobrenadante. Los stocks de arnavirus se obtuvieron cosechando el sobrenadante de los cultivos infectados a los 4 días p.i para TAC y a los 5 días p.i para VJ. Los stocks se conservaron a -70°C y se titularon por UFP.

6- Ensayo de viabilidad celular.

Con el objetivo de determinar la citotoxicidad de la microcina y de la fragarina, se realizó el ensayo colorimétrico del MTT. El MTT (bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2y1]-2,5-difeniltetrazolio, Sigma Chemical Co. St. Louis) es un compuesto que es clivado por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, generando un producto azul (formazan) [72]. La cantidad de este producto azul se relaciona con la viabilidad celular.

Monocapas de células Vero, crecidas en una microplaca de 96 cavidades durante 48 hs, se incubaron con 100ml de MM conteniendo diluciones seriadas al cuarto de los compuestos, por duplicado, durante 24 hs a 37°C en estufa de CO₂. Transcurrido este tiempo, se agregaron 10ml de una solución de MTT (5 mg/ml) en cada cavidad y se incubó la placa a 37°C durante 2hs. Seguidamente, se descartaron los sobrenadantes y los cristales de formazan se disolvieron en 200ml de etanol 96%. Finalmente, se determinó la densidad óptica, utilizando un lector de microplacas Eurogenetics MPR-A 4i, a una longitud de onda de 570 nm y a una longitud de onda de referencia de 630 nm. La intensidad del colorante de las células tratadas se comparó con controles de células sin tratar.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó como:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = 100 \times (\text{densidad óptica}_{570\text{nm}}^{\text{tratado}} / \text{densidad óptica}_{570\text{nm}}^{\text{control}})$$

Se determinó la concentración del compuesto que reduce el 50% de la viabilidad celular (CC₅₀), extrapolando a partir del gráfico de regresión lineal del porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración del compuesto.

7- Ensayos antivirales.

7.1- Titulación de la infectividad viral:

La titulación de la infectividad viral se realizó por el método de formación de placas (UFP). Para esto, monocapas de células Vero, crecidas en microplacas de 24 cavidades, se infectaron con un inóculo de 100μl de diluciones seriadas al décimo, por duplicado, del stock viral o de la muestra a titular. Luego de 1 hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se cubrió cada cavidad con 500μl de medio de plaqueo. Las microplacas se incubaron a 37°C en estufa de CO₂, 7 días para VJ y TAC (renovando el medio semisólido a los 3 días), y 2 días para HSV, VSV, sarampión y poliomielitis. Finalmente, se fijaron las células con formol al 10% durante 15 minutos y se revelaron las placas por tinción con cristal violeta al 1% durante 20 minutos.

El título viral se determinó de la siguiente forma:

Título (UFP/ml) = número promedio de placas / (dilución utilizada x volumen del inóculo)

7.2- Ensayo de inhibición del rendimiento viral.

La actividad antiviral fue evaluada mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral. Para esto, monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades fueron infectadas con los virus HSV-1, HSV-2, VSV, PV, SARV, VJ y TAC a una m.i (multiplicidad de infección) de 1, para infectar la mayoría de las células. Luego de una hora de adsorción a 37°C, las células se cubrieron con MM que contenía diluciones seriadas del compuesto. La inhibición del efecto citopático se examinó luego de 24 hs de incubación a 37°C. Los sobrenadantes se cosecharon y titularon por el método de UFP, utilizando células Vero y diluciones al décimo de los virus ensayados. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

La actividad antiviral se calculó como el porcentaje de inhibición del número de placas producidas respecto de los controles a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - (\text{título de la muestra} \times 100) / (\text{título del control de virus})$$

La concentración efectiva 50 (CE_{50}) es la concentración del compuesto que reduce en un 50% el rendimiento viral respecto del control. Este valor se calculó extrapolando su valor a partir de la recta de regresión lineal obtenida del gráfico del número de placas en función de la concentración.

8- Actividad virucida.

Por último, se realizó el ensayo de actividad virucida para determinar si los compuestos inactivan a los virus por contacto directo. Para esto, $6 \cdot 10^6$ UFP/ml de polio cepa vacunal diluida en medio de cultivo fueron incubadas a 37°C con 10 μ l de Fragarina de concentración 333 μ g/ml y 100 μ l de Microcina de concentración 1150 μ g/ml de microcina durante 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. A los tiempos indicados, los cultivos fueron congelados y alícuotas, apropiadamente diluidas en MM fueron recolectadas. Con estas alícuotas se estudió la supervivencia viral por el método de UFP. Finalmente, se graficó el título viral en función del tiempo de incubación de los tratamientos.

Resultados

1- Preparación de los stocks virales

Antes de comenzar a ensayar la actividad antiviral de los compuestos, se realizaron los stocks correspondientes a todos los virus utilizados en este trabajo, como se describió anteriormente en materiales y métodos.

Los títulos virales obtenidos fueron:

- **VSV:** $4,5 \cdot 10^7$ UFP/ml.
- **HSV-1:** $7,0 \cdot 10^7$ UFP/ml.
- **HSV-2:** $4,0 \cdot 10^7$ UFP/ml.
- **PV:** $6,0 \cdot 10^6$ UFP/ml
- **SARV:** $8,0 \cdot 10^7$ UFP/ml.
- **VJ:** $4,0 \cdot 10^6$ UFP/ml.
- **TAC:** $6,0 \cdot 10^5$ UFP/ml.

2- Evaluación del efecto de la microcina J25 y fragarina sobre la viabilidad celular.

Previamente al estudio de la actividad antiviral de un compuesto, se debe evaluar el efecto tóxico de este sobre las células en ausencia del virus. Para esto, la concentración citotóxica cincuenta (CC_{50}) se determinó incubando monocapas de células Vero con diluciones seriadas de los compuestos. La viabilidad celular se determinó a través de la observación de la morfología celular al microscopio óptico y a través del ensayo colorimétrico del MTT antes descrito. Las concentraciones elegidas para la microcina J25 fueron diluciones seriadas al medio a partir de 1500 μ g/ml, concentración que resultó ser no tóxica para las células. Para la fragarina, también se realizaron diluciones seriadas al medio a partir de 2000 μ g/ml.

La CC_{50} de la MccJ25 resultó ser mayor a 1500 μ g/ml. No se determinó la CC_{50} con exactitud debido a que para determinar la actividad antiviral se usaron concentraciones muchos menores. No se observaron modificaciones en las células al microscopio óptico.

La CC_{50} de la fragarina fue de 241 mg/ml, observándose una marcada disminución de la viabilidad celular con el aumento de las concentraciones. Esto es claramente visible en el gráfico a partir del cual surge la recta de regresión lineal, con la cual se calculó la CC_{50} (Fig. 7). Se observó, en el caso de las células dañadas, el redondeamiento característico y el desprendimiento de algunas células al sobrenadante de los cultivos.

Considerando los valores de citotoxicidad obtenidos, se procedió a valorar el efecto de estos compuestos sobre la multiplicación viral, utilizando un rango de valores por debajo de la CC_{50} .

3- Evaluación de la actividad antiviral de MccJ25 y fragarina.

Luego de los estudios de toxicidad se realizó el screening de los compuestos en estudio contra HSV-1, HVS-2, VSV, PV, VJ, TAC y SARV. Para esto, monocapas de células Vero fueron infectadas con cada uno de los virus a una m.i. de 1 y luego de una hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y los cultivos se incubaron con MM conteniendo concentraciones no citotóxicas de los compuestos. Luego de 24 hs a 37°C, se cosecharon los sobrenadante y se cuantificó el título infeccioso de los virus por el método de formación de placas. Los resultados indicaron que fue inhibida la replicación de todos los virus, aunque algunos virus, como HSV-1 y HSV-2 mostraron una baja susceptibilidad a los compuestos. Por lo tanto, estos virus fueron descartados para futuros estudios.

Se comenzó por valorar la actividad antiviral de la MccJ25. Para todos los virus el Índice de Selectividad (IS: relación entre la CC_{50} y la CE_{50}) fue mayor a 10, excepto para HSV-1. Entre los valores de IS más altos se destaca el de VSV y PV, resultando estos claramente aptos para futuros estudios.

Al valorar la actividad antiviral de la fragarina, se encontraron valores de IS mucho más bajos. Sólo para HSV-2 y sarampión se encontraron datos mayores a 10, siendo estos dos los únicos virus relativamente susceptibles al compuesto. El cuadro 3 muestra los IS obtenidos para ambos compuestos. En las figuras 8, 9, 10, 11, 12 y 13 se pueden observar los gráficos de donde se interpoló la CE_{50} (concentración efectiva cincuenta, concentración a la cual se produce un 50% de inhibición del número de placas respecto del control) y los respectivos gráficos de porcentaje de inhibición de la replicación viral en función de la concentración de compuesto.

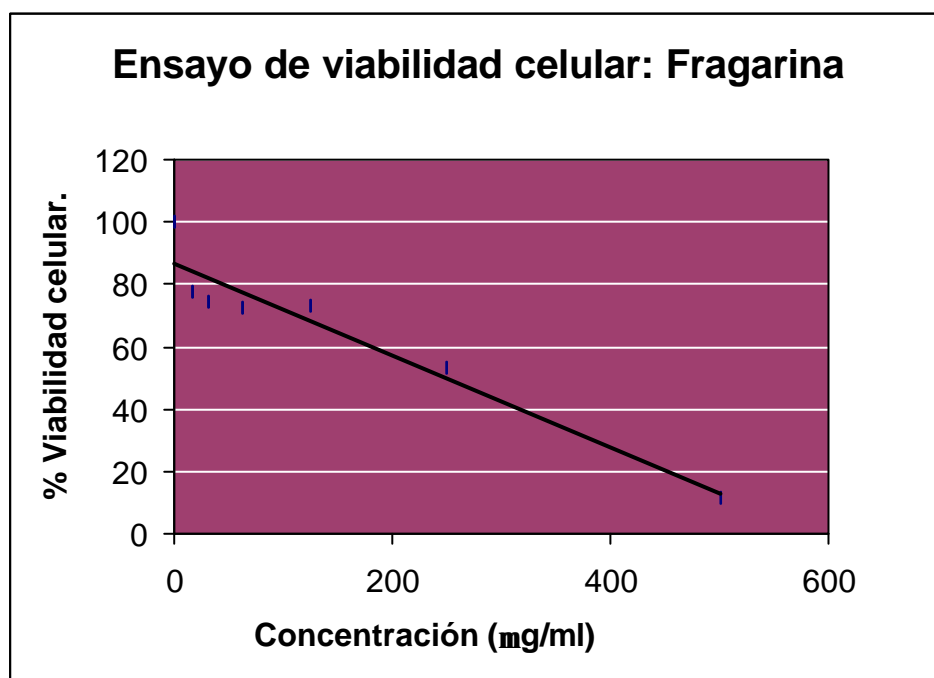


Fig. 7. Se determinó la citotoxicidad de la fragarina por el método del MTT. Para esto se incubaron células Vero con distintas concentraciones de fragarina durante 24hs a 37°C. Finalizado este tiempo se incubó la placa con MTT (5mg/ml), se descartó el sobrenadante y se disolvieron los cristales formados en etanol 96%. Por último, se midió la densidad óptica de cada cavidad, datos con los cuales se calculó el % de viabilidad celular respectivo. La CC_{50} se calculó interpolando en la recta de regresión lineal obtenida a partir del gráfico.

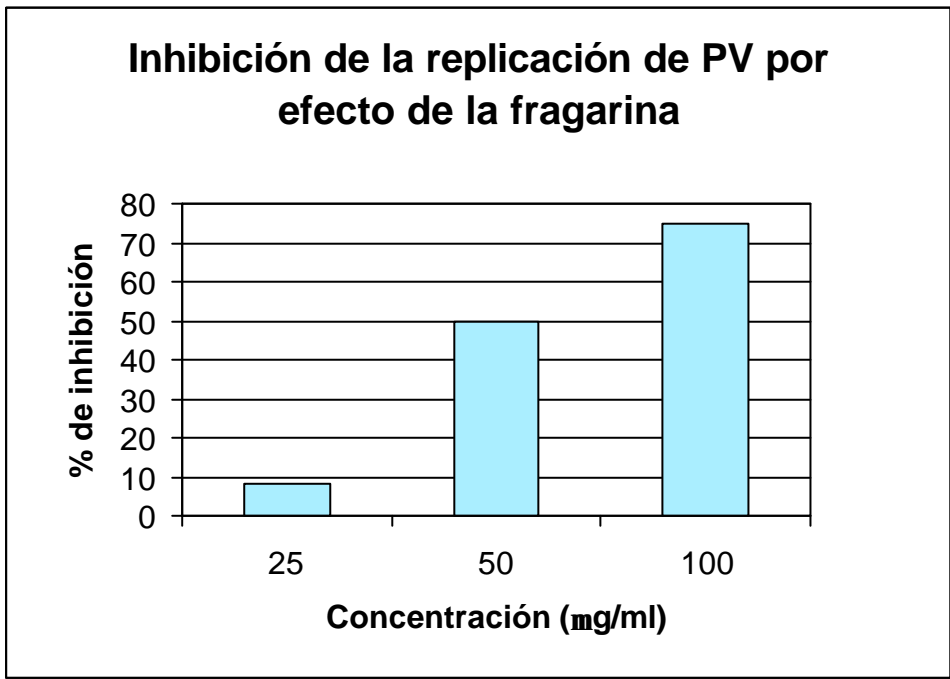
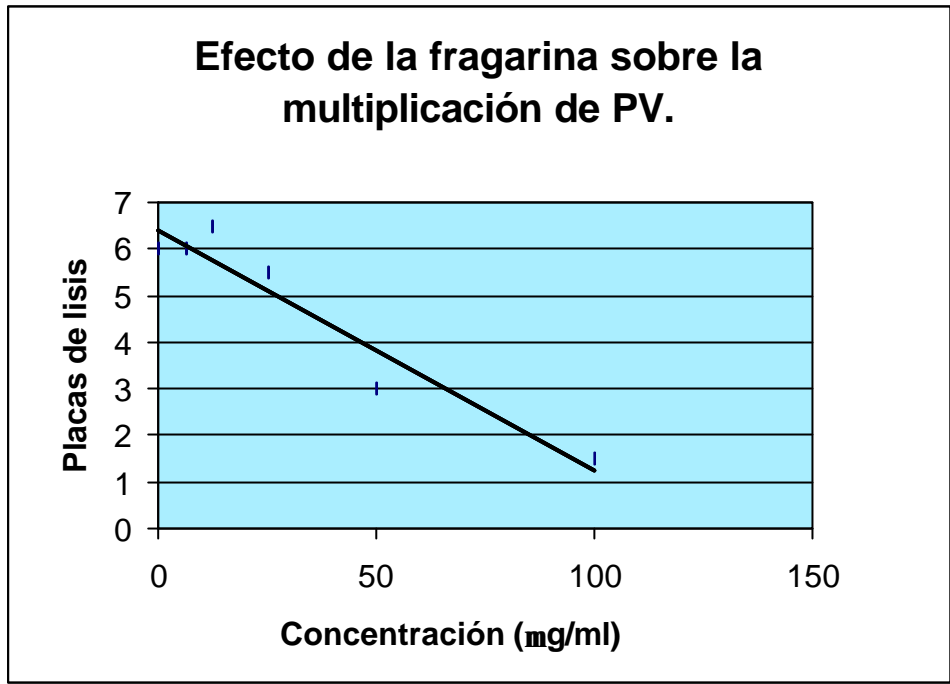


Fig. 8. Acción antiviral de la fragarina contra PV. Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con PV a una m.i de 1. Luego de una hora de adsorción a 37°C, las células se cubrieron con MM que contenía diluciones seriadas del compuesto. Luego de 24 hs a 37°C los sobrenadantes se cosecharon y titularon por el método de UFP, utilizando células Vero y diluciones al décimo de los virus ensayados. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

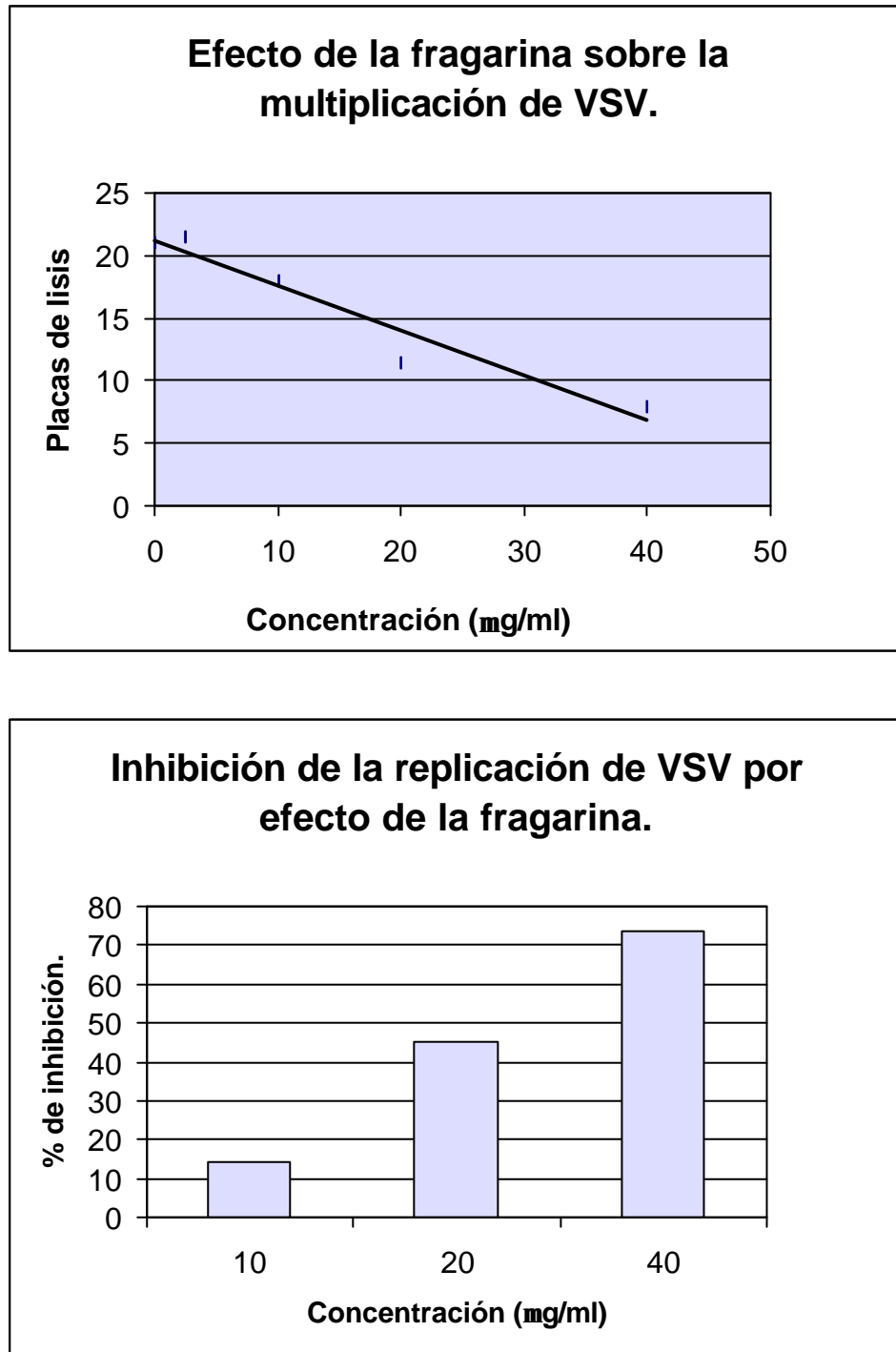


Fig. 9. Acción antiviral de la fragarina contra VSV. Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con VSV a una m.i de 1. Luego de una hora de adsorción a 37°C, las células se cubrieron con MM que contenía diluciones seriadas del compuesto. Luego de 24 hs a 37°C los sobrenadantes se cosecharon y titularon por el método de UFP, utilizando células Vero y diluciones al décimo de los virus ensayados. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

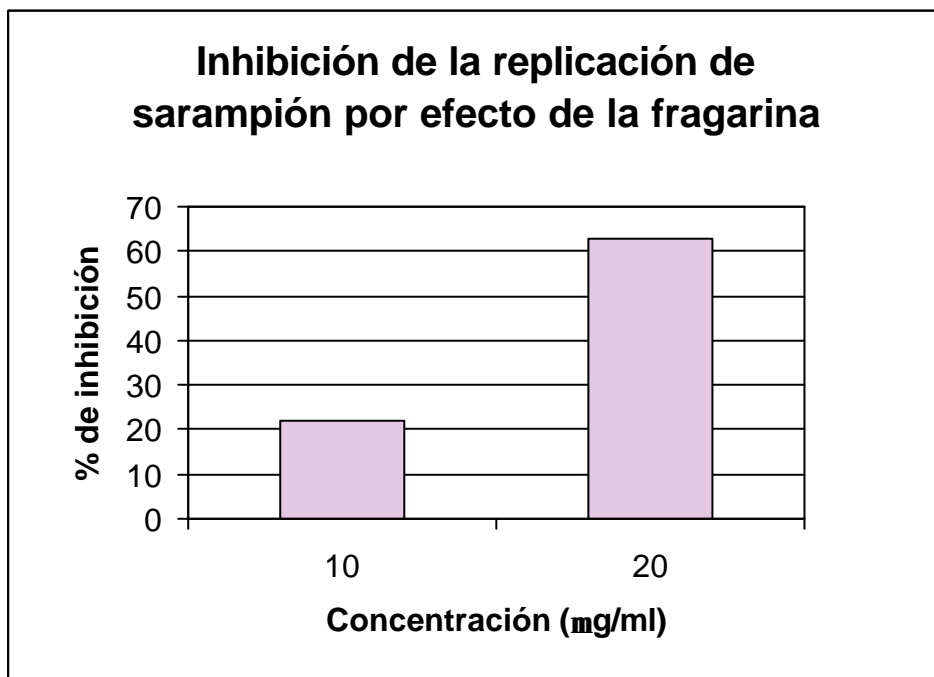
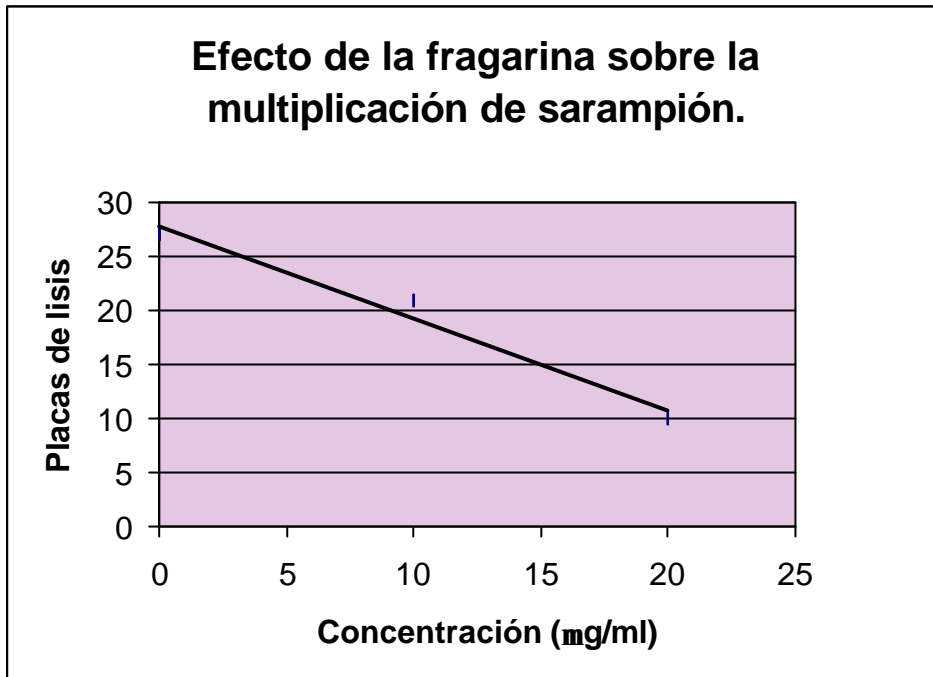


Fig. 10. Acción antiviral de la fragarina contra SARV. Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con SARV a una m.i de 1. Luego de una hora de adsorción a 37°C, las células se cubrieron con MM que contenía diluciones seriadas del compuesto. Luego de 24 hs a 37°C los sobrenadantes se cosecharon y titularon por el método de UFP, utilizando células Vero y diluciones al décimo de los virus ensayados. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

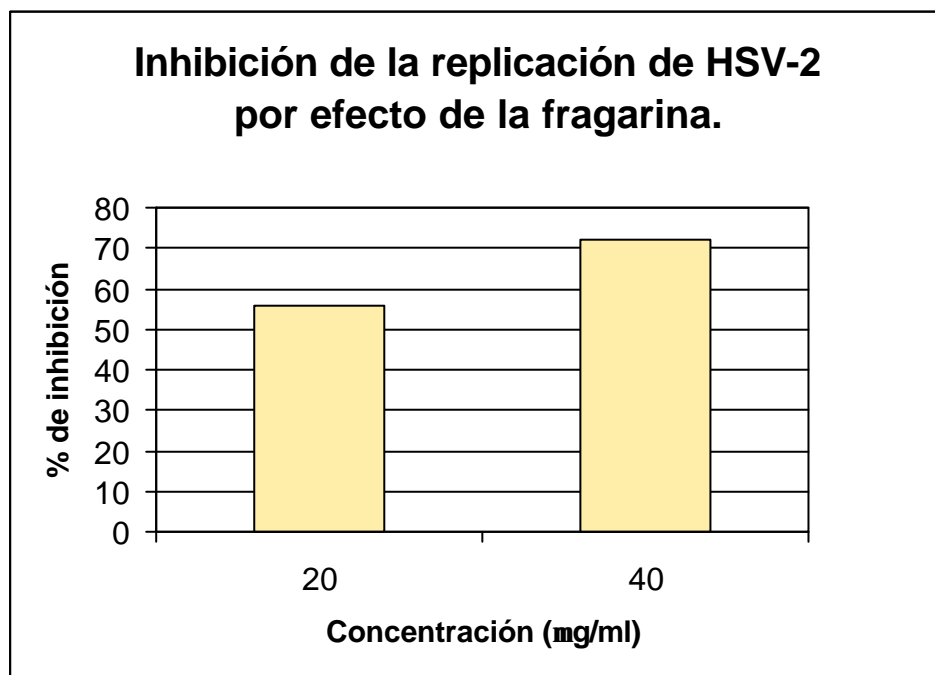
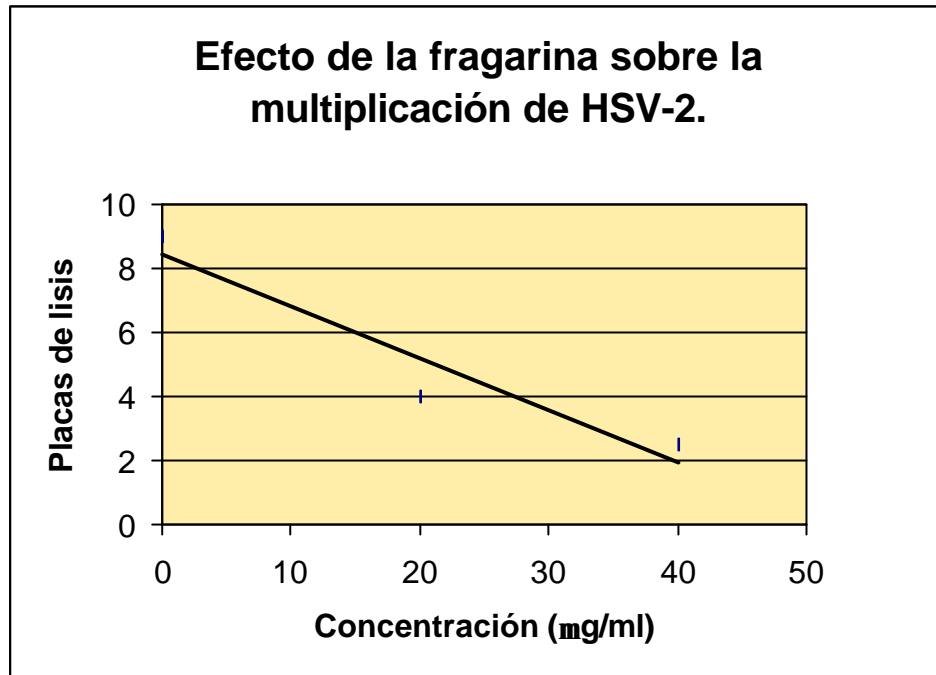


Fig. 11. Acción antiviral de la fragarina contra HSV-2. Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con HSV-2 a una m.i de 1. Luego de una hora de adsorción a 37°C, las células se cubrieron con MM que contenía diluciones seriadas del compuesto. Luego de 24 hs a 37°C los sobrenadantes se cosecharon y titularon por el método de UFP, utilizando células Vero y diluciones al décimo de los virus ensayados. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

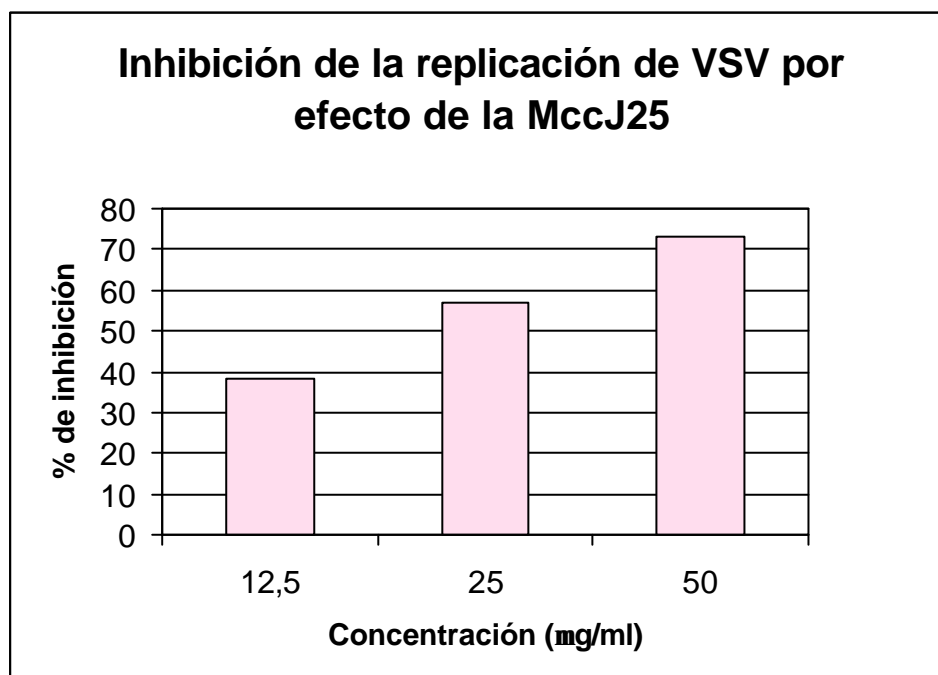
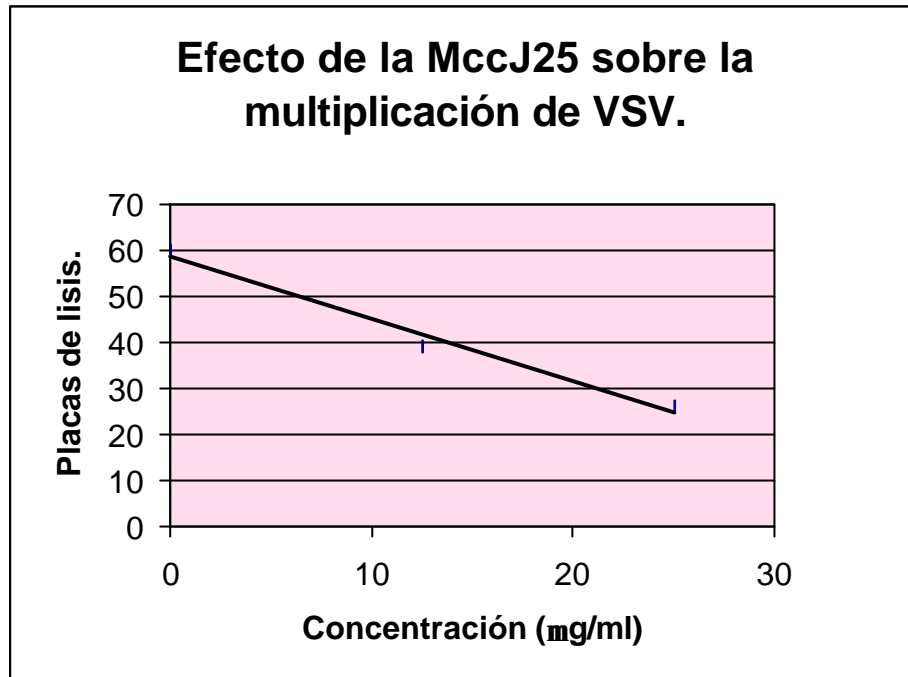


Fig. 12. Acción antiviral de la MccJ25 contra VSV. Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con VSV a una m.i de 1. Luego de una hora de adsorción a 37°C, las células se cubrieron con MM que contenía diluciones seriadas del compuesto. Luego de 24 hs a 37°C los sobrenadantes se cosecharon y titularon por el método de UFP, utilizando células Vero y diluciones al décimo de los virus ensayados. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

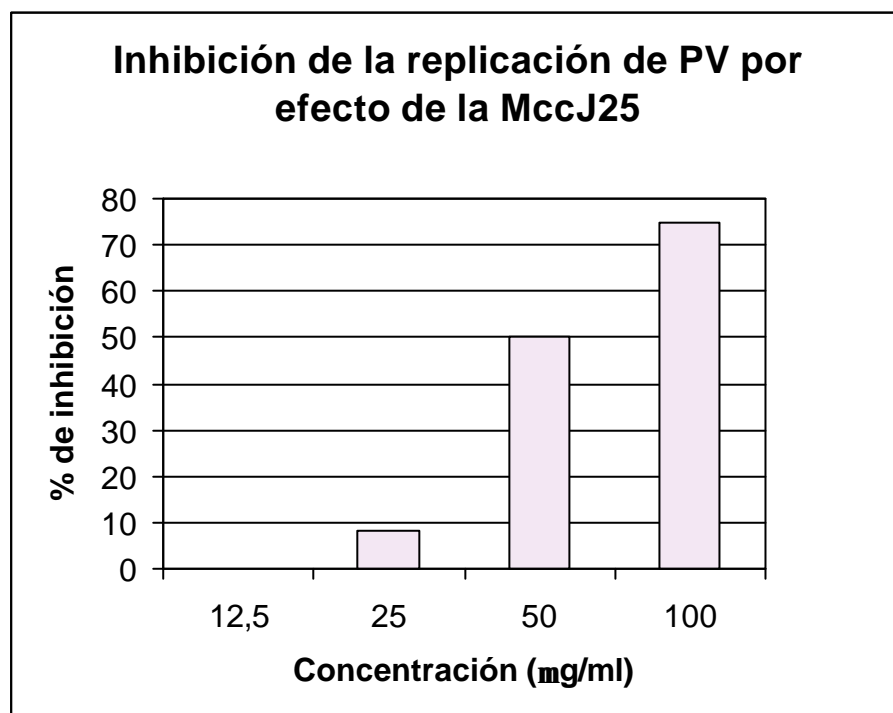
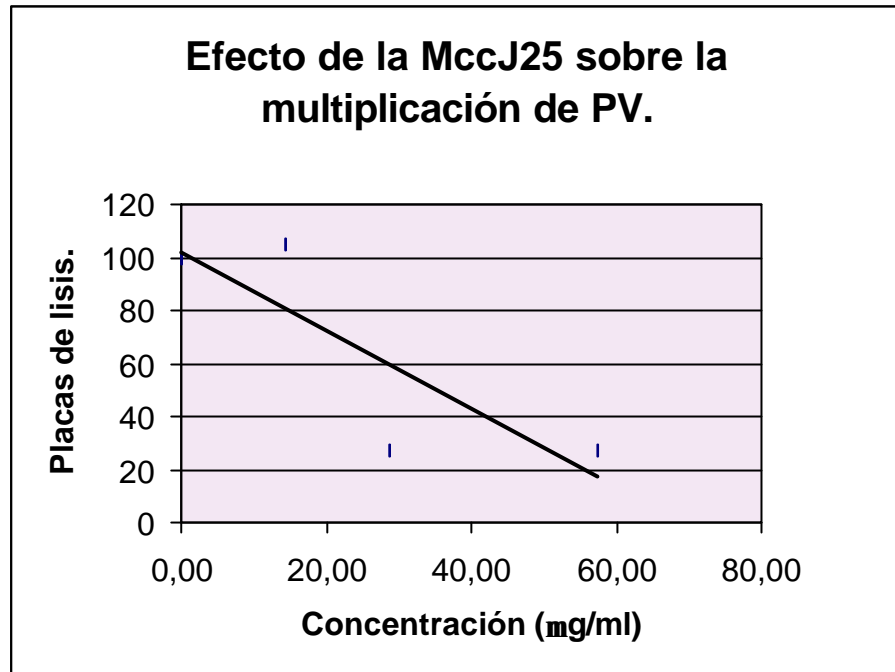


Fig. 13. Acción antiviral de la MccJ25 contra PV. Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con PV a una m.i de 1. Luego de una hora de adsorción a 37°C, las células se cubrieron con MM que contenía diluciones seriadas del compuesto. Luego de 24 hs a 37°C los sobrenadantes se cosecharon y titularon por el método de UFP, utilizando células Vero y diluciones al décimo de los virus ensayados. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Virus	Compuesto			
	Fragarina (CC ₅₀ * =241µg/ml)		Microcina J25 (CC ₅₀ >1500µg/ml)	
	CE ₅₀ ** (µg/ml)	IS***	CE ₅₀ (µg/ml)	IS
VSV	30	8	21	>71,5
HSV-1	40	6	>200	<7,5
HSV-2	24.1	10	NH	NH
Sarampión	16.9	14,2	>46	<32.6
Poliovirus	66.3	3.6	35.5	>42.3
Tacaribe	> 80	>3	>46	<32,6
Junín	> 80	>3	>46	<32,6

*CC₅₀ = Concentración citotóxica cincuenta o concentración de compuesto que reduce la viabilidad celular en un 50% luego de 48hs de incubación a 37°C.

**CE₅₀ = Concentración efectiva cincuenta o concentración de compuesto que inhibe la replicación viral en un 50%.

*** IS = Índice de Selectividad: CC₅₀/CE₅₀. El IS debe ser mayor a 10 para considerar a una droga como potencial antiviral.

NH = No hecho.

Cuadro 3. Actividad antiviral de microcina J25 y fragarina. En este cuadro se resumen los datos obtenidos en el screening de los compuestos contra los distintos virus.

4- Evaluación de la actividad virucida de la MccJ25 y Fragarina.

Para determinar la capacidad de los compuestos de inactivar directamente las partículas virales, es decir sin inhibir alguna etapa del ciclo de replicación, se realizó el ensayo de actividad virucida, en el cual se evaluó la habilidad de los compuestos para inactivar al PV a temperatura fisiológica. Para medir la actividad virucida se eligió al virus de la polio por los valores relativamente altos obtenidos de los ensayos antivirales y por ser un virus de gran importancia sanitaria. Para esto, se tomaron alícuotas del stock viral diluido en medio de cultivo y se incubaron durante 15, 30, 45 y 60 minutos a 37°C en presencia de cada compuesto. La concentración de la MccJ25 utilizada fue 1150µg/ml (32 veces mayor que la CE₅₀) y la de la fragarina 333µg/ml (5 veces mayor que la CE₅₀). Simultáneamente, se realizó un control de virus sin compuesto. En los tiempos indicados, los cultivos fueron congelados y las alícuotas, apropiadamente diluidas en MM (a concentraciones inferiores a la CC₅₀), se analizaron en busca de supervivencia viral. Se observó una gradual pérdida de infectividad con el tiempo de incubación como se muestra en la fig.14 para los cultivos tratados y el cultivo control, sugiriendo que la infectividad viral disminuye por la inactivación térmica y no por efecto directo de los compuestos sobre los viriones.

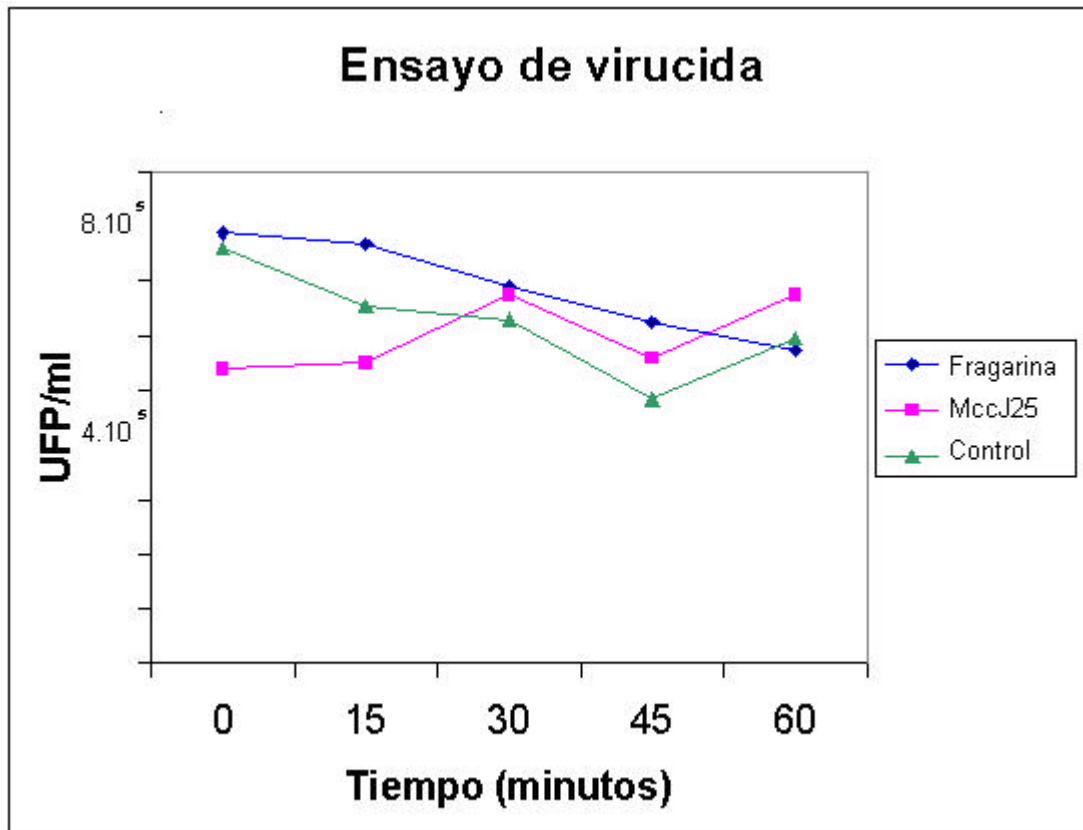


Fig. 14. Inactivación directa de PV por MccJ25 y Fragarina. 10⁶ UFP/ml de PV diluido en medio de cultivo fue incubado a 37°C con MccJ25 1150µg/ml y fragarina 333µg/ml durante 15, 30, 45 y 60 minutos. En los tiempos indicados, los cultivos fueron congelados y las alícuotas, apropiadamente diluidas en MM, se analizaron en búsqueda de supervivencia viral. Los títulos obtenidos se encuentran entre 4.10⁵ y 8.10⁵ UFP/ml.

Discusión

En este trabajo se realizó una breve descripción de la actividad antiviral de dos compuestos nuevos, recientemente aislados de fuentes naturales. Se encontró que ambos compuestos inhiben en mayor o menor grado la replicación de los distintos virus utilizados in vitro.

La MccJ25, péptido antimicrobiano producido por *E. coli* cepa AY25, mostró poseer un significativo efecto inhibitorio en la replicación viral de PV, SARV, VSV y miembros de la familia Arenaviridae de una manera dosis-dependiente. Esta actividad antiviral se observó a concentraciones muy por debajo de la CC₅₀, dando índices de selectividad mayores que 10, que es lo que se busca para considerar al compuesto como potencial antiviral. Sorprendentemente, los genomas de todos estos virus consisten en moléculas de ARN simple cadena. Esta concomitancia podría estar relacionada con los estudios llevados a cabo por Delgado *et al* [60], en los cuales se identifica a la microcina J25 como bloqueante del acceso del sustrato al centro catalítico de la ARN polimerasa, interfiriendo de esta forma con la transcripción en bacterias. Los herpesvirus utilizados en este trabajo mostraron una menor susceptibilidad al compuesto. Esto podría ser debido a que poseen un genoma distinto (ADN).

El ensayo de actividad virucida refuerza lo expuesto anteriormente, indicando que la actividad antiviral de la MccJ25 es debida a la inhibición de algún paso de la multiplicación viral y no a una inactivación directa de los virus por parte del compuesto, como fue demostrado para otros péptidos antimicrobianos como las defensinas humanas y pequeños péptidos aislados de macrófagos de pulmón de conejos [36 y 73]. Si bien los estudios realizados con la MccJ25 hasta el momento son muy limitados, se sugiere la realización de ensayos que ayuden a dilucidar el mecanismo de acción. Por otro lado, resultaría útil, también, que se lleven a cabo estudios de relación estructura-actividad para producir compuestos que además de tener los parámetros deseados (CC₅₀ y CE₅₀, entre otros), posean una interesante razón costo-beneficio.

La Fragarina, mostró poseer baja citotoxicidad en los cultivos celulares utilizados. Si bien los IS de la fragarina no resultaron muy alentadores, excepto para SARV (14.2) y HSV-2 (10), se sugiere tener en cuenta a este compuesto para futuros estudios, tal cual o con algunas modificaciones, por provenir de una fuente de origen natural de fácil acceso (hojas de frutilla). Además, otros antivirales aprobados para su uso en clínica frente a estos dos virus poseen IS semejantes. Por ejemplo, el IS del foscarnet es de 10 para HSV [74] y el IS de la ribavirina para SARV es de 12 [21].

Una vez dilucidados los mecanismos de acción de ambos compuestos, se podrían hacer combinaciones con otros antivirales aprobados en la clínica y ver la existencia o no de sinergismo.

Un gran número de compuestos con actividad antiviral fueron aislados de diferentes fuentes naturales. Muchos de estos son péptidos con marcada actividad antimicrobiana, hecho que destaca a este tipo de compuestos para futuras investigaciones. Circulina A y B son péptidos macrocíclicos, aislados del árbol tropical *Chassalia parvifolia*, que poseen actividad anti-HIV [75]. Las fluvirucinas son antibióticos aislados de un caldo de fermentación de especies de actinomicetos no identificados, que poseen una potente actividad inhibitoria contra el virus de la influenza A [76].

Hasta el momento, nunca se había reportado sobre la actividad antiviral de bacteriocinas, excepto por la enterocina CRL35 [48]. Sin embargo, se documentó que un pequeño péptido llamado EBR28, aislado de una librería geonómica de levaduras, posee propiedades antivirales contra el HIV en células humanas infectadas. La molécula de este péptido adoptaría una estructura α -helicoidal y tendría propiedades anfipáticas [77], parecidas a la MccJ25. Por lo tanto, los resultados de este trabajo sugieren tener en cuenta a las bacteriocinas como potenciales antivirales. También podría resultar interesante ensayar la actividad antiviral de la MccJ25, y quizás de la fragarina también, contra otros patógenos de importancia sanitaria como el HIV.

Referencias

- [1] Andrei G. & De Clerq E. Quimioterapia de las infecciones virales. En: Basualdo J.A., Coto C.E. & de Torres R.A. (eds). Microbiología biomédica, 1ª ed, Bs. As: Editorial Atlante S.R.L, 1996: 616-625.
- [2] Swanstrom R & Erona J. Human immunodeficiency virus type- 1 protease inhibitors: therapeutic successes and failures, suppression and resistance. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000; 86: 145-170.
- [3] Jones P.S. Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral chemistry and chemotherapy*. 1998; 9: 283-302.
- [4] White D. & Fenner F. Chemotherapy of viral diseases. En: White D & Fenner F. *Medical virology*. Fourth Edition, Chicago: Academic Press L. 1994: 266-281.
- [5] Illán H., Jacob N., Maiolo E., Cisterna D., Santo Orihuela P., Freire M.C. Estudio de sensibilidad al aciclovir del herpes simples en pacientes transplantados. Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 23 al 25 de Septiembre 2002: P34.
- [6] De Clerc E., Naesens L., De Bolle L., Schols D., Zhang Y., Neyts J. Antiviral agents active against human herpesviruses HHV-6, HHV-7 and HHV-8. *Rev Med Virol* 2001; 11(6):381-95.
- [7] Johnson H.M., Baron S. Interferon: effects on the immune response and the mechanism of action of the cellular response. *CRC Crit Rev Biochem* 1976; 4(2):203-227.
- [8] Richman DD. Antiviral drug resistance: issues and challenges. En: Richman DD (ed). *Antiviral drug resistance*. London: Wiley, 1997:1-12.
- [9] Pillay D. Emergence and control of resistance to antiviral drugs in resistance in herpes viruses, hepatitis B virus and HIV. *Communicable Disease and Public Health*. 1998; 1:5-13.
- [10] De Cristóforo, Livellara B. & de Torres R. Herpes virus. En Basualdo JA, Coto CE & de Torres RA (eds). *Microbiología biomédica*, 1ª ed, Bs. As: Editorial Atlante S.R.L, 1996:655-690.
- [11] Metteleiter T.C. Herpesvirus assembly and egress. *Journal of virology* 2002; 76:1537-1547.
- [12] González Ayala S & Padula P. Enterovirus: virus de la poliomieltis. En Basualdo JA, Coto CE & de Torres RA (eds). *Microbiología biomédica*, 1ª ed, Bs. As: Editorial Atlante S.R.L, 1996: 699-703.
- [13] González Ayala S & Verezeri L. Familia paramixoviridae. En Basualdo JA, Coto CE & de Torres RA (eds). *Microbiología biomédica*, 1ª ed, Bs. As: Editorial Atlante S.R.L, 1996: 778-783.
- [14] White D. & Fenner F. Rhabdoviridae. En: White D & Fenner F. *Medical virology*. Fourth Edition, Chicago: Academic Press L. 1994: 475-483.
- [15] Martínez Peralta L. Arenaviridae: Virus Junín, agente de la fiebre hemorrágica argentina. En Basualdo JA, Coto CE & de Torres RA (eds). *Microbiología biomédica*, 1ª ed, Bs. As: Editorial Atlante S.R.L, 1996: 802-813.

- [16] Ellenberg P. y Scolaro L. Caracterización de la infección persistente del virus Junín en células BHK-21. Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 23 al 25 de Septiembre 2002: P10.
- [17] White D. & Fenner F. *Arenaviridae*. En: White D & Fenner F. *Medical virology*. Fourth Edition, Chicago: Academic Press L. 1994: 500-508.
- [18] Weissenbacher M.C., Langhens R.P., Coto C.E. Argentine hemorrhagic fever. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 1987; 134: 79-116.
- [19] Maiztegui J.I. La actualidad de la vacuna contra la fiebre hemorrágica argentina. Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 23 al 25 de Septiembre 2002: MRI.
- [20] Hancock R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*. 200; 1(3):156-64.
- [21] Wachsman M.B., Ramirez J.A., Galagovsky L.R & Coto C.E. Antiviral activity of brassinosteroids derivatives against measles virus in cell cultures. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 2002; 13: 61-66.
- [22] Wachsman M.B., Lopez E.M.F, Ramirez J.A, Galagovsky L.R & Coto C.E. Antiviral effect of brassinosteroids against herpes virus and arenaviruses. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 2000; 11:71-77.
- [23] Wachsman M.B., Castilla V., Talarico L.B., Ramírez J., Galagovsky L.R., Coto C.E. Estudio de la actividad antiherpética del compuesto (22S,23S)-3B-bromo-5A,22,23-trihidroxiestigmastan-6-ona in vitro. Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 23 al 25 de Septiembre 2002: CO25.
- [24] Talarico L.B., Ramirez J., Galagovsky L.R., Wachsman M.B. Estudios de relación estructura-actividad de distintos brassinosteroides obtenidos por síntesis química frente a los virus herpes simples tipo 1 y tipo 2. Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 23 al 25 de Septiembre 2002: P24.
- [25] Talarico L.B., Pujol C.A., Mello Zibetti R.G., *et al.* Actividad antiviral contra virus herpes simples y virus dengue de galactanos sulfatados extraídos de algas rojas. Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 23 al 25 de Septiembre 2002: CO23.
- [26] Baron S, Singh I., Chopra A., Copenhagen D & Pan J. Innate antiviral defenses in body fluids and tissues. *Antiviral Research* 2000; 48: 71-89.
- [27] Archibald D.W., Cole G.A. In vitro inhibition of HIV-1 infectivity by human salivas. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1990; 6: 1425-1432.
- [28] Kazuyoshi I., Suzuki S., Horikoshi H., Mukai T. & Luftig R.B. Positive and negative aspects of the human immunodeficiency virus protease: development of inhibitors versus its role in AIDS pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2000; 64: 725-745.
- [29] Andreu D., Rivas L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 1998; 47: 415-433.
- [30] Nizet V., Othake T., Lauth X *et al.* Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 2001; 414(6862):454-457.
- [31] Hancock R.E.W., Chapple D.S. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents. Chemother* 1999; 43(6): 1317-1323.
- [32] Damaso C.R.A., Moussatché N. Inhibition of vaccinia virus replication by ciclosporin A analogues correlates with their affinity for cellular cyclophilins. *J. Gen. Virol.* 1998; 79: 339-349.
- [33] Ganz T. & Lehrer R. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Current opinion in immunology* 1998; 10: 41-44.
- [34] Higazi A.A.R., Ganz T., Kariko K. & Cines D.B. Defensin modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 17650-17655.
- [35] Barnathan E.S., Raganath P.N., Tomaszewski J.E., Ganz T., Cines D.B., Higazi A.A., Immunohistochemical localization of defensin in human coronary vessels. *Am. J. Pathol.* 1997; 150: 1009-1020.
- [36] Daher K.A., Selsted M.E., Lehrer R.I. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J. Virol.* 1986; 60(3): 1068-1074.
- [37] Egal M., Conrad M., MacDonald D.L., Maloy W.L., Motley M., Genco C.A. Antiviral effects of synthetic membrane-active peptides on Herpes Simplex virus, type 1. *International Journal of Antimicrobial Agents* 1999; 13: 57-60.
- [38] Hultmark D., Steiner H., Rasmusson T. and Boman H.G. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 1980; 106:7-16
- [39] Wachinger M., Kleinschmidt A., Winder D. *et al.* Antimicrobial peptides militin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *J. Gen. Virol.* 1998; 79: 731-740.
- [40] Baghian A., Jaynes J., Enright F. & Kousoulas K.G. An amphipathic α -helical synthetic peptide analogue of melittin inhibits Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) – induced cell fusion and virus spread. *Peptides* 1996; 18: 177-183.
- [41] Albiol Matanic V.C. y Castilla V. Efecto de la cecropina A, peptido cationico natural, sobre la multiplicación del virus junin en células Vero. Congreso Argentino de Virología. Buenos Aires, 23 al 25 de Septiembre 2002: P21.

- [42] Broekaert W.F., Cammue B., Debolle M., Thevissen K., Desamblanx G., and Osborn R. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1997; 16:297-323.
- [43] Andrei G.M., Coto C.E., de Torres R.A. Assays of citotoxicity and antiviral activity of crude and semipurified extracts of green leaves of *Melia azedarach L.* *Rev. Argent. Microbiol.* 1985; 17: 187-194.
- [44] Alche L.E., Barquero A.A., Sanjuan N.A. & Coto C.E. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach L.* leaf aqueous extract restrains Herpes Simplex virus type 1 propagation. *Phytother. Res.* 2002; 16: 348-352.
- [45] Tencza, S., Douglass J., Creighton D., Montelaro R., and Mietzner T. Novel antimicrobial peptides derived from human immunodeficiency virus type 1 and other lentivirus transmembrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41:2394-2398
- [46] Fariás M.E., de Ruis Holgado A.P. & Sesma F. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of foodborne pathogens. *J. Food. Prot.* 1994; 54: 1013-1015.
- [47] O'Sullivan L., Ross R.P. & Hill C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* 2002; 84(5-6):593-604.
- [48] Wachsman M.B., Farias M.E., Sesma F. *Et al.* Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpesviruses. *Antimicrobial Agents* 1999; 12: 293-299.
- [49] Giroir B., Quint P., Barton P., *et al.* Preliminary evaluation of recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in children with severe meningococcal sepsis. *Lancet* 1997; 360:1439-1443.
- [50] Asensio C., Perez-Diaz J.C., Martínez M.C. & Baquero F. A new family of low molecular weight antibiotics from Enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976; 69: 7-14.
- [51] Baquero F. & Moreno F. The microcins. *FEMS Microbiol. Lett.* 1984; 23: 117-124.
- [52] Gendron-Gaillard S., Vignon D., Cottenneau G. *et al.* Isolation, purification and partial amino acid sequence of a highly hydrophobic new microcin named microcin L produced by *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 193: 95-98.
- [53] Salomon R.A. & Fariás R.N., Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 7428-7435.
- [54] Duarte M., Cottenneau G., Portrait V. & Pons AM. Rapid identification of *Escherichia coli* microcin J25 producing strains using polymerase chain reaction and colony blot hybridization. *Can. J. Microbiol./Rev. Can. Microbiol.* 2001; 47 (9): 877-882.
- [55] Sable S., Pons AM., Gendron-Gaillard S. & Cottenneau G. Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(10): 4595-4597.
- [56] Blond A., Peduzzi J., Goulard C., *et al.* The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 1999; 259: 747-755.
- [57] Blond A., Cheminant M., Destoumieux-Garzon D., *et al.* Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structure core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. *Eur J Biochem.* 2002; 269(24):6212-6222.
- [58] Moreno F., Gonzalez-Pastor J.E., Baquero MR., Bravo D. The regulation of microcin B, C and J operons. *Biochimie.* 2002; 84 (5-6): 521-529.
- [59] Salomón R.A. & Fariás R.N. Influence of iron on microcin 25 production. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994; 121: 275-280.
- [60] Delgado M.A., Rintoul M.R., Fariás R.N., Salomon R.A. *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriology* 2001; 183(15): 4543-4550.
- [61] Solbiati, J.O., Ciaccio M., Farias R.N. & Salomón R.A. Genetic analysis of plasmid determinants for microcin 25 production and immunity. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 3661-3663.
- [62] Solbiati, J.O., Ciaccio M., Farias R.N., Gonzalez-Pastor E., Moreno F. & Salomón R.A. Sequence analysis of the four plasmid genes required to produce the circular peptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 2659-2662.
- [63] Salomón R.A. & Fariás R.N. The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *J. Bacteriol.* 1993; 175: 7741-7742.
- [64] Salomon R.A. & Farias R.N. The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *J. Bacteriol.* 1995; 177: 3323-3325.
- [65] Yuzenkova J., Delgado M., Nechaev S., *et al.* Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin J25. *J Biol Chem.* 2002; 277(52):50867-75.
- [66] Carlson S.A., Frana T.S., Griffith R.W. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium exposed to microcin-producing *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(8): 3763-3766.
- [67] Rintoul M.R., de Arcuri B.F., Salomon R.A., Farias R.N., Morero R.D. The antibacterial action of microcin J25: evidence of disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella Newport*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; 204(2): 265-270.

- [68] Blond A., Cheminant M., Ségalas-Milazzo I, *et al.* Solution structure of microcin J25, the single macrocyclic antimicrobial peptide from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 2001; 268: 2124-2133.
- [69] Delgado M.A., Solbiati J.O., Chiuchiolo M.J., Fariás R.N. & Salomon R.A. *Escherichia coli* outer membrane protein TolC is involved in production of the peptide antibiotic microcin J25. *Journal of Bacteriology* 1999; 181(6): 1968-1970.
- [70] Filippone M.P., Diaz Ricci J., Mamaní de Marchese A., Fariás R.N., Castagnaro A. Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Letters* 1999; 459: 115-118.
- [71] Filippone M.P., Diaz Ricci J., Castagnaro A. & Fariás R.N. Effect of fragarin on cytoplasmic membrane of the phytopathogen *Clavibacter michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2001; 14(7): 925-928.
- [72] Denizot & Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods* 1986; 89:271-7.
- [73] Lehrer R.I., Daher K., Ganz T., Sestled M.E. Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. *J. Virol.* 1985; 54: 467-472.
- [74] Beadle J., Kini G., Aldern K., *et al.* Alkylthioglycerol prodrugs of foscarnet: synthesis, oral bioavailability and structure-activity studies on human cytomegalovirus, herpes simplex virus type 1-infected cells. *Antiviral Chem. Chemoter* 9: 33-40.
- [75] Derua R., Gustafson K.R., Pannell L.k., Analysis of the disulfide linkage pattern in circulin A and B, HIV-inhibitory macrocyclic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 228: 632-638.
- [76] Naruse N., Tenmyo O., Kawano K., *et al.* Fluvirucins A1, A2, B1, B2, B3, B4 and B5, new antibiotics active against influenza A virus. *J. Antibiot.* 1991; 44: 733-740.
- [77] De Solutrait V.R., Caumont A., Parissi V., *et al.* A novel short peptide is a specific inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J Mol Biol.* 2002; 318(1):45-58.

Abreviaturas

ACP	Acción citopática	MC	medio de crecimiento
ADN	ácido desoxirribonucleico	MEM	medio mínimo esencial
ARN	ácido ribonucleico	m.i	multiplicidad de infección
AG-P	acilguanósina monofosfato	MM	medio de mantenimiento
AG-PPP	acilguanósina trifosfato	MTT	bromuro de (3-[4,5-dimetiltiazol-2il-2,5-difeniltetrazolio)
AZT	azidovudina	OMS	organización mundial de la salud
CC₅₀	concentración citotóxica cincuenta	p.i	post-infección
CE₅₀	concentración efectiva cincuenta	PM	peso molecular
CMV	citomegalovirus	PV	virus de la poliomiéлитis
DEN-2	virus dengue	SARV	virus del sarampión
FHA	fiebre hemorrágica argentina	SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
HSV	virus Herpes simplex	TAC	virus tacaribe.
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana	TK	timidin kinasa
IS	índice de selectividad.	UFP	unidades formadoras de placas
LCM	coriomeningitis linfocitaria	VJ	virus junín
mg/ml	microgramo por mililitro	VSV	virus de la estomatitis vesicular
mM	micromolar	VZV	virus de la varicela zoster.
MccJ25	Microcina J25		