

Polisacáridos sulfatados de algas verdes marinas *Codium vermilara*, *Cladophora falklandica* y *Penicillus capitatus* inhiben la infección por virus del herpes simple, sin presentar actividad citotóxica.

MN Matos¹, CA Pujol², PV Fernández^{3,4}, PX Arata³, M Ciancia^{3,4}

1 Centro para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR), Centro Nacional Patagónico, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CCT CENPAT – CONICET), Blvd. Brown 2915, U9120ACD Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

2 Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Instituto de Química Biológica (IQUIBICEN), Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Virología, Ciudad Universitaria, 1428, Buenos Aires, Argentina.

3 Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Departamento de Biología Aplicada y Alimentos, Cátedra de Química de Biomoléculas, Av. San Martín 4453, C1417DSE Buenos Aires, Argentina.

4 CONICET-Universidad de Buenos Aires, Centro de Investigación de Hidratos de Carbono (CIHIDECAR, subsede), Av. San Martín 4453, C1417DSE Buenos Aires, Argentina.

Recibido:

Recibido en: 25/03/2025

| Aceptado:

Aceptado en: 20/11/2025

Contacto: MN Matos - marina.matos@conicet.gov.ar

Resumen

Las infecciones por los virus del herpes simple tipo 1 y 2 presentan una alta prevalencia a nivel mundial. El virus del herpes simple tipo 1 se transmite principalmente de forma oral, causando infecciones alrededor de la boca, pero también herpes genital. El virus del herpes simple tipo 2 se transmite, en forma casi exclusiva, sexualmente; produciendo infecciones genitales o anales. Ambos virus pueden generar infecciones diseminadas y de mayor gravedad. En la actualidad no existen vacunas para prevenir la infección y los tratamientos disponibles tienen eficacia limitada, por lo cual, es necesario el desarrollo de nuevas drogas, ya sea para su uso combinado con las existentes, o para reemplazarlas. Los polisacáridos sulfatados son interesantes compuestos para tener en cuenta en la búsqueda de actividades biológicas con aplicación en salud humana. En este trabajo se estudiaron 5 polisacáridos sulfatados obtenidos de extractos acuosos de algas verdes: Cv1 y Cv2 de *Codium vermilara*, Cf1 y Cf2 de *Cladophora falklandica* y Pc1 de *Penicillus capitatus*. Ninguno de los extractos presentó actividad citotóxica sobre células Vero. Se estudió la capacidad de los polisacáridos de inhibir la infección de células Vero por el virus del herpes simple tipo 1. Las fracciones mostraron un amplio espectro de actividad antiviral: Cv2 baja; Cf2 moderada; Cf1 y Pc1, alta; mientras que Cv1 fue la fracción con mayor actividad y, por lo tanto, se la ensayó contra el virus del herpes

simple tipo 2, mostrando también elevada actividad antiviral. Cv1 está compuesto principalmente por un β -L-arabinano altamente sulfatado con unidades piranósicas, en las que las uniones se producen entre los átomos de carbono 1 y 3. Cf1 también es un β -L-arabinano piranósico altamente sulfatado, pero las uniones entre las unidades de arabinosa se presentan entre los carbonos 1 y 4, y aún estando altamente sulfatado, mostró menor actividad que Cv1. Esto podría deberse, en parte, a las cadenas laterales, compuestas principalmente de β -D-xilosa unida al carbono 2. Estos resultados muestran la importancia que tienen los detalles estructurales en la actividad biológica, estando ésta influenciada no solo por el contenido de sulfato y los monosacáridos constituyentes, sino también por las uniones glicosídicas, posición de los grupos sulfato, ramificaciones laterales, y otras características.

Palabras clave: virus herpes simple, polisacáridos sulfatados, antiviral, macroalgas, bioprospección

Sulfated polysaccharides from green seaweeds *Codium vermilara*, *Cladophora falklandica* y *Penicillius capitatus* inhibit herpes simplex virus infection, without cytotoxic activity.

Summary

Herpes simplex virus type 1 and 2 infections have a high prevalence worldwide. Herpes simplex virus type 1 is mainly transmitted by oral-to-oral contact and causes infection in or around the mouth, but it is also a genital herpes. Herpes simplex virus type 2 is almost exclusively sexually transmitted, causing infection in the genital or anal area. Both viruses can cause severe and disseminated infections. There are no vaccines to prevent the infection and the treatments available have a limited efficacy. Thus, the development of new drugs for combined treatment with existing ones, or to replace them is already in demand. Sulfated polysaccharides are interesting compounds to be considered in the search for biological activities with application in human health. In this work, five sulfated polysaccharides with different structural features, obtained from aqueous extracts from green algae were studied: Cv1 and Cv2 from *Codium vermilara*, Cf1 and Cf2 from *Cladophora falklandica*, and Pc1 from *Penicillius capitatus*. None of them showed cytotoxic activity against Vero cells. The ability of fractions to inhibit Vero cell infection by herpes simplex virus type 1 was analyzed. Fractions showed a broad spectrum of inhibitory activity: Cv2, low; Cf2 moderate; Cf1 and Pc1, high, while Cv1 showed the highest activity and therefore it was also tested against Herpes Simplex Virus type 2 showing high activity too. The major structure in Cv1 was a highly sulfated pyranosic 3-linked β -L-arabinan, while Cf1 was also a sulfated pyranosic β -L-arabinan, but the arabinose units were 4-linked and, in spite of its higher sulfate content, it was less active. This could be due to its side chains, comprising mostly single stubs of β -D-xylose linked to the carbon in position 2. This and other structure-activity considerations show the importance of structural details on the activity, not restricted to sulfate content and monosaccharide composition, but also glycosidic linkage types, sulfation sites, backbone ramifications, and so on.

Keywords herpes simplex virus, sulphated polysaccharides, antiviral, macroalgae, bioprospection.

Introducción

Los virus del herpes simple (VHS) tipo 1 (VHS-1) y tipo 2 (VHS-2), son virus envueltos de ADN de doble cadena, pertenecen al orden Herpesvirales, familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae. El VHS-1 es transmitido principalmente de forma oral, mientras que el VHS-2 es un virus de transmisión sexual. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, en 2020 se registraron 3800 millones de personas menores de 50 años (64 % de la población mundial) con infección por el VHS-1 y 520 millones de personas de 15 a 49 años (13 % de la población mundial) con infección por VHS-2 [1]. La infección por VHS se

presenta generalmente con lesiones cutáneas. En la etapa aguda, los virus infectan las células epiteliales y luego quedan en su fase latente en células nerviosas, pudiendo ocurrir eventuales brotes como consecuencia de factores ambientales y alteraciones del sistema inmune, que producen un desbalance en la relación virus-hospedador [2]. Además, pueden producir infecciones de mayor gravedad a nivel de otros tejidos. En pacientes inmunocomprometidos, existe una progresión a formas severas de la enfermedad: neumonía, hepatitis, encefalitis y meningitis linfocitaria [3]. La infección por VHS en neonatos es muy severa, con gran morbimortalidad. En recién nacidos que no reciben tratamiento, la mortalidad es mayor que 60 % y se producen infecciones diseminadas y a nivel del sistema nervioso central [2,3]. Por otro lado, la infección por VHS-2 aumenta el riesgo de adquirir infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) [4]. Además, algunos estudios relacionan la infección con VHS con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas [2].

En la actualidad no hay vacunas para prevenir la infección por VHS-1 y VHS-2. Los agentes quimioterapéuticos desarrollados y en desarrollo para tratar las infecciones por VHS pueden clasificarse en tres categorías: virucidas, antivirales e inmunomoduladores [3]. Los agentes virucidas (detergentes, solventes orgánicos, nanopartículas, radiación UV) se aplican de forma tópica para evitar la transmisión del virus. Los antivirales actúan sobre distintas etapas de la replicación viral, impidiendo o reduciendo la formación de nuevos viriones. En la actualidad existen fármacos disponibles comercialmente: aciclovir, famciclovir, valaciclovir, penciclovir y docosanol [5,6]. Por último, los inmunomoduladores (interferones, inosina pranobex y óxido de zinc) actúan sobre el sistema inmune, potenciando una respuesta que permita eliminar los virus de forma más eficiente [3]. Aunque se han estudiado muchos compuestos, no tienen la eficacia deseable y, por otro lado, para el aciclovir, que es el fármaco más utilizado en la actualidad, se ha observado el desarrollo de resistencia, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, que deben recibir tratamiento de forma recurrente [3]. Por ello, es necesario seguir trabajando en el desarrollo de estrategias para el tratamiento y la prevención de infecciones por VHS.

Los organismos marinos poseen una gran diversidad de compuestos de interés para la búsqueda y estudio de actividades biológicas, entre ellas, la antiviral [7]. Se han descrito para polisacáridos sulfatados (PSS) de algas una amplia variedad de actividades biológicas: antivirales, antibacterianas, anticancerígenas, inmunomoduladoras, entre otras [8]. Algunas de estas actividades son consecuencia de las similitudes estructurales que hay entre los PSS y los glicosaminoglicanos (GAG) presentes en las membranas celulares. Si bien ha sido ampliamente descrita la actividad anti herpética de PSS de algas rojas y pardas [7,9,10-13], los PSS provenientes de algas verdes fueron menos estudiados [14,15]. En este trabajo evaluamos la actividad citotóxica y la capacidad de inhibir la infección por VHS de cinco PSS (Cv1, Cv2, Cf1, Cf2 y Pc1), obtenidos a partir de extractos acuosos de tres especies de algas verdes: *Codium vermilara*, *Cladophora falklandica* y *Penicillius capitatus*. Estos PSS poseen composición química y características estructurales diferenciales, lo que, en principio, permitiría relacionar estructura y con actividad biológica. Cv1 está compuesto principalmente por un β -L-arabinano altamente sulfatado con unidades piranósicas, en las que las uniones se producen entre los átomos de carbono 1 (C1) y 3 (C3) de las unidades de arabinosa. Cv2 está compuesto por un β -D-galactano altamente sulfatado con unidades de β -manosa en el carbono 4 (C4). Cf1, al igual que Cv1, está constituido principalmente por un β -L-arabinano altamente sulfatado con unidades piranósicas, pero, a diferencia de Cv1, las uniones glicosídicas están en C4, tiene un menor porcentaje de galactosa, y tiene β -D-xilosa en C2. El constituyente principal de Cf2, al igual que Cf1, es un β -L-arabinano sulfatado con unidades piranósicas unidas en C4, con β -D-xilosa en C2, pero con un mayor porcentaje de β -L-galactosa y un menor porcentaje de sulfato. Pc1 es un β -D-galactano altamente sulfatado con uniones en C3, otros monosacáridos están en trazas.

Materiales y métodos

Muestreo de algas

Especímenes de *Codium vermilara* fueron colectadas en San Antonio Oeste (Buenos Aires, Argentina) [16]. *Cladophora falklandica* (J.D. Hooker & Harvey) fue colectada en Punta Este (Puerto Madryn, Chubut, Argentina) ($42^{\circ}46'48''$ S, $64^{\circ}57'$ O) [17]. *Penicillus capitatus* fue colectada en Chichiriviche (Falcón, Venezuela) ($10^{\circ}24'24''$ N, $68^{\circ}15'1''$ O) [18]. Las algas fueron lavadas con agua de mar y se verificó la ausencia de epífitas y epibiontes por observación bajo lupa (Nikon AFX-I, Nikon, Japón).

Obtención de extractos y fraccionamientos

Se obtuvieron extractos y fracciones de los especímenes de *Penicillus capitatus* como detallan Arata y col. [18]. Brevemente, a partir de las algas secas y pulverizadas se realizó una extracción con metanol a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y sobre el precipitado se realizó una extracción con agua destilada a temperatura ambiente. Dicho extracto fue liofilizado y luego de disolverlo en agua, se realizó un fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico, utilizando una resina DEAE-Sephadex A25. Se realizaron eluciones con agua y luego con soluciones de NaCl en concentraciones crecientes hasta 4 M. Se cuantificó el contenido de azúcares en los eluidos por el método fenol-sulfúrico [19]. Se obtuvieron siete fracciones. Para este trabajo se utilizó la fracción 6, eluida con NaCl 1,5 M, denominada P_{c1}, que fue caracterizada previamente [18].

Se obtuvieron extractos y fracciones de *Cladophora falklandica* como detallan Arata y col. [17]. A partir de las algas secas, se realizó una extracción con etanol 70 % (tres horas a temperatura ambiente), y luego tres extracciones sucesivas con agua (18 h a temperatura ambiente). A partir del segundo extracto acuoso se obtuvieron fracciones mediante cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sephadex A25. Se realizaron eluciones con agua y con concentraciones crecientes de NaCl. Se obtuvieron 11 fracciones. Para este trabajo se utilizaron la fracción eluida con NaCl 0,5 M (C_{f1}) y la eluida con NaCl 2 M (C_{f2}), caracterizadas previamente [17].

Especímenes de *Codium vermilara* fueron secados y pulverizados y se obtuvieron extractos y fracciones de éstos, como detallan Ciancia y col. [16] y Fernández y col. [19], y de forma análoga a la detallada anteriormente. Se realizó una extracción con etanol, luego dos extracciones con agua a temperatura ambiente y luego se realizó una extracción con agua a 90 °C durante tres horas [16]. A partir del primer extracto realizado a temperatura ambiente y el primer extracto obtenido con agua caliente, se realizaron fraccionamientos por cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sephadex A25, eluyendo con gradiente de salinidad con concentraciones de NaCl de 0 a 4 M [19]. En este estudio se utilizaron las fracciones eluidas con NaCl 1,5 M del primer extracto (C_{v1}) y NaCl 2 M del segundo (C_{v2}), ambas caracterizadas previamente [16,19].

Células y virus

Células Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) fueron cultivadas en Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM, GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 5 %. Para el mantenimiento de las células se redujo la concentración de suero a 1,5 %. Los virus VHS-1 cepa F y VHS-2 cepa G se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA).

Actividad citotóxica sobre células Vero

Se evaluó la toxicidad de las fracciones sobre células Vero utilizando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, SigmaAldrich) [20]. En placas de 96 pocillos con células confluentes en monocapa, se agregaron, por duplicado, diluciones seriadas al medio de los PSS en estudio, en MEM con SFB 5 % (concentraciones entre 1000 y 31 ?g/ml). Se incluyeron controles con células sin el agregado de PSS. Se incubaron 48 h a 37 °C, en estufa con una atmósfera de CO₂ 5 %. Para el revelado se agregó MTT 50 ?g/ml y se determinó la absorbancia a 570 nm. Se calculó la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) como la concentración de los PSS en estudio que produce una reducción de la viabilidad celular en un 50 %. Se determinó la viabilidad como se indica:

$$\text{Viabilidad} (\%) = \frac{\text{Absorbancia de las células expuestas a los PSS}}{\text{Absorbancia de las células control}} \times 100$$

Además, se evaluó el posible efecto de los PSS en la adherencia y proliferación de células Vero. Para ello, se incubaron las células con los PSS (500 ?g/ml), por triplicado, en medio MEM con SFB 5%. Luego se colocaron en placas de 96 pocillos (5,0 x 10⁴ células/pocillo) y se incubaron por 24 h a 37°C en atmósfera con CO₂ 5 %. Se observó el aspecto de todas las células al microscopio con aumento 400 x. Se lavaron las células para retirar el sobrenadante y células no adheridas, y posteriormente se levantaron las células de los pocillos por agregado de tripsina 0,05 % p/v y agitación. Se realizó el recuento de las células recuperadas de todos los pocillos en cámara de Neubauer, utilizando azul tripán como colorante vital. Los resultados se expresaron como número total de células por pocillo.

Actividad antiviral

Se mezclaron los PSS en estudio (diluciones seriadas en concentraciones de 200 a 3,1 µg/ml) con 70 unidades formadoras de placas (UFP) de los VHS-1 (cepa F). Se colocaron luego sobre células Vero confluentes en monocapa, en placas de 24 pocillos. Se incubaron durante una hora a 37 °C, en atmósfera de 5 % CO₂ para permitir la adsorción de los viriones a las células. Se incluyeron controles celulares con células, sin VHS-1 y sin PSS, y controles virales con VHS-1 y sin PSS. Posteriormente, se remplazó el inóculo por MEM con metilcelulosa 1 %, y se incubaron a 37°C, 48 - 72 h, en atmósfera de 5% CO₂. Luego, se fijaron las células con formol 10 %, se lavaron y tiñeron con cristal violeta. Se realizó el recuento de las placas de lisis y se determinó la concentración de los PSS que produce una reducción en un 50% de las placas de lisis, respecto al control (concentración inhibitoria 50, CI₅₀). En los casos en los que la inhibición de la lisis fue menor al 50 %, no se pudo calcular la CI₅₀, por lo tanto, se expresaron los resultados como inhibición (%) de la formación de placas de lisis con una concentración de PSS de 200 µg/ml, que fue la mayor concentración ensayada. Los ensayos se realizaron por triplicado. Finalmente, se evaluó la actividad anti VHS-2 (cepa G) de los PSS que presentaron una actividad anti-VHS-1 alta. El ensayo se realizó de forma análoga a la realizada con VHS-1. Para el cálculo de CI₅₀, se construyó una curva dosis-respuesta del porcentaje de inhibición de la formación de placas en función del logaritmo de la concentración de los PSS, y se estimó la CI₅₀ mediante regresión no lineal. Se calculó el índice de selectividad (IS) como CC₅₀/CI₅₀ [11].

Estadística

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software Graph Pad Prism versión 5. Para evaluar diferencias entre los tratamientos se usó Análisis de la Varianza (ANOVA). Se consideraron diferencias significativas con p < 0,5.

Resultados

Actividad citotóxica sobre células Vero

Ninguno de los PSS presentó citotoxicidad sobre células Vero en el rango de concentraciones estudiado. La viabilidad fue algo menor en todos los tratamientos respecto a los controles (Figura 1A). Sin embargo, dicha reducción fue leve y no se observaron diferencias significativas, ni un marcado efecto dosis dependiente. Todos los PSS presentaron una CC50 (concentración que reduce la viabilidad celular en un 50 % de las células) > 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En el ensayo de adherencia, en el que las células Vero fueron incubadas con los PSS antes de colocarlas en las placas, todas las células presentaron aspecto normal, independiente del compuesto con el que fueron incubadas. No se observó efecto en la proliferación y/o adherencia de las células estudiadas, presentando todos los tratamientos recuentos similares (Figura 1B).

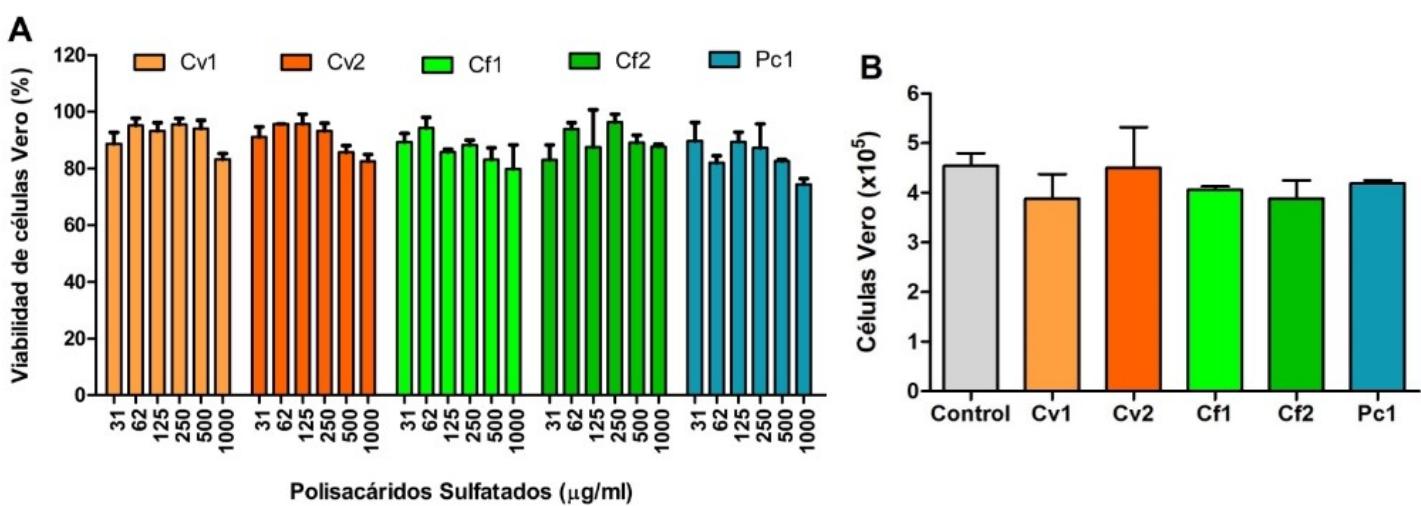


Figura 1: Actividad de los PSS sobre células Vero. A. Viabilidad de células Vero (%) observada en el ensayo de citotoxicidad realizado con el método de MTT. B. Efecto de los PSS en la adherencia y/o proliferación de células Vero. Se muestra el recuento de células Vero adheridas, recuperadas luego de ser incubadas con los PSS (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$), expresado como células totales por pocillo. En ambos paneles se muestran las medias y la desviación estándar.

Actividad antiviral

En la Tabla 1 se indican las características de los PSS estudiados y su actividad anti-VHS-1. Las fracciones estudiadas mostraron un amplio espectro de actividad. La fracción Cv2 mostró muy baja actividad antiviral, con una $\text{Cl}_{50} > 200 \mu\text{g}/\text{ml}$, produciendo una inhibición de la infección de un 15,5 % (desviación estándar, SD: 10,1) a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La fracción Cf2 mostró una actividad moderada ($\text{Cl}_{50} 112 \mu\text{g}/\text{ml}$), y Cf1 y Pc1, alta ($\text{Cl}_{50} 33 \mu\text{g}/\text{ml}$ y $44 \mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente). Cv1 fue la fracción con mayor actividad anti-VHS-1 ($\text{Cl}_{50} 7,34 \mu\text{g}/\text{ml}$, SD 0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, IS >136) (Figura 2) y mostró, además, una importante actividad anti-VHS-2, con una Cl_{50} media de 7,69 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (SD: 0,45 $\mu\text{g}/\text{ml}$); IS > 130.

PSS	Alga	Componentes principales	Composición de los PSS	Características estructurales	Cl_{50} y actividad anti-VHS-1		IS
					Media ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SD ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	

Cv1	<i>Codium vermilara</i>	AT 38% Sulfato 30% Ácido pirúvico 5% Proteínas 3%	Ara 65% Gal 30%	3-?-L-Arap 3,6-?-D-Galp con sulfato en C2 y/o C4 (Ara), C4 (Gal)	7,34	0,7	> 136
Cf1	<i>Cladophora falklandica</i>	AT 49% Sulfato 38%	Ara 65% Xyl 17% Gal 14% Rha 2,5%	4-?-L-Arap con ?-D-Xylp y ?-L-Galf en C2 3,6-?-D-Galp con sulfato en C3 o C2 y C3	32,75	1,6	> 30,5
Pc1	<i>Penicillus capitatus</i>	AT 46% Sulfato 35% Proteínas 1,4%	Gal 95,7% Xyl, Glc, Fuc, Man en trazas.	3-?-D-Galp con sulfato en C2. 4,6-pyrGalp	43,65	3,7	> 22,9
Cf2	<i>Cladophora falklandica</i>	AT 27% Sulfato 20%	Gal 37% Ara 48% Xyl 11% Rha 3,6%	4-?-L-Arap con ?-D-Xylp y ?-L-Galf en C2 3,6-?-D-Galp con sulfato en C3 o C2 y C3	111,6	1,5	> 9,0
Cv2	<i>Codium vermilara</i>	AT 50% Sulfato 38% Proteínas 34%	Gal 67% Man 33%	3,6-?-D-Gal 4-?-Man con sulfato en C2 o C6 (menos frecuente)	> 200	-	-

Tabla 1: Características de los PSS estudiados y su actividad inhibitoria frente a VHS-1. Se indican la composición de los PSS y sus características estructurales, descriptos previamente [16,17,18,19]. Se muestra la actividad inhibitoria in vitro de la infección por VHS-1 en células Vero como concentración inhibitoria 50 (CI50) e índice de selectividad (IS). AT: azúcares totales, Ara: arabinosa, Fuc: fucosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa, Man: manosa, Rha: ramnosa, Xyl: xilosa, pyr: ácido pirúvico p: forma piranósica, f: forma furanósica, SD: desviación estándar.

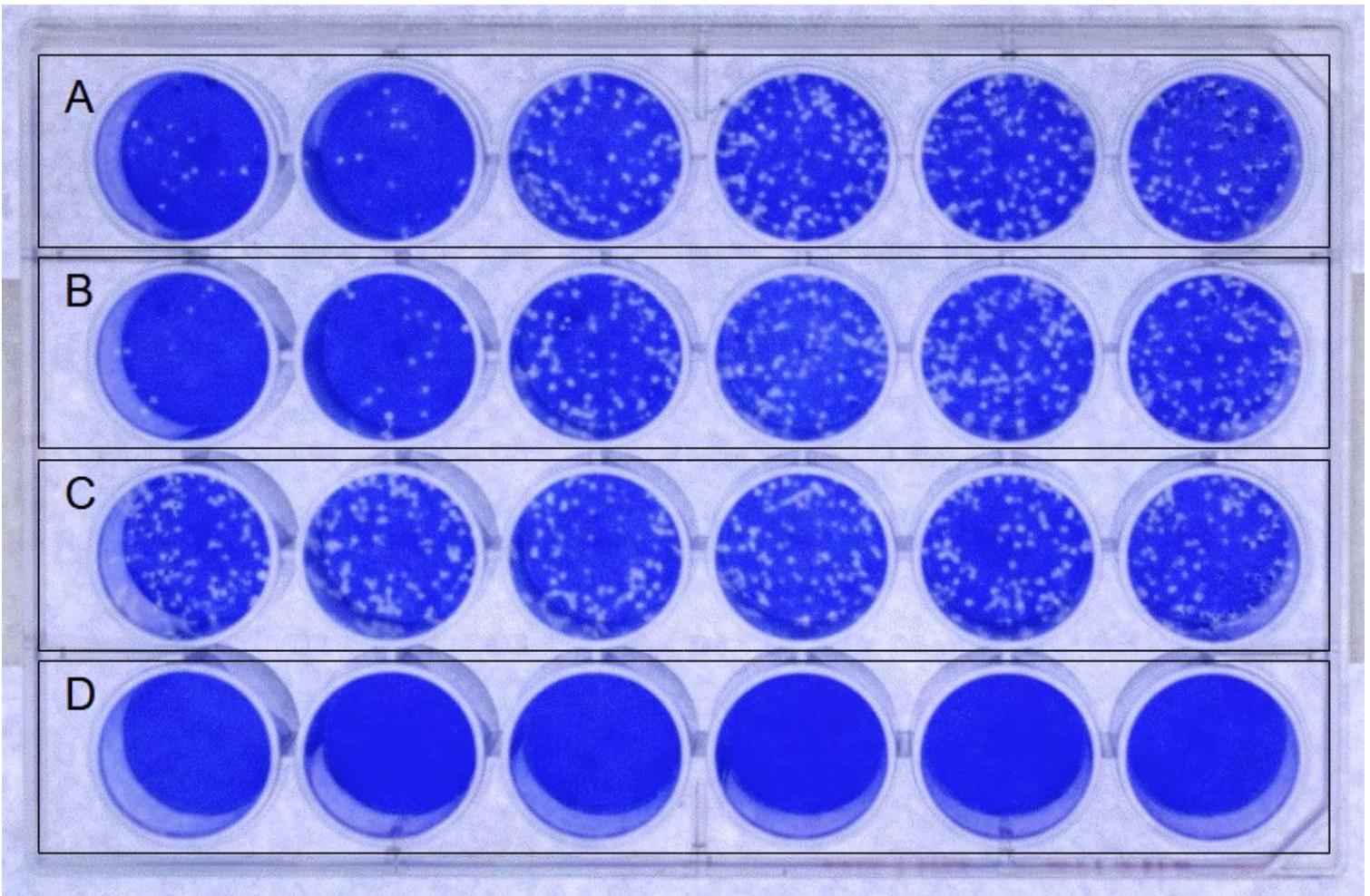


Figura 2: *Ensayo de actividad antiviral.* Se muestra una imagen representativa de los resultados obtenidos en el ensayo de actividad antiviral: una placa de 24 pocillos revelada con violeta cristal, en la que se pueden observar las placas de lisis. La placa incluye dos filas correspondientes a el tratamiento con Cv1 en distintas concentraciones (25 µg/ml; 12,5 µg/ml; 6,2 µg/ml; 3,1 µg/ml; 1,5 µg/ml; 0 µg/ml), por duplicado (A y B); una fila correspondiente a los controles virales, con VHS-1, sin PSS (C); y otra fila que corresponde a controles celulares, sin PSS ni virus (D).

Discusión

La infección por los VHS involucra varias etapas, que han sido descritas en detalle [2,5]. Brevemente, en la etapa de ingreso a la célula, el virus se une a la superficie celular y se produce la fusión de la envoltura con la membrana plasmática. Para ello, el virus se une a la membrana plasmática mediante receptores específicos. Inicialmente, las glicoproteínas gB y gC del VHS se unen a GAG en la superficie celular. Posteriormente, se produce la interacción de gG con receptores de la membrana celular (HVEM y nectina-1), gB con PIRLA y otras proteínas, y gH/gL con integrinas. Luego, se fusiona la envoltura viral con la membrana celular y se produce la endocitosis. A continuación, con intervención de proteínas transportadoras celulares (dineína, dinactina y kinesina), la cápside viral es transportada al núcleo, ingresa el ADN viral y se produce, en el ciclo lítico, la transcripción viral, la replicación del ADN, el ensamblado de la cápside de los viriones y la encapsidación del ADN. Los viriones, previo a salir de la célula, son transportados por el trans Golgi y sistemas de endosomas, donde incorporan proteínas del tegumento y la membrana viral.

Los GAG, necesarios para las etapas iniciales de unión del virus a la célula, son polisacáridos no ramificados que poseen grupos cargados negativamente (ácidos carboxílicos y, muchas veces, sulfato), y

presentan similitudes estructurales con los PSS de algas. Estudios previos han mostrado que los PSS pueden inhibir la replicación viral al unirse a los sitios cargados positivamente de la envoltura viral, necesarios para la unión del virus a los GAG de la superficie celular [7,11,21]. Este mecanismo también explica por qué estos compuestos tienen un amplio espectro de actividad contra virus envueltos: VHS tipo 1 y 2, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), citomegalovirus humano (CMVH), virus del dengue (DENV), virus sincitial respiratorio (VSR), virus del papiloma humano (VPH), virus influenza A, virus influenza H1N1, coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave de tipo 2 (SARS-CoV-2) [11,13,22,23]. Alternativamente, algunos estudios muestran que PSS interfieren también en etapas más tardías de la infección y replicación viral [13,14,15,21,24]. En el ensayo de actividad antiviral realizado en este trabajo, los virus junto con los PSS se agregan a las células y se realiza una incubación para permitir la adsorción de los virus a las células. Por lo cual, los PSS podrían actuar sobre los virus (por ejemplo, uniéndose a gB, gC u otras proteínas) bloqueando su adsorción e ingreso a las células, y/o intervenir en procesos posteriores de la replicación viral (ya que durante la incubación podrían ingresar a la célula). Por lo tanto, no podemos definir la etapa ni el mecanismo por el cual inhiben la infección. Posiblemente, los PSS estudiados actúen en una etapa temprana de la infección inhibiendo la unión del virus a la célula al interactuar con las proteínas del virus involucradas en este proceso. Sin embargo, como se indicó anteriormente, no podemos descartar que los PSS estudiados actúen en otras etapas de la replicación viral, como se ha descrito, en algunos casos, para PSS de algas verdes [14,15].

Analizando de forma comparativa los PSS estudiados, su actividad antiviral, su composición y su estructura, no podemos hallar una correlación clara. Los PSS con mayor actividad fueron Cv1, Cf1 y Pc1, todos provenientes de especies diversas, y con composición y estructuras diversas. El grado de sulfatación por sí solo parecería no correlacionar directamente con la actividad antiviral, presentando Cv1 (el más activo) 30% de sulfato y Cv2 (el de menor actividad) 38% de sulfato. Respecto a la composición en monosacáridos, siendo los PSS con mayor actividad, Cv1 y Cf1 arabinogalactanos y arabinoxilogalactanos, respectivamente, y los de menor actividad, Pc1, Cf2 y Cv2, galactanos, galactoarabinanos, galactomananos, respectivamente; podemos asociar la presencia de arabinosa como azúcar predominante, con una mayor actividad anti-VHS. Sin embargo, se ha descrito alta actividad anti-VHS en PSS conformados por diversos monosacáridos: galactofucanos sulfatados [12,25], ramnanos sulfatados [26], xilomananos sulfatados [27]. La presencia de sulfato en C2 de β -D-Galp, también parecería correlacionar parcialmente con la actividad antiviral, pero tampoco explica, por sí sola el efecto. También, se destaca la presencia de ácido pirúvico en el PSS de mayor actividad (Cv1), lo cual podría indicar que este grupo funcional confiere mayor actividad. Por otro lado, en el presente estudio no se consideró el tamaño molecular, que podría ser otro factor importante. En concordancia con lo observado en este trabajo, Lee y col. estudiaron diez PSS naturales extraídos de algas verdes (ramnanos, galactanos, arabinogalactanos, arabinanos) y cuatro xilanos semisintéticos, obteniendo actividades antiherpéticas importantes en muchos de ellos, sin una correlación aparente con la composición de monosacáridos de éstos [14]. Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad de las moléculas estudiadas y su actividad biológica. Posiblemente, existan varios arreglos y estructuras que, por su distribución de cargas, configuración espacial y conformación en solución puedan interactuar fuertemente con los virus, confiriendo a los compuestos actividad antiviral. Además, hay que considerar, como se mencionó anteriormente, que muchos polisacáridos han mostrado actividad antiviral actuando en distintas etapas de la infección [13,14,15,21,24], con lo cual, no solo sería importante la afinidad de los PSS por las proteínas de membrana virales, sino también su capacidad de actuar sobre otros blancos.

Los PSS estudiados, especialmente Cv1, mostraron una importante actividad inhibitoria frente a la infección por VHS, lo que los hace interesantes para realizar más estudios enfocados en su posible aplicación. Se han realizado estudios de terapia combinada utilizando polisacáridos sulfatados y aciclovir [28,29], así como combinación de otros compuestos [30], mostrando efectos sinérgicos. Los PSS estudiados podrían utilizarse en terapia combinada con aciclovir para tener mejores resultados o con otros compuestos para el tratamiento de cepas resistentes a aciclovir, o el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos, en los que el tratamiento repetitivo con aciclovir genera cepas resistentes. Por otro lado, también serían candidatos interesantes para el estudio de su actividad contra la infección por otros virus envueltos.

Las actividades estudiadas fueron algo menores que las descritas para el aciclovir (IC_{50} para VHS-1 = 1,2 μ g/ml; IS = 1200 [14]. Respecto a la actividad antiherpética de otros PSS, la de los PSS estudiados fue en algunos casos menor, en otros mayor y en otros similar: carragenanos de *Gigartina skottsbergii* (reclasificada como *Sarcopeltis skottsbergii*) presentaron IC_{50} = 1 - 4,1 μ g/ml [9] , fucoidanos de *Scytoniphon lomentaria* IC_{50} = 0,76 – 4,66 μ g/ml [12], fucoidanos de *Adenocystis utricularis*, IC_{50} = 1,25 – 24,73 μ g/ml ; IS = 100 – 3600 [10], PSS de 10 algas verdes: IC_{50} = 0,38 – 49 μ g/ml; IS = 200 – 12000 [14]. Se comparan las IC_{50} en unidades de μ g/ml debido a que no se conocen los pesos moleculares de muchos PSS, y, por lo tanto, las IC_{50} no pueden expresarse en concentraciones molares, lo que permitiría comparar las actividades en términos de unidades moleculares en lugar de masa. Por otro lado, es importante considerar que los PSS poseen múltiples actividades biológicas, entre otras: anticoagulante e inmunomoduladora [8]. Por lo cual, en la bioprospección de PSS para el tratamiento de infecciones virales, además de evaluar la citotoxicidad, es deseable encontrar compuestos con un patrón de actividades adecuado, para minimizar los efectos adversos (por ejemplo, buscando compuestos con baja actividad anticoagulante) y potenciar la actividad buscada in vivo (por ejemplo, con compuestos que además de tener actividad antiviral in vitro, actúen modulando la respuesta inmune generando una mayor eficiencia antiviral in vivo). Considerando esto, los PSS estudiados (en particular Cv1) se presentan como interesantes candidatos para seguir estudiando otras actividades biológicas, a fin de realizar una mejor caracterización de estos antes de realizar estudios in vivo.

Conclusiones

Los PSS estudiados no mostraron actividad citotóxica frente a células Vero, ni tuvieron efecto en su adherencia, y presentaron muy variada actividad antiviral frente a HSV-1. El PSS Cv2 presentó muy baja actividad (casi nula), Cf2 moderada (IC_{50} 112 μ g/ml); Cf1 y Pc1, alta (IC_{50} 33 μ g/ml y 44 μ g/ml, respectivamente), mientras que Cv1 fue la fracción con mayor actividad (IC_{50} 7,34 μ g/ml). Cv1 presentó, a su vez, una alta actividad frente a HSV-2 (IC_{50} 7,69 μ g/ml). Aun presentando todos los PSS estudiados un alto grado de sulfatación, su actividad antiviral fue muy variada, exponiendo la relevancia de características estructurales más finas en su actividad.

El PSS Cv1 mostró ser un blanco interesante para futuros estudios. Por un lado, sería importante realizar estudios que permitan determinar sobre qué etapas de la infección y replicación viral actúa, y realizar estudios moleculares, evaluando la interacción con proteínas del VHS, para esclarecer las características estructurales de compuestos activos. Esto permitiría una búsqueda más direccionalizada de compuestos con esta actividad, así como considerar la generación de compuestos sintéticos o semisintéticos activos. Por otro lado, Cv1 se presenta como posible candidato para futuros estudios con foco en su posible uso terapéutico para la infección por VHS, ya sea como único agente, o como parte de un tratamiento combinado con otros fármacos (por ejemplo, aciclovir).

Financiamiento

El presente trabajo fue financiado por los siguientes proyectos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y la Universidad de Buenos Aires: FONCYT PICT 2016-2777; UBACYT 2018-2020; UBACYT 2018-2020 Mod I, 20020170100347BA y UBACYT 2023-2025 Mod I, 20020220200016BA.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Virus del herpes simple. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>. Accesado 23/03/2025.
2. Zhu S & Viejo-Borbolla A (2021) Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*, 12(1), 2670-2702.
3. Majewska A & Mlynarczyk-Bonikowska B (2022) 40 years after the registration of acyclovir: do we need new anti-herpetic drugs?. *International journal of molecular sciences*, 23(7), 3431.
4. Freeman EE, Weiss HA, Glynn JR, Cross PL, Whitworth JA, Hayes RJ (2006) Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Aids*, 20(1), 73-83.
5. Whitley RJ & Roizman B (2001) Herpes simplex virus infections. *The lancet*, 357(9267), 1513-1518.
6. Hammer KD, Dietz J, Lo TS, Johnson EM (2018) A systematic review on the efficacy of topical acyclovir, penciclovir, and docosanol for the treatment of herpes simplex labialis. *Dermatology*, 6(1), 118-123.
7. Hao C, Xu Z, Xu C, Yao R (2024) Anti-herpes simplex virus activities and mechanisms of marine derived compounds. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1302096.
8. Anand N, Rachel D, Thangaraju N, Anantharaman P (2016) Potential of marine algae (sea weeds) as source of medicinally important compounds. *Plant Genetic Resources*, 14(4), 303-313.
9. Carlucci MJ, Pujol CA, Ciancia M, Noseda MD, Matulewicz MC, Damonte EB, Cerezo AS (1997) Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed Gigartina skottsbergii and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 20(2), 97-105.
10. Ponce NM, Pujol CA, Damonte EB, Flores ML, Stortz CA (2003) Fucoidans from the brown seaweed Adenocystis utricularis: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research*, 338(2), 153-165.
11. Pujol CA, Carlucci MJ, Matulewicz MC, Damonte EB (2007) Natural sulfated polysaccharides for the prevention and control of viral infections. *Bioactive Heterocycles V*, 259-281.
12. Ponce NM, Flores ML, Pujol CA, Becerra MB, Navarro DA, Córdoba O, ... , Stortz CA (2019) Fucoidans from the phaeophyta Scytosiphon lomentaria: Chemical analysis and antiviral activity of the galactofucan component. *Carbohydrate research*, 478, 18-24.
13. Hans N, Malik A, Naik S (2021) Antiviral activity of sulfated polysaccharides from marine algae and its application in combating COVID-19: Mini review. *Bioresource technology reports*, 13, 100623.
14. Lee JB, Hayashi K, Maeda M, & Hayashi T (2004) Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae. *Planta medica*, 70(09), 813-817.
15. Lopes N, Ray S, Espada SF, Bomfim WA, Ray B, Faccin-Galhardi LC, ... , Nozawa C (2017) Green seaweed Enteromorpha compressa (Chlorophyta, Ulvaceae) derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex virus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 605-612.
16. Ciancia M, Quintana I, Vizcargüénaga MI, Kasulin L, de Dios A, Estevez JM, Cerezo AS (2007) Polysaccharides from the green seaweeds Codium fragile and C. vermilara with controversial effects on hemostasis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41(5), 641-649.
17. Arata PX, Quintana I, Raffo MP, Ciancia M (2016) Novel sulfated xylogalactoarabinans from green seaweed Cladophora falklandica: Chemical structure and action on the fibrin network. *Carbohydrate polymers*, 154, 139-150.
18. Arata PX, Quintana I, Canelón DJ, Vera BE, Compagnone RS, Ciancia M (2015) Chemical structure and anticoagulant activity of highly pyruvylated sulfated galactans from tropical green seaweeds of the order Bryopsidales. *Carbohydrate polymers*, 122, 376-386.
19. Fernández PV, Estevez JM, Cerezo AS, Ciancia M (2012) Sulfated ?-d-mannan from green seaweed Codium vermilara. *Carbohydrate polymers*, 87(1), 916-919.
20. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
21. Wang W, Wang SX, Guan HS (2012) The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview. *Marine drugs*, 10(12), 2795-2816.
22. Talarico LB, Pujol CA, Zibetti RGM, Faría PCS, Noseda MD, Duarte MER, Damonte EB (2005) The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral research*, 66(2-3), 103-110.
23. Kwon PS, Oh H, Kwon SJ, Jin W, Zhang F, Fraser K, ... , Dordick JS (2020) Sulfated polysaccharides effectively inhibit SARS-CoV-2 in vitro. *Cell discovery*, 6(1), 50.
24. Yan H, Wang J, Yang J, Xu Z, Li C, Hao C, ... , Wang W (2023) Inhibition effects and mechanisms of marine polysaccharide PSSD against herpes simplex virus type 2. *Marine Drugs*, 21(6), 364.
25. Jana S, Dyna AL, Pal S, Mukherjee S, Bissochi IMT, Yamada-Ogatta SF, ... , Ray, S (2024) Anti-respiratory syncytial virus and anti-herpes simplex virus activity of chemically engineered sulfated fucans from Cystoseira indica.

- Carbohydrate Polymers*, 337, 122157.
26. **Lee JB, Koizumi S, Hayashi K, Hayashi T** (2010) Structure of rhamnan sulfate from the green alga Monostroma nitidum and its anti-herpetic effect. *Carbohydrate Polymers*, 81(3), 572-577.
27. **Ray S, Pujol CA, Damonte EB, Ray B** (2015) Additionally sulfated xylomannan sulfates from Scinaia hatei and their antiviral activities. *Carbohydrate polymers*, 131, 315-321.
28. **Pancheva SN** (1993) Antiherpes effect of dextran sulphate combined with acyclovir in vitro and in vivo. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 4(3), 189-191.
29. **Pacheco-Quito EM, Ruiz-Caro R, Rubio J, Tamayo A, Veiga MD** (2020) Carrageenan-based acyclovir mucoadhesive vaginal tablets for prevention of genital herpes. *Marine drugs*, 18(5), 249.
30. **Gaikwad M, George A, Sivadas A, Karunakaran KNS, Byradreddy SN, ... , Kulkarni M** (2024) Development and characterization of formulations based on combinatorial potential of antivirals against genital herpes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1-15.

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Volumen 24, Número 3, Diciembre de 2025

ID artículo:E0298

DOI: 10.62167/qv.e0298

Versión online