



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



Rol de extractos ricos en fucoidanos en infecciones de origen viral

Estudiante: Golovca Céspedes, Tatiana Noemí

Directora: Dra. Ayala Peña, Victoria

Bahía Blanca

Año 2025

Fecha de defensa oral: 7 de Noviembre, 2025



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



Rol de extractos ricos en fucoidanos en infecciones de origen viral

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Tatiana Golovca

Firma del Alumno/a

Victoria Ayala

Firma del Director/a

Título abreviado: Estudio de compuestos de origen natural sobre infecciones virales



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA



Role of fucoidan-rich extracts in viral infections

BACHELOR'S THESIS IN BIOLOGICAL SCIENCES

Short title: Study of compounds of natural origin on viral infections

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, quiero agradecer a la Universidad Nacional del Sur y a sus docentes, por brindar una enseñanza de excelencia, por transmitir su amor y pasión por la biología, y por ser un espacio que sentí como mi casa durante tantos años.

Quiero agradecer profundamente a mis papás, por darme la oportunidad de estudiar lo que realmente me apasiona, por ser mi apoyo incondicional y por enseñarme con su ejemplo a nunca bajar los brazos, incluso en los momentos más difíciles. Por su confianza, cariño y por alentarme siempre a seguir.

A mis amigos de siempre, que, aunque estén lejos, siempre se sienten cerca, gracias por su compañía, por las risas compartidas y por ser un refugio en los momentos complicados.

A mis facuamigos, por hacer que el recorrido de la carrera sea más llevadero y divertido. Gracias por acompañarme, por las rondas de mate salvadoras, por los consejos, las charlas interminables y por compartir cada logro y desafío en estos años.

A Fran, mi novio, por su apoyo incondicional, por cada palabra de aliento, por creer en mí incluso en los momentos más difíciles y por estar presente en todas las etapas de este proceso. A su familia, gracias por recibirme siempre con tanto cariño y generosidad.

A Vicky, mi directora, por su guía, paciencia y entusiasmo constante, por enseñarme no solo técnicas y conocimientos, sino también el valor de la dedicación y la pasión por la ciencia.

A Sole Araujo, mi docente consejera, por estar siempre disponible para resolver mis dudas y orientarme en cada paso del camino.

Agradezco a Fernando Dellatorre, Ezequiel Latour, Andrea Ponce, Veronica Lassalle y Karina Salvatierra, por brindarme material e información esencial para la realización de esta tesis.

A Cybele y Claudia, del Laboratorio de Estrategias Antivirales en la UBA, por recibirme en su laboratorio y por acompañarme en esta etapa de formación, compartiendo sus conocimientos y experiencia, lo que fue clave para la realización de este trabajo.

A mi team de Mostacho, gracias por este año de trabajo en conjunto, por permitirme ser parte de esta familia que crece día a día, por el apoyo mutuo, y la motivación constante.

Por último, pero no menos importante, a Kael, por acompañarme desde el inicio de la carrera, por las noches sin dormir juntos, por su compañía silenciosa y constante.

RESUMEN

Dada la diversidad de agentes virales causales de morbi-mortalidades, la constante emergencia viral, los efectos adversos de tratamientos convencionales antivirales y la creciente resistencia asociada a ellos, se evidencia la necesidad de contar con nuevos agentes más eficientes, de origen natural y de bajo costo como materia prima, proponiéndolas como formulaciones médicas-sanitarias a aplicar en el sector de salud pública para revertir o atenuar este problema. En este contexto, esta tesis se estructura en tres secciones:

I) Extractos ricos en fucoidanos, provenientes del alga *Myriogloea major*. Los resultados de esta tesis, demuestran que ellos presentan; actividad antiviral contra HSV-1, mayor citotoxicidad en células HeLa (células transformadas por el virus HPV) que en células Vero (células no transformadas) y reducen la migración celular en HeLa.

II) Extractos ricos en polifenoles, obtenidos la de yerba mate (*Ilex paraguariensis*). En este trabajo se determinó que éstos presentan un gran potencial anti-virus Dengue. Además, resultaron más citotóxicos en células tumorales HeLa pero no en células no transformadas.

III) Geles poliméricos a base de quitosano con nanopartículas de óxido de zinc, gelatina, goma arábica, morina y magnetita. Se observó la reducción de coronavirus Bovino fue superior en hidrogeles combinados que en sus productos de partida.

Palabras clave: Antivirales, Biomateriales, Citotoxicidad

ABSTRACT

Given the diversity of viral agents causing morbidity and mortality, the constant viral emergence, the adverse effects of conventional antiviral treatments, and the growing resistance associated with them, there is a clear need for new, more efficient, and low-cost agents as raw materials. These agents are proposed as medical-health formulations for use in the public health sector to reverse or mitigate this problem. In this context, this thesis is structured in three sections:

I) Extracts rich in fucoidans from the algae *Myriogloea major*. The results of this thesis demonstrate that these extracts exhibit antiviral activity against HSV-1, greater cytotoxicity in HeLa cells (cells transformed by the HPV virus) than in Vero cells (non-transformed cells), and reduce cell migration in HeLa cells.

II) Extracts rich in polyphenols obtained from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). In this study, it was determined that these extracts have significant anti-dengue virus potential. Furthermore, they were more cytotoxic to HeLa tumor cells but not to non-transformed cells.

III) Chitosan-based polymer gels with zinc oxide nanoparticles, gelatin, gum arabic, morin, and magnetite. The reduction in bovine coronavirus was observed to be greater in the combined hydrogels than in their starting products.

Keywords: Antiviral, Biomaterials, Cytotoxicity

ÍNDICE

SECCIÓN 1:"FUCOIDANOS COMO ANTIVIRALES FRENTE A GENITOVIRUS"	9
INTRODUCCIÓN DE LA SECCIÓN 1.....	9
• VIRUS HERPES SIMPLEX (HSV)	9
• VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	10
• FUCOIDANOS PROVENIENTES DE <i>MYRIOGLOEA MAJOR</i>	12
OBJETIVOS DE LA SECCIÓN 1	14
MATERIALES Y MÉTODOS DE LA SECCIÓN 1.....	14
• Extractos de fucoidanos	14
• Líneas celulares.....	15
• Criopreservación y descongelado.....	16
• Cultivo celular y repique	16
• Ensayos de Citotoxicidad.....	16
• Ensayos Antivirales.....	17
• Ensayo de migración celular	17
• Análisis estadístico.....	18
RESULTADOS DE LA SECCIÓN 1	18
• Efecto de extractos de fucoidanos-Ensayos de citotoxicidad y acción antiviral	18
• Efecto del extracto madre de <i>M. major</i> sobre la capacidad migratoria de células transformadas por HPV	19
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN 1.....	21
SECCIÓN 2:"EXTRACTOS PROVENIENTES DE YERBA MATE COMO ANTIVIRALES FRENTE A DENGUE"	22

INTRODUCCIÓN DE LA SECCIÓN 2.....	22
• VIRUS DEL DENGUE.....	22
• YERBA MATE (<i>ILEX PARAGUARIENSIS</i>).....	25
OBJETIVOS DE LA SECCIÓN 2.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS DE LA SECCIÓN 2.....	26
• Extractos de yerba mate	26
• Línea celular y ensayos de citotoxicidad.....	27
• Virus DENV	27
• Ensayo de la actividad antiviral de los extractos de yerba mate sobre DENV-2	27
RESULTADOS DE LA SECCIÓN 2	28
• Efecto de los extractos de yerba sobre DENV-2	28
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN 2.....	30
SECCIÓN 3: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI CORONAVIRUS DE BIOMATERIALES”	32
INTRODUCCIÓN DE LA SECCIÓN 3.....	32
• CORONAVIRUS BOVINO	32
• HIDROGELES.....	33
OBJETIVOS DE LA SECCIÓN 3.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS DE LA SECCIÓN 3.....	35
• Hidrogeles	35
• Evaluación de la actividad antiviral en hidrogeles:.....	35
RESULTADOS DE LA SECCIÓN 3	36
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN 3.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38

SECCIÓN 1:"FUCOIDANOS COMO ANTIVIRALES FRENTE A GENITOVIRUS"

INTRODUCCIÓN DE LA SECCIÓN 1

- **VIRUS HERPES SIMPLEX (HSV)**

Los Herpesvirus y principalmente HSV-1 y HSV-2 (herpes simplex virus tipo 1 y 2) representan un desafío significativo para la salud pública debido a su alta prevalencia en la sociedad, sus efectos patológicos y las limitaciones en los tratamientos antivirales vigentes disponibles (Looker y col., 2015). Dada su elevada prevalencia y la posibilidad de recurrencias de las lesiones provocadas es que este tipo de virus genera un gran gasto público en salud. Las manifestaciones de las infecciones por estos virus pueden ser leves hasta provocar enfermedades graves como la encefalitis mortal. Si bien existen fármacos, como el Aciclovir, su uso se ve restringido por la aparición de resistencia farmacológica, su toxicidad y efectos secundarios, además de estar contraindicados en ciertos grupos poblacionales, como mujeres embarazadas, recién nacidos, adultos mayores (Burrell y col.,2020; ElHassan y col.,2023). Ante estas circunstancias, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas seguras y eficaces se ha vuelto prioritaria.

Los virus de la familia *Herpesviridae* están compuestos por genoma de ADN de doble cadena, bicatenario, de aproximadamente 152 kb, que codifican para más de 80 proteínas virales. Su genoma está contenido en una cápside de simetría icosaédrica, la cual está envuelta por una bicapa lipídica que contiene glicoproteínas virales que permiten la unión e ingreso a las células blanco (Madigan y col., 2021) (**Figura 1**).

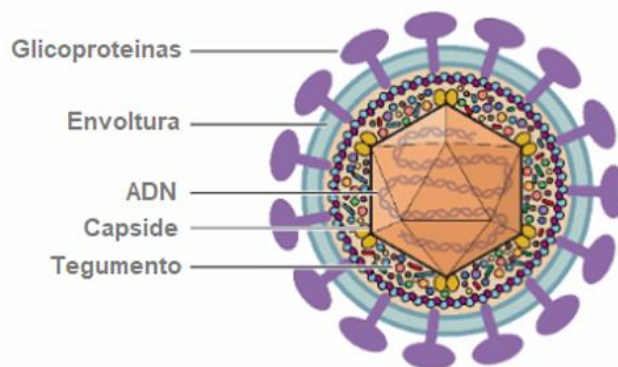


Figura 1. Estructura de virion de HSV. Adaptado de Zhu S. y Viejo-Borbolla A., 2021.

El HSV-1 y 2 puede infectar a casi cualquier tipo de célula en el hombre. En el caso de las células endoteliales y fibroblastos, la infección es lítica, pero en neuronas puede permanecer latente. El

ciclo de infección de estos virus es complejo y puede involucrar infección primaria, latencia y reactivación. El ciclo vírico general involucra:

-Adsorción: El virus se une a receptores específicos de la célula hospedadora mediante glicoproteínas de su envoltura fusionando la membrana viral con la celular permitiendo la entrada del genoma viral al citoplasma.

- Replicación y transcripción: La cápside es transportada al núcleo celular donde se libera el ADN viral. Allí el genoma viral se circulariza y se transcriben genes de proteínas tempranas. Las proteínas tempranas inducen la transcripción de genes de proteínas intermedias, las cuales desempeñan un papel fundamental en la síntesis y replicación del ADN viral facilitando la formación de concatémeros, moléculas de ADN que contiene copias múltiples de una misma secuencia de nucleótidos dispuestas en serie. Posteriormente, se transcriben los genes tardíos, importantes para la producción de proteínas estructurales. Estas proteínas tardías participan en el ensamblaje de viriones, permitiendo la formación de nuevas partículas virales.

-Ensamble y salida: La nucleocápside viral se ensambla en el núcleo y adquiere nuevamente su envoltura en el retículo endoplasmático del hospedador y son liberadas de la célula por exocitosis o por lisis celular.

- **VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

El virus del papiloma humano (HPV) pertenece a la familia *Papillomaviridae* y constituye una de las infecciones de transmisión sexual más comunes del mundo. Existen varios tipos de HPV; algunos de ellos se relacionan con un gran riesgo oncogénico, como por ejemplo el HPV tipo 18. Los HPV, son virus de genoma de tipo ADN de doble cadena circular de 8 kb que contiene de ocho a diez regiones codificantes para proteínas no estructurales, (genes de expresión temprana) como enzimas relacionadas a la regulación de las funciones virales, y proteínas estructurales, (genes de expresión tardía) involucradas en la producción de los diferentes componentes del virus. Además, carece de envoltura, pero su genoma se encuentra contenido en una nucleocápside icosaédrica (**Figura 2**).

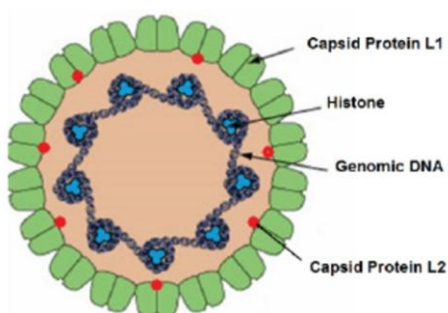


Figura 2. Estructura de virión de HPV. Imagen adaptada de Swiss Institute of Bioinformatics,

El HPV infecta principalmente las células epitelio escamoso de la piel y mucosas, y su ciclo viral involucra:

-Adsorción y entrada: La infección da inicio cuando el HPV se une a receptores celulares, como proteoglicanos de heparán sulfato, facilitando su endocitosis.

-Replicación y transcripción: El ADN viral se transporta al núcleo de la célula hospedera, donde se mantiene en forma episomal, extracromosómico, en células no diferenciadas. Una vez que las células epiteliales infectadas proliferan y se diferencian, se activa la expresión de genes virales tempranos y tardíos.

-Ensamble de viriones y salida: En las capas más diferenciadas del epitelio, se expresan proteínas de la cápside (L1 y L2), ensamblando nuevas partículas virales que serán liberadas con la descamación celular, sin necesidad de lisis.

-Latencia y persistencia: En algunos casos, el virus puede permanecer latente en células basales del epitelio, de forma que no provoca síntomas inmediatos. Pero factores como la inmunosupresión o alteraciones hormonales, pueden favorecer su reactivación, lo que puede derivar en lesiones clínicas.

En algunos casos, principalmente en aquellos virus con gran potencial oncogénico, el HPV logra insertar su genoma, dentro del de la célula hospedadora, transformándola e iniciando el proceso maligno (Doorbar y col., 2012). El virus del papiloma humano, cuenta con más de 200 genotipos identificados, de los cuales, en función de su potencial oncogénico, pueden generar algún tipo de cáncer. La persistencia de la infección por algún tipo de alto riesgo es un factor necesario para el desarrollo de lesiones precancerosas que, con el tiempo, pueden evolucionar hacia un cáncer cervical invasivo (CCU). El proceso metastásico, complejo y compuesto de múltiples etapas, se inicia cuando las células tumorales tras activar mecanismos de invasión, comienzan a migrar activamente desde el punto de origen, mediante matrices extracelulares con el objetivo de alcanzar vasos por los cuales viajar a un tejido distante y colonizarlo (Chaffer & Weinberg, 2011).

Dado que el virus HPV no es cultivable mediante cultivos celulares, se disponen comercialmente algunas líneas comerciales de células transformadas por HPV. En el caso de esta tesis se cuenta con las células HeLa (ATCC ® CCL-2), las cuales provienen de carcinoma de cuello uterino generado por HPV tipo 18. Se caracterizan por ser altamente proliferativas y poseer la capacidad de crecer de forma indefinida *in vitro* (Scherer, 1953).

El cáncer cervicouterino (CCU) representa un importante problema de salud pública en Argentina, y su incidencia cubre varias zonas en nuestro territorio argentino (**Figura 3**). Según datos del

Ministerio de Salud de la Nación (2022), se registraron 2.222 defunciones por esta causa, lo que representa una tasa bruta de mortalidad de 9,4 cada 100.000 mujeres. En el partido de Bahía Blanca, la incidencia del cáncer de cuello uterino se ha mantenido constante al ser calculada por quinquenios, desde el 1993 al 2012, con una tasa de unos 15 casos cada 100000 mujeres. El CCU ocupa el segundo lugar de incidencia, entre los periodos 2012 -2017, luego del cáncer de mama.

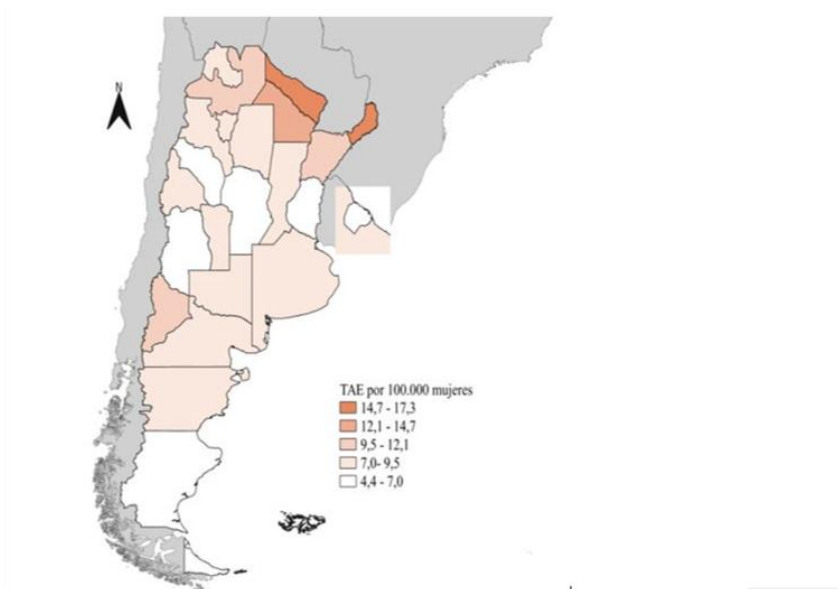


Figura 3. Tasas ajustadas por edad por 100.000 mujeres agrupadas en quintiles de mortalidad. Mortalidad por cáncer cervicouterino en Argentina. Tomada del Instituto Nacional del Cáncer (2022).

- **FUCOIDANOS PROVENIENTES DE *MYRIOGLOEA MAJOR***

Las algas marinas, en particular, las algas pardas, contienen fucoïdanos, polisacáridos sulfatados presentes en las paredes celulares o matriz extracelular de algas pardas, clase *Phaeophyceae*, los cuales han demostrado poseer propiedades biológicas significativas, como actividad antiviral, antioxidante, inmunomoduladora y antitumoral (Lin y col., 2020; Mak y col., 2013). Las distintas especies de algas son muy variables en su composición química, y la misma puede ser distinta según la estación del año en la que se recolecta y las condiciones ecológicas a las que esté expuesta, determinando diferencias en la síntesis de sus compuestos (Marinho–Soriano y col., 2006).

La capacidad de los fucoïdanos para inhibir la entrada y replicación de virus como el HPV, HSV e influenza A ha sido ampliamente documentada (Lin y col., 2020; Mak y col., 2013), aunque su efectividad depende de la especie de alga de origen, la estructura química del fucoïdano y el método de extracción utilizado. Además, su potencial terapéutico se extiende a la regulación de vías de señalización intracelular, la modulación del estrés oxidativo, la prevención de procesos inflamatorios asociados a infecciones virales, y actividad inmunomoduladora. Todos ellos contribuyen a su potencia preventiva

de enfermedades a través de la modulación flexible de las rutas de señalización intracelular esenciales, control de la acumulación de radicales libres, y equilibrio en los mecanismos clave de apoptosis y supervivencia celular.

Myriogloea major, una especie endémica de la Patagonia argentina, perteneciente a la familia Chordariaceae, representa una fuente prometedora de compuestos bioactivos aún poco explorados (**Figura 4**). Su similitud morfológica con otras especies ricas en fucoidanos, como *Cladosiphon okamuranus* ('Okinawa mozuku'), ha motivado el presente estudio, en el que se busca evaluar su rendimiento, la composición y la actividad antiviral y antioxidante de sus extractos. La investigación sobre esta especie podría contribuir al desarrollo de aplicaciones en la prevención y tratamiento de enfermedades virales, así como al avance en el conocimiento de los compuestos bioactivos presentes en algas marinas endémicas. Cabe destacar que la actividad antiviral frente a virus HSV-1 y coronavirus Bovino de polisacáridos ricos en fucoidanos extraídos de *M. major* constituye un hallazgo reciente del grupo de trabajo liderado por la Dra. Ayala (Conesa y col., 2024), lo que refuerza el potencial de esta especie como una fuente novedosa de metabolitos con aplicaciones biomédicas. Sin embargo, los estudios sobre las fracciones provenientes de estos extractos no fueron estudiados previamente hasta esta Tesis.



Figura 4. Fotografía del talo de *Myriogloea major*, tomada y adaptada de <https://inaturalist.org/observations/116920388>

OBJETIVOS DE LA SECCIÓN 1

Objetivo general: Se plantea determinar si las fracciones provenientes de fucoïdanos extraídos de *Myriogloea major* podrían poseer alguna acción anti-virus HSV-2 o inhiben la migración en células HeLa.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar el potencial antiviral de los fucoïdanos frente a HSV-2.

Para ello se evaluó:

- a) la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) de los fucoïdanos en células Vero.
 - b) la actividad antiviral medida como concentración efectiva 50 (CE₅₀) de los fucoïdanos frente a HSV-2.
 - c) el índice de selectividad (SI=CC₅₀/CE₅₀).
- 2) Estudiar en células HeLa (células de cuello de útero inmortalizadas con el virus HPV 18) el rol de fucoïdanos en relación a:
 - a) Su citotoxicidad.
 - b) Su participación en la migración o reversión del estado migratorio de células tumorales HeLa.
 - c) La formación de ROS.

Estos fueron los objetivos planteados originalmente para el desarrollo de esta Tesis de grado, sin embargo, dada la inundación del 7 de Marzo 2025, no se pudieron realizar los objetivos 2c y en el 1 se reemplazó a HSV-2 por HSV-1, debido a la pérdida de los stocks virales y las sondas a utilizar para determinar la formación de ROS. En su reemplazo se adicionaron las secciones 2 y 3.

MATERIALES Y MÉTODOS DE LA SECCIÓN 1

- **Extractos de fucoïdanos**

Los extractos y el análisis de su composición fueron aportados por el Dr. Fernando Dellatorre (GIDTAP-Chubut) en colaboración con el Laboratorio de Virología y Antivirales – UNS. La recolección de *M. major* se realizó manualmente en el intermareal inferior de la costa sur del Golfo Nuevo, Chubut. Las muestras fueron lavadas y secadas a temperatura ambiente, molidas y tamizadas (125-500 µm). Los

extractos de fucoidanos fueron obtenidos tras realizar una extracción ácida seguida de centrifugado de la muestra. El sobrenadante fue denominado “extracto obtenido en frío” (cold fucoidan extract: cExtract), y el pellet fue reextraído a 67°C bajo condiciones ácidas, fue llamado “extracto caliente” (hot fucoidan extract: hExtract).

Se determinaron azúcares totales mediante el método fenol-ácido sulfúrico, ácidos urónicos totales según el método de Filisetti-Cozzi y Carpita (1991), y proteínas mediante la técnica de Lowry y col. (1951). Además, se cuantificó el contenido de grupos sulfato con el método turbidimétrico de Dodgson y Price (1962). Finalmente, se realizó un análisis de azúcares neutros por cromatografía gaseosa tras hidrólisis ácida y derivatización, y los extractos fueron fraccionados utilizando bromuro de hexametilamonio (cetrime) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Composición de extractos y sus fracciones obtenidos mediante extracción ácida a temperatura ambiente “c” o a 67°C “h”. Fuc: fucosas, Ara: Arabinosa, Xyl: xilosa, Man: manosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa. Luego fueron fraccionados, “F”: fracciones.

	Carbohyd (Anh.)	Uronate (Anh.)	Sulfate (SO ₃ Na)	Monosaccharides (moles)					
				Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
cExtract	58	18	21	82,2	2,2	3,4	0,3	2,1	11,2
cF1	69,7	16,1	13,5	93,9	0,5	2,8	0,1	0,8	2,0
cF2	63,1	16,1	18,9	95,9	0,4	3,1	0,1	0,6	0,8
cF3	60,6	8,1	23,6	91,9	1,2	2,6	0,2	2,1	1,9
cF4	82,6	5,4	28,0	73,2	0,8	3,1	0,8	20,7	1,3
hExtract	50	18	11	83,8	3,0	4,2	2,3	5,8	0,6
hF1	85,5	28,1	16,2	76,0	0,8	13,6	4,9	1,1	3,5
hF2	69,0	29,9	26,4	89,9	1,6	2,8	0,7	1,0	3,8
hF3	74,1	29,9	37,4	85,6	1,2	2,2	0,3	9,7	0,6
hF4	59,7	29,9	40,2	88,3	1,4	1,4	0,1	7,8	0,7

- **Líneas celulares**

Células Vero (ATCC: CCL-81): Se utilizaron células Vero, una línea celular derivada de riñón de mono verde africano (*Chlocebus sabaeus*), ampliamente utilizada en estudios virológicos debido a su capacidad para soportar la replicación de diversos virus. Estas células carecen de la capacidad para la producción de interferones, lo que las hace útiles para evaluar la infectividad y propagación viral sin la interferencia de una respuesta antiviral endógena. En este estudio, se utilizaron para cuantificar la infectividad viral y para la propagación de stocks virales de HSV-1.

Células HeLa (ATCC: CRM-CCL-2): Se emplearon células HeLa, una línea celular derivada de un carcinoma humano inducido por el virus del papiloma humano tipo 18 (HPV-18), útiles por su alta capacidad de división.

Células HRT-18 (ATCC: CCL-244): Para la propagación del coronavirus bovino (BCoV), se utilizaron células de adenocarcinoma rectal humano HRT-18, ya que constituyen el sustrato adecuado para la replicación de este virus.

- **Criopreservación y descongelado**

Las células fueron almacenadas en freezer a -80 °C en DMSO al 1% para evitar la formación de cristales de hielo. Para su descongelado, se realizó un procedimiento rápido en baño de agua a 37 °C.

- **Cultivo celular y repique**

Las células Vero, HeLa, y HRT-18 fueron cultivadas en DME (Dulbecco Medium Eagle), al cual se le añadió antibiótico (gentamicina o penicilina-estreptomicina) y suero fetal bovino (SFB) al 5% en células Vero y HRT-18 y al 1% en células HeLa debido a su alta tasa de duplicación celular, trabajando bajo las debidas condiciones de esterilidad en el gabinete de seguridad biológico.

Para el repique de células se retiró el medio de cultivo y se añadió 500 µL de tripsina durante 5 minutos, permitiendo que la enzima actúe hasta que las células se desprendan de la placa. Luego se le aplicaron leves golpes a la placa para desprender aquellas células que habían quedado adheridas a los bordes del envase. Posteriormente se incorporó el medio de cultivo correspondiente, y se dejó incubando las células a 37°C con una atmósfera controlada de 5% de CO₂.

Los cultivos fueron monitoreados diariamente mediante un microscopio invertido para evaluar su estado y crecimiento. Una vez alcanzadas una confluencia del 90 %, se procedió a reducir la concentración de SFB al 1,5 % en el caso de células Vero, con el objetivo de disminuir su tasa de proliferación o realizar los ensayos correspondientes.

- **Ensayos de Citotoxicidad**

Los extractos liofilizados fueron hidratados en medio de cultivo DME, a una concentración inicial de 2000 µg/mL. Una vez preparados, fueron almacenados en refrigeración hasta su uso. Para obtener las concentraciones de trabajo, se realizaron diluciones seriadas en base 10 a partir de soluciones madre previamente preparadas, abarcando los rangos de 1000 a 0.1 µg/mL.

La concentración citotóxica media CC₅₀, representa la disminución de 50% de la viabilidad celular frente a un determinado compuesto en comparación con el control sin tratamiento, fue determinada. Se incubó a las células Vero y a las células HeLa en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de las diluciones de fucoidanos en diferentes tiempos hasta las 72 hs. Las células fueron incubadas en un incubador metabólico a 37 °C en una atmósfera controlada con 5% de CO₂ durante un periodo de 48 hs. Transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el medio de cultivo de la placa de tratamiento por inmersión y se fijaron las células con formol al 4%, que se dejó actuar durante 20

minutos. Posteriormente, el fijador se descarta cuidadosamente y se procedió a realizar una tinción con Cristal Violeta al 4%, que se dejó actuar durante otros 20 minutos para teñir el contenido celular y permitir una mejor visualización de las células adheridas. Luego de la tinción, las placas fueron examinadas bajo el microscopio óptico, donde se tomaron imágenes para documentar los efectos citotóxicos observados en los cultivos. Después, se agregan 100 μ L de metanol a cada pocillo para solubilizar el tinte retenido por las células. Las muestras fueron llevadas a lectura en un espectrofotómetro a 590 nm, permitiendo cuantificar la densidad óptica como indicador indirecto de la viabilidad celular. Se calculó la CC_{50} con el programa GraphPad Prism 9. Todas las determinaciones se realizaron en dos ensayos independientes, y cada uno de ellos por duplicado.

- **Ensayos Antivirales**

Se cultivaron monocapas de células Vero en placas de cultivo de 24 pocillos. Posteriormente fueron infectadas con HSV-1, aproximadamente 50 unidades formadoras de placas (UFP) por pocillo, en presencia o ausencia de los extractos. Las concentraciones que se utilizaron fueron seleccionadas en base a los resultados arrojados en el anterior ensayo de citotoxicidad, asegurando que los efectos observados fueran atribuibles a la actividad antiviral y no a una toxicidad sobre las células producida por los extractos. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, el inóculo residual fue reemplazado por DME 1,5% SFB que contenía 0,7% de metilcelulosa y la dosis correspondiente de cada compuesto. Este medio restringe la difusión del virus, permitiendo la formación de zonas de lisis localizadas en el cultivo, cada una representando una unidad formadora de placa (UFP). Después de un período de incubación de 48 hs, se procedió a contar las unidades formadoras de placas. Para cuantificar la actividad antiviral, se tituló la infectividad viral con la técnica de plaqueo UFP. Se realizó el recuento de placas formadas en cada condición experimental. La concentración inhibitoria media (IC_{50}) se determinó como la concentración del compuesto necesaria para reducir en un 50% la cantidad de placas virales en comparación con el control sin tratamiento. La IC_{50} fue calculada con el programa GraphPad Prism 9. Todos los ensayos antivirales fueron realizados bajo estrictas normas de bioseguridad, siguiendo los protocolos establecidos en el laboratorio para minimizar riesgos.

- **Ensayo de migración celular**

Para evaluar los efectos de los extractos de fucoïdanos sobre la capacidad migratoria de las células cancerígenas en el caso de células HeLa se realizó el ensayo de “la herida”, también conocido como “wound healing”, ensayo que imita la migración celular durante la cicatrización *in vivo*. Para este ensayo, se cultivaron cápsulas con células HeLa con medio DMEM y 2.5% de suero fetal bovino. Una vez obtenida una monocapa (a las 48 hs aprox) y con la ayuda de un tip, como elemento punzante, se realizó una herida en forma lineal sobre ella. Se removió el medio de las placas, y posteriormente, en base a las curvas de citotoxicidad obtenidas anteriormente, las enfrentamos a diferentes concentraciones del extracto de *M. major*: 1 μ g/ml, 0.5 μ g/ml y 0.1 μ g/ml y control sin fucoïdanos. Se tomaron fotos a distintos tiempos de tratamiento sobre las mismas zonas del cultivo celular.

- **Análisis estadístico**

La significancia estadística de los resultados se determinó mediante un análisis de varianza, ANOVA, con corrección de Bonferroni o Tukey.

RESULTADOS DE LA SECCIÓN 1

- **Efecto de extractos de fucoidanos-Ensayos de citotoxicidad y acción antiviral**

En el abordaje de los estudios de la citotoxicidad de los compuestos liofilizados de fucoidanos de *M. major* se puede observar que los compuestos provocan una moderada citotoxicidad sobre las células Vero (**Figura 5A**), siendo los provenientes de los extractos obtenidos en caliente los más citotóxicos y los extraídos en frío los menos citotóxicos. Como se muestra en la **Figura 5C**, los hExtracts y sus fracciones resultaron más citotóxicos para células HeLa que para células Vero, lo cual sugiere una posible citotoxicidad selectiva frente a células tumorales.

En la **Figura 5B**, se observa que los compuestos extraídos en frío poseen moderada acción antiviral siendo el extracto madre (cExtract) el de mayor acción antiviral. En cambio, los compuestos extraídos en caliente, hExtract y sus fracciones, perdieron su acción antiviral.

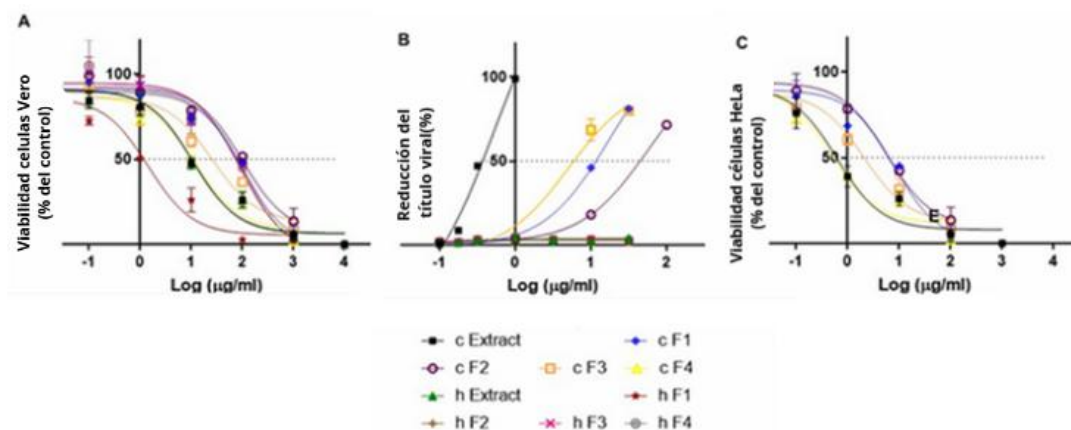


Figura 5. A) Evaluación de la citotoxicidad de extractos de fucoidanos y sus fracciones en células Vero. cExtract:cold (extracto obtenido en frío); hExtract, h: hot (extracto obtenido en caliente). F: fracciones. B) Análisis de la reducción del título del virus HSV-1 en células Vero. C) Evaluación de la citotoxicidad de extractos de fucoidanos y sus fracciones en células HeLa.

A partir de las curvas obtenidas de viabilidad y acción antiviral, se calcularon los valores de CC_{50} , la IC_{50} , y el Índice de Selectividad ($SI = CC_{50} / IC_{50}$), para los compuestos analizados (**Tabla 2**). Según la literatura, se considera que un compuesto posee actividad antiviral significativa cuando el valor de SI supera el valor de 10. En base a los resultados, el extracto obtenido en frío, mostró un SI superior

a 10, lo que sugiere que podría ser un buen candidato con potencial antiviral frente a HSV-1 corroborando lo observado en el paper previo del grupo (Conesa y col., 2024). Ahora en esta tesis se adiciona el estudio de la actividad antiviral de las fracciones, sin embargo, como se puede ver en el gráfico, las fracciones no superan la actividad antiviral obtenida en cExtract.

Por otro lado, para los ensayos realizados en células HeLa, se calculó el valor CC_{50} , observándose que estos valores fueron inferiores que los obtenidos en los ensayos realizados en células Vero, sugiriendo una mayor citotoxicidad ejercida por los extractos sobre las células transformadas por HPV (Tabla 2).

Tabla 2. CC_{50} calculada para células Vero y HeLa. IC_{50} se calculó en células Vero frente a HSV-1. A partir de ellos se calculó el índice de selectividad (SI).

	Vero			HeLa
	CC_{50} $\mu\text{g/mL}$	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	SI	CC_{50} $\mu\text{g/mL}$
cExtract	10.8 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	21.2	0.61
cF1	102.5 $\pm$ 0.9	17.5 $\pm$ 0.8	5.8	7.9
cF2	99.6 $\pm$ 0.3	55.8 $\pm$ 1.1	1.7	5.7
cF3	25.7 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.8	4.9	2.1
cF4	11.7 $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.7	2.3	4.9
hExtract	10.9 $\pm$ 0.2	Inactivo		
hF1	1.4 $\pm$ 0.5	Inactivo		
hF2	112.4 $\pm$ 0.9	Inactivo		
hF3	89.4 $\pm$ 1.2	Inactivo		
hF4	93.3 $\pm$ 1.1	Inactivo		

- **Efecto del extracto madre de *M. major* sobre la capacidad migratoria de células transformadas por HPV**

Seguidamente, estudiamos el efecto del extracto madre de *M. major* (cExtract) sobre la actividad migratoria de células HeLa, mediante el ensayo de la herida. Se observó que en aquellas cápsulas a las que se les realizó un tratamiento con fucoïdanos, se redujo la capacidad migratoria de las células HeLa en comparación con el control en los tiempos estudiados, como se refleja en la **Figura 6 y 7**.

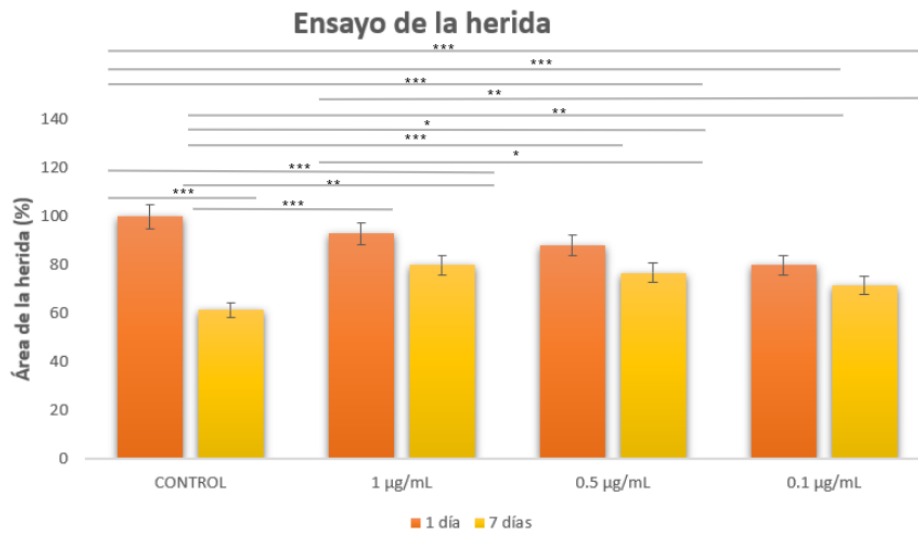


Figura 6. Efectos del extracto madre de *M. major* sobre la capacidad migratoria de células transformadas por HPV. Las células HeLa fueron tratadas con fucoidanos a concentraciones de 1, 0.5 y 0.1 µg/mL, o con el control sin tratamiento. El gráfico muestra la media $\pm$ SD de un ensayo representativo. El experimento se realizó en cuatro repeticiones independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

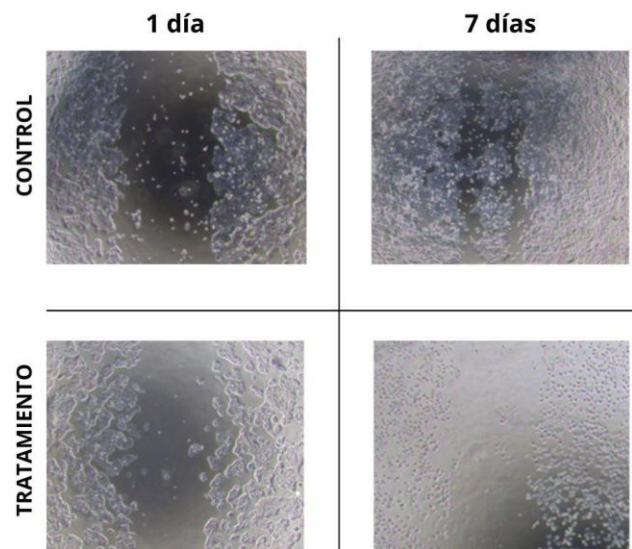


Figura 7. Microfotografías del ensayo de la herida. Se muestran fotos representativas de la condición control y tratamiento con 1µg/mL de cExtract, al día siguiente y a los 7 días del día de la injuria.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN 1

Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con hallazgos previos que destacan la influencia de la composición química del fucoídano en su actividad biológica (Li y col., 2021). En cuanto al análisis comparativo entre los distintos métodos de extracción, los hExtract presentaron mayor toxicidad en general, y además no demostraron actividad antiviral significativa frente HSV-1. La citotoxicidad observada de los extractos podría estar relacionada con modificaciones surgidas durante el proceso de extracción. Se ha reportado que el peso molecular y la estructura del fucoídano obtenido mediante diferentes métodos de extracción difieren, lo que influye en sus actividades biológicas (Hou y col., 2012; Imbs y col., 2015). Se ha reportado que una menor sulfatación disminuye la actividad antiviral, pero al mismo tiempo puede incrementar la citotoxicidad, posiblemente por la exposición de regiones más hidrofóbicas del polisacárido (Saepudin y col., 2018; Ale y col., 2011), lo cual puede explicar por qué cExtract es menos citotóxico frente a células Vero y tiene mayor actividad antiviral que hExtract. Sin embargo, esta regla no es aplicable a las fracciones, posiblemente debido a que durante el proceso de fraccionamiento pudo haberse producido una alteración de la conformación espacial de los grupos sulfato, como lo explican otros autores (Saepudin y col., 2018; Ale y col., 2011), lo cual, para poder afirmarlo esto se deberían realizar más estudios.

Se ha demostrado que los polisacáridos sulfatados derivados de algas marinas poseen estructuras moleculares particulares que les confieren un marcado potencial antiviral, principalmente al interferir en diferentes fases de este ciclo. En este contexto, la actividad anti HSV-1 observada para los extractos de *M. major* podría estar asociada con la capacidad de sus grupos sulfato para interactuar electrostáticamente con las glicoproteínas virales cargadas positivamente, alterando así la primera etapa de reconocimiento virus-célula. Este efecto incrementa la densidad de cargas negativas en la superficie celular y bloquea la unión inicial del virus, un mecanismo ampliamente reportado para polisacáridos sulfatados (Wang y col., 2012). Asimismo, los fucoídanos presentes en *M. major* podrían impedir la adsorción irreversible del virus al ocupar o enmascarar receptores virales, limitando de este modo el establecimiento de la infección. De esta manera, los resultados de inhibición antiviral obtenidos en nuestros ensayos encuentran sustento en la literatura previa que destaca la relevancia de las interacciones electrostáticas y la densidad de sulfatación como determinantes claves de la bioactividad de estos polisacáridos. Las fracciones aisladas no superaron la actividad del extracto madre, sugiriendo que la actividad antiviral depende de la composición completa o inalterada del extracto original y posibles sinergias entre los polisacáridos que lo componen (Li y col., 2021).

Coincidiendo con la literatura, se demostró que los extractos de fucoídanos ejercían una acción preferencial sobre las células HeLa, resultando más citotóxicas para las mismas, que, en células no transformadas, como Vero (Niyonizigiye y col., 2019). La literatura explica que los fucoídanos provenientes de algas como *Undaria pinnatifida* y *Fucus vesiculosus* ejercen una acción preferencial sobre células tumorales respecto de células no transformadas por la inducción de mecanismos de

apoptosis, detención del ciclo celular y estrés del retículo endoplásmico en líneas como HeLa, mientras que las células normales muestran baja o nula sensibilidad en condiciones equivalentes (Niyonizigiye y col., 2019; Chantre y col., 2021). Asimismo, se ha demostrado que los fucoidanos inhiben la migración e invasión celular a través de la modulación de vías de señalización como PI3K/Akt/mTOR y la reducción de la actividad de metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9), lo que sustenta la posible implicancia de los extractos de *M. major* en procesos relacionados con la progresión tumoral. Los resultados obtenidos en este trabajo también demuestran que los fucoidanos provenientes de *M. major* reducen la capacidad migratoria de las células HeLa de forma dosis dependiente, reforzando lo reportado en la literatura sobre la actividad no solo antiviral de los fucoidanos, sino también su posible rol en la modulación de propiedades tumorales.

En este contexto, los resultados obtenidos adquieren especial relevancia, dado que representan el primer estudio en el que se evalúa el efecto de fucoidanos obtenidos de *M. major* sobre células HeLa, evidenciando tanto citotoxicidad selectiva como reducción de la migración celular. Estos hallazgos refuerzan el potencial de los fucoidanos como candidatos en un doble escenario terapéutico, combinando propiedades antivirales y antitumorales para aquellos procesos malignos de origen viral.

SECCIÓN 2: "EXTRACTOS PROVENIENTES DE YERBA MATE COMO ANTIVIRALES FRENTE A DENGUE"

INTRODUCCIÓN DE LA SECCIÓN 2

La sección 2 y el 3 surgen como respuesta a las consecuencias provocadas por la inundación del 7 de marzo en nuestra ciudad, que afectó las instalaciones del edificio provocando la pérdida de stocks virales congelados de HSV-2, cultivos celulares y reactivos esenciales como la sonda DPPH, la sonda fluorescente (diacetato de 2',7'-diclorofluorescina) impidiendo la determinación de formación de ROS. Frente a este escenario crítico e imprevisto, nos vimos obligados a reestructurar el plan de trabajo inicial. Ante la imposibilidad de continuar con los virus originalmente seleccionados, y con el objetivo de dar continuidad al plan de trabajo, se procedió a utilizar otros virus disponibles, que, si bien pertenecen a diferentes familias, permitirán seguir la línea de estudio que se enfoca en la búsqueda de antivirales de origen natural y cumplir con los objetivos planteados. Esta sección contextualiza dicha decisión metodológica y expone los resultados obtenidos bajo esta nueva configuración experimental.

- **VIRUS DEL DENGUE**

El virus del dengue (DENV), es un arbovirus, pertenece al serocomplejo dengue, género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Este serocomplejo está conformado por cuatro serotipos

denominados DENV1 a DENV4. Los cuatro serotipos circulan periódicamente en áreas endémicas y todos causan la enfermedad conocida como dengue, pero el serotipo 2 se asocia a la mayor tasa de mortalidad por infección del virus (Amorim y col., 2023).

El DENV está compuesto por un núcleo de material genético protegido por una cápside de simetría icosaédrica, la cual está envuelta en una bicapa lipídica. Esta membrana lipídica forma una envoltura esférica, que contiene proteínas superficiales claves para la infección (Laredo-Tiscareño y col., 2012) (**Figura 8**). El genoma del DENV consiste en un ARN de sentido positivo de aproximadamente 11 kb, que codifica tres proteínas estructurales (C, prM y E), responsables de la conformación del virión, y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5), involucradas principalmente en la replicación del ARN viral (Perera y Kuhn, 2008). Entre estas, la proteína NS3 destaca por su papel como serina proteasa, responsable del procesamiento del polipéptido precursor viral para generar las proteínas funcionales necesarias para la maduración y replicación del virus. Esta actividad proteolítica, depende de su interacción con la proteína NS2B, que actúa como cofactor esencial, permitiendo la formación del sitio activo de la proteasa (Salaemae y col., 2010).

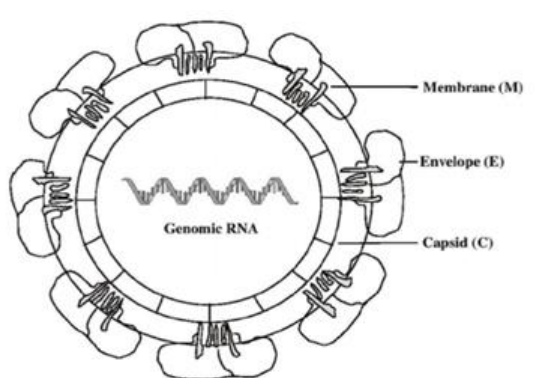


Figura 8. Estructura del DENV. (M) membrana, (E) envoltura, (C) cápside. Imagen tomada de Roy y Bhattacharjee (2021).

Por su parte, la proteína no estructural, NS5, es la polimerasa, responsable de la síntesis de ARN viral de cadena positiva y negativa de ARN (Galiano y col., 2016). Además, NS5 exhibe actividades metiltransferasa y guanililtransferasa, fundamentales para el capping y la metilación del extremo 5' del ARN viral, procesos que protegen al genoma del reconocimiento por parte del sistema inmune del huésped (Brand y col., 2017).

En conjunto, las proteínas NS3 y NS5 representan blancos moleculares claves en el desarrollo de antivirales, dado su rol esencial en el ciclo de replicación viral.

El DENV es transmitido por mosquitos hembra del género *Aedes*, especies *aegypti* y *albopictus*, que se encuentra distribuido por países tropicales y subtropicales.

La circulación del DENV en humanos se da cuando el mosquito ingiere sangre humana infectada con el virus del dengue, favoreciendo la infección de células epiteliales de su intestino. Luego las partículas virales producidas en estas células son liberadas al hemocele y hacia algunos órganos del mosquito, como las glándulas salivales, por lo que, al picar a un humano, lo infecta liberando saliva y virus.

Sus manifestaciones clínicas varían ampliamente dependiendo de la edad, el género, el genotipo y la inmunidad de la persona infectada, lo que determinará la severidad de la infección (Whitehorn y Simmons, 2011). Por ello, la enfermedad asociada a la infección puede resultar asintomática o derivar a formas severas como el dengue hemorrágico.

Tras la picadura de un mosquito infectado, y luego de un período de incubación que suele variar entre 3 y 7 días, la persona comienza de manera repentina a presentar síntomas que evolucionan a lo largo de tres etapas sucesivas: una fase febril, seguida de una fase crítica y, finalmente, una etapa de recuperación, o bien empeorar y sufrir un síndrome de fuga vascular sistémica (Simmons y col., 2012).

Dentro del impacto epidemiológico del dengue, se destaca que hubo un incremento del 85% en el número de casos entre 1990 y 2019, lo que refleja una expansión sostenida de la enfermedad a nivel global. Actualmente el virus es endémico en 129 países, con aproximadamente 390 millones de nuevas infecciones por año.

En Argentina, el dengue se presenta con tendencia incremental y progresiva expansión geográfica (**Figura 9**), con tres importantes epidemias en el último tiempo, en las temporadas 2015/2016, 2019/2020 y 2022/2023.

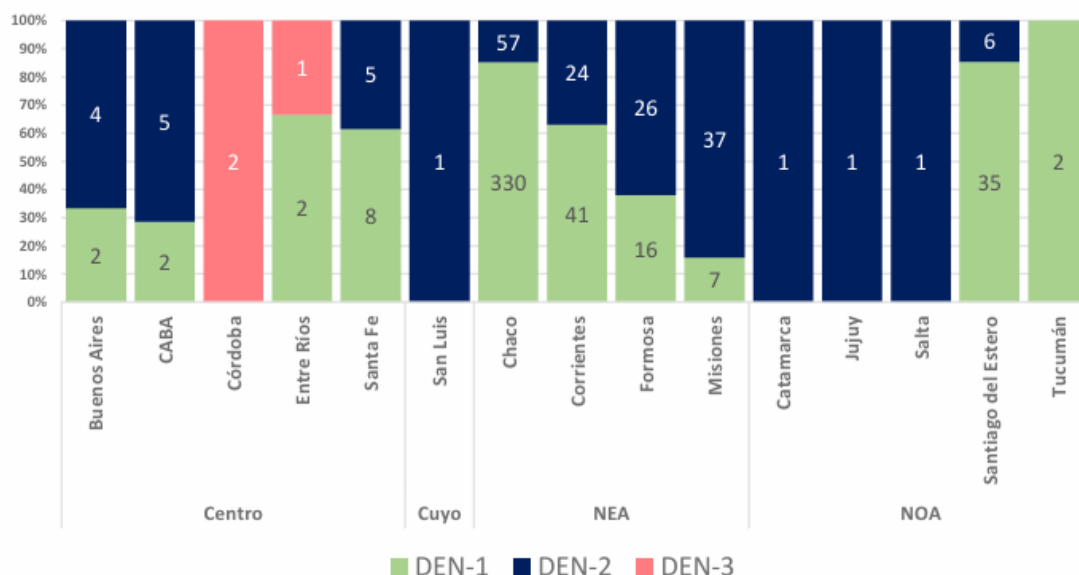


Figura 9. Distribución por provincias en Argentina de los serotipos de DENV. Tomado de *Boletín Epidemiológico Nacional N.º 686*, por Ministerio de Salud de la Nación, 2024.

- **YERBA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*)**

Ilex paraguariensis es un árbol nativo de América del Sur, de la familia Aquifoliaceae, y sus hojas se consumen como infusión (mate) en nuestro país tradicionalmente. Ha despertado un creciente interés científico por sus propiedades bioactivas (Heck y de Mejía, 2007; Marques y Farah, 2009), entre ellas su actividad antiviral moderada. Dicho efecto, se atribuye a diversos compuestos de sus hojas, que pueden interferir en el desarrollo de distintos mecanismos del ciclo viral. Entre estos compuestos, podemos encontrar las catequinas, un grupo de polifenoles, han demostrado han demostrado inhibir la replicación de virus como el HIV, el virus de la hepatitis B y el virus de la influenza, actuando sobre etapas tempranas de la infección (Song y col., 2005). La teobromina, un alcaloide de la familia de las metilxantinas, que ha mostrado actividad antiviral frente al coronavirus, incluyendo SARS-CoV-2, al unirse al sitio catalítico de la proteasa principal Mpro y reducir la infección viral en cultivos celulares (Li y col., 2023). De modo similar, la teofilina, otro alcaloide presente en la yerba mate, ha sido reportada como un posible inhibidor de la replicación del virus de la hepatitis, aunque su mecanismo de acción requiere mayor investigación. Por otro lado, los ácidos clorogénicos, compuestos fenólicos que han demostrado actividad antiviral frente al virus de la influenza y de la gripe A (H1N1/H3N2), contribuyendo a la reducción de la infectividad viral (Ding y col., 2017). Finalmente, los flavonoides, particularmente Quercetina, Rutina y Kaempferol, los cuales también se han encontrado en extractos vegetales, son reconocidos por su acción antioxidante e inmunomoduladora, además de su capacidad para interferir con la replicación viral en distintos modelos experimentales (Colunga Biancatelli y col., 2020).

Respecto de extractos de esta planta, ya se había demostrado previamente en la Tesis de grado

de Moreno, Gonzalo (alumno de la UBA) que poseen acción antiviral *in vitro* frente a Zika virus (un flavivirus como el Dengue) y contra HSV-1 (Moreno, 2024).

OBJETIVOS DE LA SECCIÓN 2

Objetivo general: Evaluar las propiedades antivirales de extractos liofilizados de yerba mate, dada la heterogeneidad de compuestos químicos que los integran.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar el potencial antiviral de los extractos frente a DENV-2.
- 2) Determinar la citotoxicidad de los extractos frente a células Vero y HeLa.

MATERIALES Y MÉTODOS DE LA SECCIÓN 2

- **Extractos de yerba mate**

Los extractos liofilizados de *Ilex paraguariensis*, fueron provistos por la Dra. Karina Salvatierra de la Universidad de Misiones. Dichos extractos fueron obtenidos mediante un proceso que consistió en homogeneizar hojas en buffer de extracción y posterior almacenamiento a -20°C . Luego se filtraron, se realizó una segunda extracción y se centrifugaron en frío (4000 rpm, 30 min) para eliminar partículas en suspensión. El sobrenadante acuoso fue sometido a una extracción líquido-líquido (1:1 v/v) con acetato de etilo, y la fase orgánica se concentró en un rotaevaporador a 40°C , mientras que el residuo se resuspendió en 3 ml de metanol, evaporándose nuevamente en centrífuga de vacío hasta obtener un extracto seco.

Actualmente se encuentra en compleción del estudio de la composición de dichos extractos. Los compuestos testeados y aportados por la Dra. Salvatierra fueron:

C1: extractos de yerba mate Canchaba, yerba comúnmente usada para terere, ya que tiene menos procesamiento industrial.

C2: extractos de yerba mate Tradicional (más procesada industrialmente que C1)

C3: extractos de yerba mate Especial (más procesada industrialmente que C1 y C2)

C4: extractos provenientes directamente de la hoja de la planta de yerba mate.

- **Línea celular y ensayos de citotoxicidad**

Se utilizó la línea celular Vero (ATCC: CCL-81) y HeLa (ATCC: CRM-CCL-2), las cuales fueron mantenidas y repicadas de acuerdo con lo descrito en la Sección 1 (Líneas celulares; Cultivo celular y repique).

Para los ensayos de citotoxicidad se siguió el protocolo indicado en la Sección 1, con las adaptaciones correspondientes al presente trabajo. Se evaluaron las dosis 1000-100 $\mu\text{g/ml}$ como las evaluadas por otros autores con compuestos similares (Moreno, 2024).

- **Virus DENV**

Se utilizó el virus Dengue serotipo 2, DENV-2, cepa 16681, ya que este serotipo se asocia con una mayor tasa de mortalidad en áreas endémicas. Este serotipo constituye un modelo representativo y validado en numerosos estudios *in vitro* para la evaluación inicial de la actividad antiviral de compuestos naturales. Además, el uso de un único serotipo permitió reducir la variabilidad experimental y optimizar los recursos disponibles en la etapa preliminar del análisis.

- **Ensayo de la actividad antiviral de los extractos de yerba mate sobre DENV-2**

Este ensayo se realizó en colaboración con la Dra. Cybele García del Laboratorio de Estrategias Antivirales-IQUIBICEN de la FCEN-UBA.

Siguiendo los pasos del protocolo de la **Figura 10**, las monocapas de células Vero fueron infectadas con 40 μL de DENV-2 por pocillo, en placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera controlada con 5% de CO_2 durante 1 hora. Luego de 1 hora de adsorción, se descartó el inóculo viral y se añadieron las diferentes concentraciones de los compuestos (rango 1000-0.1 $\mu\text{g/ml}$), 48 horas post infección se cosechó el sobrenadante para titular la infectividad viral.

Para preparar las diluciones de las diferentes concentraciones de extractos de yerba, se tomaron 50 μL del sobrenadante de cada pocillo de la placa de 96, y se mezclaron con 450 μL de PBS, solución salina tamponada con fosfatos que mantiene un pH estable y evita cambios osmóticos en las células, obteniendo la dilución 10^{-1} . Luego, se tomaron 50 μL de esa dilución y se añadieron 450 μL de PBS para obtener 10^{-2} .

Se prepararon cuatro placas de 24 pocillos con monocapas de células Vero, una por cada compuesto de yerba mate (C1, C2, C3, C4). Se inocularon 100 μL de cada preparación de sobrenadante más PBS en los pocillos correspondientes. En cada placa se dejó varios pocillos de control de virus, para el cual realizamos diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , donde se incluye únicamente el virus sin el tratamiento que se quiere probar y se lo enfrenta a las células hospedadoras. Las placas se incubaron por 1 hora en estufa a 37 °C. Luego se les retiró el inóculo y se cubrió la monocapa con una preparación de

1 ml por pozo de mezcla de MEM x 2, metilcelulosa y suero fetal bovino. Tras 7 días en incubador, se procedió a fijar las placas con cristal violeta. Por último, se contaron las placas para calcular el título (UFP).

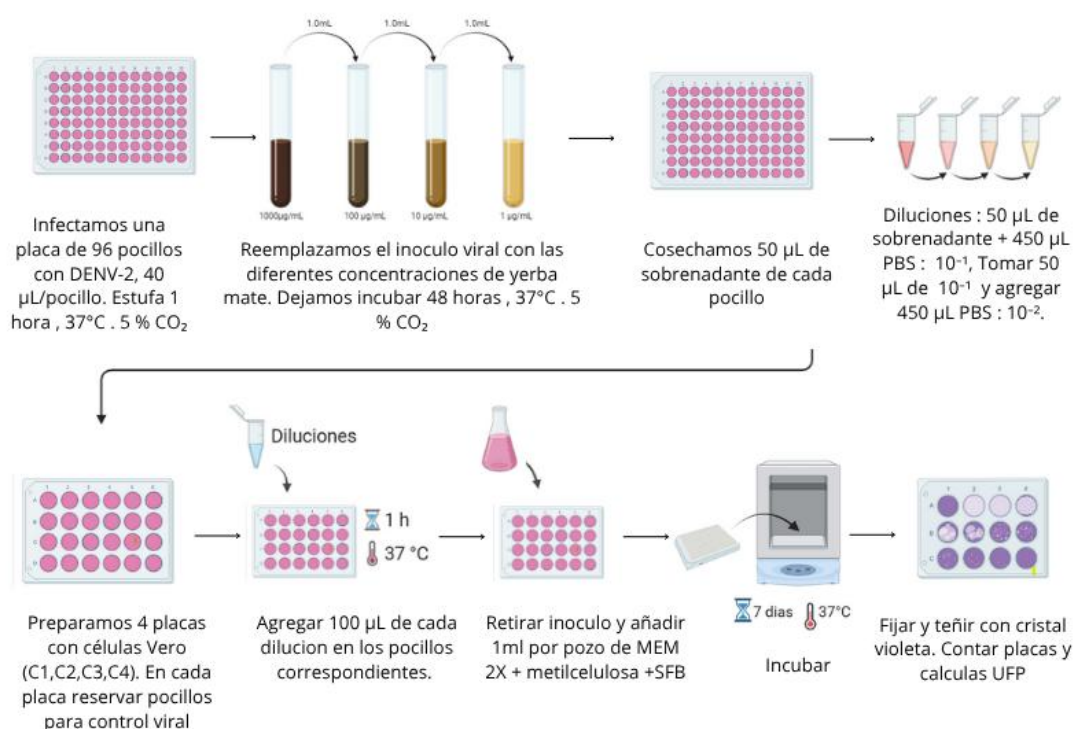


Figura 10. Protocolo de tratamiento de DENV- 2 con extractos de yerba mate.

RESULTADOS DE LA SECCIÓN 2

- **Efecto de los extractos de yerba sobre DENV-2**

Se procedió a evaluar la recuperación de virus infectivos en el sobrenadante de células Vero infectadas con DENV-2 en presencia de distintas concentraciones de los compuestos C1, C2, C3 y C4. De esta manera se evalúa el rol de los extractos sobre la liberación/producción viral. Como se observa en la **Tabla 3**, a las dosis estudiadas se redujo la actividad viral en casi un 100 porciento para todos los compuestos.

Tabla 3. Porcentaje de reducción de la infectividad viral para DENV-2

$\mu\text{g/ml}$	C1	C2	C3	C4
1000	100 $\pm$ 0.00	99,99 $\pm$ 0,00	99,80 $\pm$ 0.04	100 $\pm$ 0.00
100	99.60 $\pm$ 0.12	99,97 $\pm$ 0.00	99,70 $\pm$ 0.05	99,94 $\pm$ 0.02
10	99.46 $\pm$ 0.25	99,90 $\pm$ 0.01	99,10 $\pm$ 0.02	99,96 $\pm$ 0.00
1	99,12 $\pm$ 0.12	99,80 $\pm$ 0.01	98,80 $\pm$ 0.13	99,69 $\pm$ 0.01
0.1	97,95 $\pm$ 0.16	97,70 $\pm$ 0.03	98,90 $\pm$ 0.12	99,70 $\pm$ 0.08

Dado que la menor dosis estudiada fue 0.1 $\mu\text{g/ml}$, y a esa dosis la reducción de la actividad viral fue mayor a 97%, podemos inferir que la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) sería menor a 0.1 $\mu\text{g/ml}$ para todos los compuestos evaluados.

Tabla 4. Ensayo de viabilidad en células HeLa y Vero determinados por MTT. Los valores se encuentran expresados en porcentaje de supervivencia celular, de los cultivos celulares tratados con extractos de yerba mate respecto al control sin tratamiento.

	C1		C2		C3		C4	
$\mu\text{g/ml}$	HeLa	Vero	HeLa	Vero	HeLa	Vero	HeLa	Vero
1000	10 $\pm$ 0.30	99.0 $\pm$ 0.40	7.1 $\pm$ 0.1	99.1 $\pm$ 0.7	9.8 $\pm$ 0.1	99.3 $\pm$ 1.30	10 $\pm$ 0.1	99.0 $\pm$ 0.40
100	31.1 $\pm$ 0.2	99.95 $\pm$ 0.8	30.9 $\pm$ 0.2	99.97 $\pm$ 0.4	30.7 $\pm$ 0.5	99.96 $\pm$ 0.33	30.4 $\pm$ 0.1	99.99 $\pm$ 0.32

Dentro de las dosis estudiadas (1000 y 100 $\mu\text{g/ml}$), los extractos no mostraron efectos citotóxicos sobre las células Vero, manteniéndose la viabilidad celular cercana al 100%, determinado mediante ensayo de MTT (**Tabla 4**). No se evaluaron concentraciones superiores a 1000 $\mu\text{g/ml}$ dado a que se observó una coloración verdosa en el medio de cultivo sumado a la formación de depósitos insolubles interfiriendo con el ensayo colorimétrico. Por ello, se estima que la concentración citotóxica 50 (CC_{50}) sería superior a 1000 $\mu\text{g/ml}$ en células Vero, lo que indica una baja citotoxicidad de los

extractos frente a las células Vero. Con estos valores podemos estimar el índice de selectividad, $SI = CC_{50}/CI_{50}$, dando un SI mayor a 10.000 para todos los compuestos, valor que denota una excelente selectividad hacia el virus con un bajo riesgo de daño a la célula huésped.

Por otro lado, los estudios de citotoxicidad en células HeLa, mostraron que los extractos de yerba mate fueron más citotóxicos frente a las células Hela que frente a las células Vero, indicando que los extractos no son perjudiciales para las células no cancerosas (**Tabla 4**).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN 2

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo refuerzan lo obtenido en estudios *in silico* previamente desarrollados en el laboratorio de la Dra. Salvatierra, en los cuales se seleccionaron diversos compuestos bioactivos presentes en extractos de *Ilex paraguariensis*, entre ellos Rutina, y evaluaron su acoplamiento molecular con los sitios activos de las proteínas no estructurales NS3 (proteasa) y NS5 (ARN polimerasa dependiente de ARN, RdRp) del virus del dengue (Comes y col.,2024). Estas proteínas fueron elegidas por su papel esencial en la replicación y procesamiento del genoma viral. Los resultados del acoplamiento viral revelaron que Rutina presentó altas afinidades de unión a la proteína NS5 en todos los serotipos de DENV, con valores de energía de acoplamiento de -8.7 ; -9.1 ; -9.6 y -9.8 kcal/mol para los serotipos 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Lo que sugiere que Rutina podría interferir con la actividad catalítica de la ARN polimerasa viral (RdRp), desestabilizando la conformación de la proteína NS5 e inhibiendo la replicación del genoma viral (Comes y col.,2024).

En este contexto, los resultados que obtuvimos *in vitro* apoyan la hipótesis anterior; los extractos evaluados mostraron una CI_{50} menor a $0.1 \mu\text{g/ml}$ para todos los compuestos frente a DENV-2, junto con una ausencia de citotoxicidad sobre las células Vero, manteniéndose una viabilidad del 100%, según el ensayo de MTT. Esta combinación de alta potencia inhibitoria y baja citotoxicidad refuerza la posibilidad de que los compuestos fenólicos presentes en los extractos ejerzan actividad antiviral mediante la interferencia directa con proteínas esenciales del ciclo replicativo del virus, en concordancia con las observaciones del estudio computacional.

Estudios preliminares sobre la composición química de los extractos de *Ilex paraguariensis* realizados en colaboración con la Dra. Salvatierra revelaron que Quercetina fue el principal metabolito presente. Considerando esta composición, sugerimos que los efectos antivirales observados podrían deberse, también en parte a la acción de este flavonoide. Resultados, que son respaldados por estudios similares reportados, demostrando que Quercetina inhibe la replicación de DENV-2 y reduce significativamente el ARN específico de DENV, sugiriendo que Quercetina también puede dirigirse a la maquinaria de replicación del virus, es decir, inhibiendo la ARN polimerasa (Zandi y col., 2011).

Según Troost y Smit (2020), para desarrollar un antiviral contra el virus dengue que sea eficaz,

es importante evaluar el compuesto contra todos los serotipos del virus. Dado que Rutina muestra una alta afinidad con la RdRp de todos los serotipos, posee un perfil prometedor como candidato a antiviral y establece la necesidad de realizar estudios posteriores contra los serotipos 1,3 y 4, más allá de esta Tesis.

Por otro lado, los extractos mostraron una característica deseada en todo compuesto con potencial efecto terapéutico es que presente un accionar selectivo o diferencial entre las células tumorales y las normales. Los extractos de *Ilex paraguariensis* mostraron una mayor citotoxicidad sobre las células HeLa en comparación con las células Vero, lo que sugiere un efecto selectivo hacia células tumorales. Este comportamiento podría atribuirse a la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides característicos de la especie, capaces de modular el equilibrio redox celular. En estudios previos se ha demostrado que las células tumorales presentan un metabolismo oxidativo alterado y una mayor producción basal de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que las hace más vulnerables a desequilibrios adicionales en su homeostasis redox. Cuando la homeostasis entre las actividades prooxidantes y las defensas antioxidantes se ve afectada, aumenta la producción de ROS y se acumulan radicales libres. Un exceso de ROS conduce a estrés oxidativo, el cual se asocia al desarrollo de procesos inflamatorios, enfermedades degenerativas y cáncer. En este contexto, los flavonoides como la Quercetina presentes en los extractos de yerba mate ejercen una doble acción: actúan como antioxidantes en condiciones fisiológicas normales, mientras que en células cancerosas pueden comportarse como potentes prooxidantes, promoviendo la generación de ROS y activando vías apoptóticas (Kopustinskiy et al., 2020; Hadi et al., 2000)

En concordancia con estos mecanismos, la mayor citotoxicidad observada frente a las células HeLa podría explicarse por la capacidad de los compuestos fenólicos de *Ilex paraguariensis* para inducir estrés oxidativo y desencadenar la muerte celular programada en células tumorales. Sin embargo, para confirmar esto se deben realizar los estudios correspondientes. El dengue y el cáncer son dos enfermedades que pueden coexistir, siendo los pacientes con cáncer una población de riesgo que puede experimentar complicaciones más severas. El dengue puede ser más frecuente, grave y prolongado en estos pacientes, con mayor riesgo de síntomas de alarma, plaquetopenia severa y necesidad de internación, lo que también puede llevar a retrasos en los tratamientos oncológicos. Por ello este comportamiento dual en estos extractos sugiere un potencial uso selectivo de estos extractos en estrategias terapéuticas antitumorales o antivirales.

Los resultados obtenidos en este estudio respaldan el potencial antiviral de los extractos presentes en *Ilex paraguariensis*, como fuente sostenible y accesible de moléculas bioactivas aplicables en el diseño de estrategias terapéuticas frente a infecciones virales como el dengue. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la yerba mate podría ser una fuente prometedora de moléculas con potencial antiviral, con posibles aplicaciones en el diseño de estrategias complementarias para la prevención o tratamiento de infecciones virales con dual función en aquellos pacientes oncogénicos.

SECCIÓN 3: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI CORONAVIRUS DE BIOMATERIALES”

INTRODUCCIÓN DE LA SECCIÓN 3

- **CORONAVIRUS BOVINO**

El coronavirus (BcoV) pertenece a la familia *Coronaviridae*, género *Betacoronavirus*, y posee un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva. Este virus está envuelto por una membrana lipídica que alberga proteínas estructurales esenciales para su ciclo de replicación, como la proteína de espiga (S), la de membrana (M), la de envoltura (E) y la nucleocápside (N) (Bok y col., 2015) (**Figura 11**).

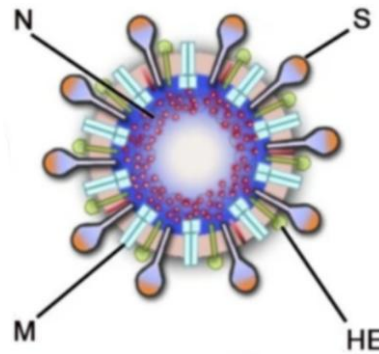


Figura 11. Estructura de virus BCoV. (N) Nucleoproteínas, (S) glicoproteína Spike, (M) proteína de membrana, (HE) proteína hemaglutinina-esterasa. Imagen tomada y adaptada de *Evaluation of inactivation of bovine coronavirus by low-level radiofrequency irradiation* (Scientific Reports, 2023).

En el contexto de la producción ganadera, el BCoV es responsable de diversas enfermedades que afectan tanto a terneros como a bovinos adultos. Entre las patologías más relevantes se encuentran la diarrea neonatal del ternero, la disentería de invierno y las infecciones respiratorias. Estas condiciones generan importantes pérdidas económicas debido a la mortalidad, la disminución en la producción de leche y carne, y los costos asociados al tratamiento y control de los brotes (Martínez y col, 2002).

Desde el punto de vista experimental, el BCoV se ha consolidado como un modelo valioso para el estudio de otros coronavirus de interés en la salud humana, como el SARS-CoV-2. Esta relevancia se debe a las similitudes estructurales y funcionales entre ambos virus, lo que permite investigar aspectos relacionados con la transmisión, la replicación viral y la respuesta inmune sin el riesgo de infección en humanos. Investigaciones recientes han demostrado que la proteína S del BCoV puede inducir respuestas inmunológicas cruzadas con el SARS-CoV-2, sugiriendo un potencial para el desarrollo de estrategias de inmunización (Cossu y col., 2024).

En cuanto a su epidemiología, el SARS-CoV-2 se caracteriza por ser altamente transmisible, propagándose tanto por gotitas de flugge, como por superficies contaminadas, fómites, contribuyendo a su rápida diseminación dentro de establecimientos ganaderos.

En resumen, el BCoV no solo representa una amenaza para la producción ganadera, sino que también ofrece una plataforma segura y eficaz para la investigación de coronavirus, contribuyendo al avance en el desarrollo de terapias y vacunas para enfermedades virales emergentes.

- **HIDROGELES**

El quitosano es un polisacárido natural derivado de la quitina, la cual se encuentra presente en el exoesqueleto de artrópodos y formando paredes celulares de hongos. El quitosano, está formado por unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina unidas por enlaces β -(1 $\rightarrow$ 4). Su carácter poli catiónico y la posibilidad de sulfatación selectiva le confieren la capacidad de interactuar con superficies cargadas negativamente, como las de los virus o los proteoglicanos de sulfato de heparán, que son glicoproteínas presentes en la superficie celular y en la matriz extracelular de mamíferos, y cumplen funciones esenciales en procesos como adhesión, proliferación e inflamación (Li y col., 2021).

Los proteoglicanos de sulfato de heparán poseen una fracción de heparán sulfato, compuesta por disacáridos sulfatados cargados negativamente, que es aprovechada por numerosos virus, incluyendo SARS-CoV-2, virus respiratorio sincitial, dengue y papilomavirus, como punto de unión inicial para facilitar el ingreso a las células huésped (Milewska y col., 2013).

En este contexto, el uso de compuestos que imitan o interfieran con los heparán sulfato representa una estrategia prometedora para bloquear la unión viral. Por lo tanto, el quitosano constituye una matriz natural versátil y prometedora para el diseño de formulaciones antivirales, ya sea por su acción intrínseca o como portador de agentes bioactivos.

La gelatina se usa en geles curativos gracias a su origen en el colágeno, que favorece la regeneración celular, y su capacidad de ser termorreversible, derritiéndose a la temperatura corporal y permitiendo el desarrollo de nuevo colágeno y la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos), lo que acelera la cicatrización de heridas. Sus propiedades de elasticidad, transparencia y biodegradabilidad la hacen un material muy versátil y seguro para aplicaciones médicas. Su porosidad ajustable permite la encapsulación de fármacos dentro de la estructura del gel y su liberación controlada (Farwa y col., 2022).

La goma arábica es un compuesto muy utilizado en cosmética, es hipoalergénico y en este caso, tanto la gelatina como la goma arábica se utilizaron con fines emulsionantes y espesantes.

El quitosano, como polisacárido catiónico con grupos amino, puede formar enlaces iónicos y de hidrógeno con la gelatina y la goma arábica, reforzando así la red del hidrogel y mejorando sus propiedades mecánicas y su resistencia a la degradación (Tsai y col., 2014). Esta combinación de

polímeros aumenta la eficacia terapéutica (Pellá y col.,2018; Cheng y col., 2003) y respalda su aplicación en tratamientos dermatológicos que abarcan desde afecciones cutáneas crónicas hasta la regeneración cutánea tras procedimientos invasivos.

La nanotecnología ha revolucionado el campo de los biomateriales. En particular, la alta eficacia, estabilidad fisicoquímica, biocompatibilidad y baja toxicidad de las nanopartículas de ZnO han sido ampliamente documentadas, lo que las hace muy atractivas para aplicaciones biomédicas. La evidencia actual indica que estas partículas no representan un riesgo para la salud cuando se aplican tópicamente, ya que no penetran la piel humana intacta ni dañada. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) ha clasificado al ZnO como una sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS), lo que respalda su uso en productos dermatológicos y farmacéuticos (Osmond y col.,2010; Sirelkhatim y col.,2015; Schneider y col., 2018). Estos nanomateriales han demostrado ser una opción prometedora debido a sus propiedades antimicrobianas, antivirales, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Anjum y col.,2021).

Las nanopartículas de óxidos de hierro magnéticas como magnetita y maghemita presentan inmejorables propiedades para aplicaciones biomédicas, siendo la actividad antiviral una de las que más recientemente se han reportado (Kumar y col., 2019). Una de las opciones para implementar estas nanopartículas en biomedicina, consiste en incluirlas en una matriz polimérica para mejorar su dispersión y estabilidad, generando nuevos materiales con propiedades multifuncionales de acuerdo a la matriz polimérica seleccionada.

Se seleccionó la morina (3,5,7,2',4'-pentahidroxiflavona) como principio activo por su gran capacidad de incorporación de nanopartículas (Montiel Schneider y col.,2021). Este flavonoide posee una amplia gama de actividades farmacológicas, como antioxidante, antiinflamatoria y antitumoral, entre otras (Caselli y col.,2016). Además, la morina tiene la capacidad de superar el problema de la resistencia a múltiples fármacos en el tratamiento del cáncer (Hussain y col., 2016).

OBJETIVOS DE LA SECCIÓN 3

Objetivo general: Estudiar la capacidad antiviral de hidrogeles formulados a base de quitosano.

Objetivos específicos:

-Determinar propiedades antivirales de hidrogeles a base de quitosano en distintas formulaciones utilizando coronavirus bovino (BCoV).

MATERIALES Y MÉTODOS DE LA SECCIÓN 3

- **Hidrogeles**

En el marco de una colaboración con la Dr. Ayala, la Dr. Verónica Lassalle (INQUISUR) aportó hidrogeles a base de quitosano, como un primer screening para testear la actividad antiviral de las formulaciones. Todos ellos poseían una base de idéntica composición en cuanto a quitosano, gelatina y goma arábiga. Luego se varió en la composición de ZnO, morina y Magnetita como se observa en la **Tabla 5**. Los aspectos de los hidrogeles variaron en función de su composición (**Figura 12**).

Tabla 5. Composición de hidrogeles estudiados expresados en gramos (g).

Composición (g) /condiciones	H	HZM	Hmag
Quitosano	0,25	0,25	0,25
Gelatina	0,50	0,50	0,50
Goma Arábiga	0,075	0,075	0,075
ZnO	-	0,0125	-
Morina	-	0,15	-
Magnetita	-	-	0,0162



Figura 12. Aspecto de hidrogeles. De izquierda a derecha, hidrogeles HZM, H, HMag. (H) hidrogel quitosano, (Z) nanopartículas de óxido de zinc, (M) morina, (Mag) nanopartículas de Magnetita.

- **Evaluación de la actividad antiviral en hidrogeles:**

Se estudió la actividad antiviral frente al BCoV. Los hidrogeles se infectaron con 20 μL por cm^2 de BCoV (1000 UFP) en una simulación de contaminación por gotas húmedas o fueron tratados como control (sin infección), tal como fue descrito por Warnes y colaboradores (2015), e incubados durante

15 minutos a 25 °C. Posteriormente, se añadieron 80 µL de DMEM a los hidrogeles y se procedió a titula la infectividad residual. Para ello, se inocularon los cultivos de células Vero con estas suspensiones virales y se observó el desarrollo de efecto citopático (ECP).

RESULTADOS DE LA SECCIÓN 3

Se evaluó la actividad antiviral de hidrogeles de distinta composición (**Figura 13**). Como se observa en la **Tabla 6**, el hidrogel HZM, que incorpora magnetita y óxido de zinc en su formulación, demostró una reducción de la actividad antiviral del 97%, posicionándose como la formulación más eficaz del ensayo. Los hidrogeles H y HMag, con y sin magnetita, también presentaron actividad antiviral relevante contra BCoV, con reducciones superiores al 40% aunque claramente menores a las observadas para HZM. En contraste, la magnetita por sí sola mostró escasa acción antiviral en las condiciones evaluadas.

Tabla 6. Reducción (%) de la actividad antiviral frente a BCoV para hidrogeles respecto del control. (-) control sin infección, (BCoV) coronavirus bovino, (H) hidrogel, (Mag): magnetita, (Z) nanopartículas de óxido de zinc, (M) morina.

BCoV	BCoV +Mag	BCoV + H	BCoV + HZM	BCoV + HMag
0± 0,8	10± 6	41 ± 9	97± 1	72± 4

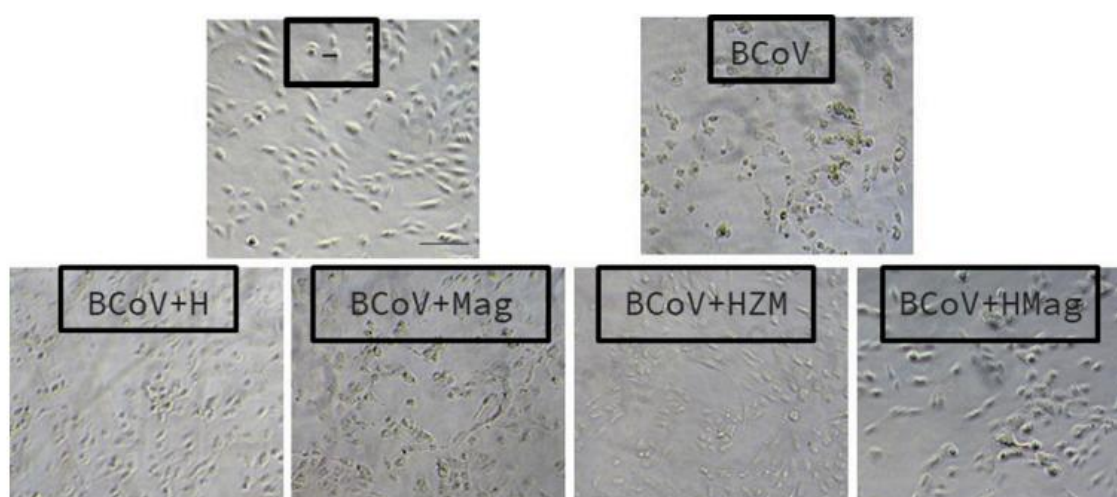


Figura 13. Imagen de cultivos celulares de células Vero infectadas con suspensiones virales de BCoV expuestos a distintos hidrogeles. La barra de escala de la figura corresponde a 30 µm.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES DE LA SECCIÓN 3

Los biomateriales, como los hidrogeles, representan una estrategia innovadora y prometedora para la prevención y control de infecciones virales, especialmente aquellas transmitidas por contacto con superficies contaminadas. En este estudio, los hidrogeles formulados con quitosano mostraron una inhibición significativa de la infectividad del coronavirus bovino (BCoV), siendo particularmente notable la elevada eficacia del hidrogel HZM, que incorporó, morina y nanopartículas de zinc, con una reducción de actividad viral del 97%.

La actividad antiviral observada puede atribuirse a la combinación sinérgica de los componentes presentes en la formulación. El quitosano, posee reconocidas propiedades antimicrobianas y antivirales debido a su carácter catiónico, que le permite interactuar electrostáticamente con las superficies virales cargadas negativamente, alterando la envoltura o la cápside y bloqueando la unión del virus a la célula huésped (Revuelta y col., 2025).

En cuanto a la presencia de nanopartículas de zinc, se ha descrito que las mismas interfieren con la actividad de la ARN polimerasa viral y pueden unirse a las proteínas virales a través de las fuerzas de Van der Waals responsables de su inactivación, lo que resulta en la inhibición de la replicación y entrada viral, lo que sustenta nuestros resultados en la formulación de HZM, además de tener la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) bajo condiciones fisiológicas, alterando componentes esenciales del virión, como proteínas estructurales (Dawre & Maru, 2021; Te Velthuis y col., 2010). La incorporación de morina, un flavonoide natural con propiedades antioxidantes y antivirales, también contribuye al efecto global de la formulación. Se ha reportado que los flavonoides pueden interactuar con proteínas virales clave, inhibir enzimas involucradas en la replicación y modular las rutas redox de la célula huésped. En el contexto de estos hidrogeles, la morina podría actuar sinérgicamente con el ZnO, inhibiendo la entrada del virus (Hong y col., 2020).

Los resultados obtenidos son coherentes con reportes previos sobre la capacidad antiviral de materiales compuestos basados en biopolímeros y nanopartículas metálicas, los cuales combinan biocompatibilidad con una elevada eficacia frente a diferentes virus de envoltura lipídica, incluyendo HSV, influenza y SARS-CoV-2 (Aranaz y col., 2021; Ayala-Peña y col., 2022).

Los resultados de este estudio demuestran que los hidrogeles a base de quitosano poseen una notable actividad antiviral frente al BCoV. En conjunto, estos hallazgos refuerzan el potencial de los biomateriales basados en quitosano como plataformas antivirales sostenibles y biocompatibles. Su capacidad para inactivar virus como el BCoV sugiere posibles aplicaciones en el desarrollo de formulaciones tópicas, recubrimientos protectores y superficies autodesinfectantes relevantes tanto en el ámbito biomédico como en el control de infecciones hospitalarias y veterinarias.

BIBLIOGRAFÍA

- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2011). Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine Drugs*, 9(10), 2106–2130.
- Amorim, M. T., Hernández, L. H. A., Naveca, F. G., Essashika Prazeres, I. T., Wanzeller, A. L. M., Silva, E. V. P. D., ... & Cruz, A. C. R. (2023). Emergence of a new strain of DENV-2 in South America: Introduction of the cosmopolitan genotype through the Brazilian-Peruvian border. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 8(6), 325.
- Anjum, S., Hashim, M., Malik, S.A., Khan, M., Lorenzo, J.M., Abbasi, B.H., Hano, C. (2021) Recent Advances in Zinc Oxide Nanoparticles (ZnO NPs) for Cancer Diagnosis, Target Drug Delivery, and Treatment. *Cancers (Basel)*, (18):4570. doi: 10.3390/cancers13184570
- Aranaz, I., Méndez, J. A., & Poza, M. (2021). Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*, 13(19), 3256.
- Atashrazm, F., Lowenthal, R. M., Woods, G. M., Holloway, A. F., & Dickinson, J. L. (2015). Fucoidan and cancer: A multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Marine Drugs*, 13(4), 2327–2346. <https://doi.org/10.3390/md13042327>
- Ayala-Peña, V. B., Martín, M. J., Favatela, F., Otarola, J., Morán, P., Ventura, M., Gentili, C., Salcedo, M. F., Mansilla, A., Pérez, S., Dolcini, G., Alvarez, V., & Lassalle, V. (2022). Chitosan Based formulations intended as protective spray for mask surfaces in prevention of coronavirus dissemination. *ChemistrySelect*, 7(37). <https://doi.org/10.1002/slct.202202410>
- Bok, M., Miño, S., Rodríguez, D., Badaracco, A., Nuñez, I., Souza, S. P., ... & Parreño, V. (2015). Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010. *Veterinary Microbiology*, 181(3–4), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.017>
- Brand, C., Bisaillon, M., & Geiss, B. J. (2017). Organization of the Flavivirus RNA replicase complex. *Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA*, 8(6). <https://doi.org/10.1002/wrna.1437>
- Burrell, S., Topalis, D., & Boutolleau, D. (2020). Herpes simplex virus resistance to antivirals. *Virologie*, 24(5), 325–342. <https://doi.org/10.1684/vir.2020.0864>

- Cantu, J. C., Butterworth, J. W., Mylacraine, K. S., Ibey, B. L., Gamboa, B. M., Johnson, L. R., Thomas, R. J., Payne, J. A., Roach, W. P., & Echchgadda, I. (2023). Evaluation of inactivation of bovine coronavirus by low-level radiofrequency irradiation. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36887-7>
- Caselli, A., Cirri, P., Santi, A., & Paoli, P. (2016). Morin: A promising natural drug. *Current medicinal chemistry*, 23(8), 774–791. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160106150821>
- Chaffer, C. L., & Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331, 1559–1564.
- Chantree, P., Na-Bangchang, K., & Martviset, P. (2021). Anticancer activity of fucoidan via apoptosis and cell cycle arrest on cholangiocarcinoma cell. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 22(1), 209–217. <https://doi.org/10.31557/apjcp.2021.22.1.209>
- Cheng, M., Deng, J., Yang, F., Gong, Y., Zhao, N., & Zhang, X. (2003). Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials*, 24(17), 2871–2880. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00117-0)
- Chilean Journal of Agricultural Research. (2012). 72(2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392012000200016>
- Colunga Biancatelli, R. M. L., Berrill, M., Catravas, J. D., & Marik, P. E. (2020). Quercetin and vitamin C: An experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19). *Frontiers in Immunology*, 11, 1451. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01451>
- Comes, B. A., Castillo, E. R. D., & Salvatierra, K. A. (2024). *Evaluación in silico de compuestos bioactivos derivados de fuentes vegetales como potenciales inhibidores de la proteína NS5 del virus del dengue* [Presentación en congreso]. *XLIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología (SAV)*, Centro de Convenciones de la Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina, Diciembre 2024.
- Conesa, A. L., Dellatorre, F. G., Latour, E., Ponce, A., Stortz, C. A., Scolaro, L. A., Alvarez, V. A., Lassalle, V. L., & Ayala-Peña. (2024). Antiviral potential of extracts from *Myriogloea major* against herpes simplex type 1, 2 and bovine coronavirus. *Phycological Research*. <https://doi.org/10.1111/pre.12564>

- Contreras-Esquivel, J. C., et al. (2023). *Biotechnia*, 25(1), 61–66.
<https://doi.org/10.18633/biotechnia.v25i1.1762>
- Cossu, C., Franceschi, V., Di Lorenzo, A., Bolli, E., Minesso, S., Cotti, C., ... & Donofrio, G. (2024). Cross-reactive immune response of bovine coronavirus spike glycoprotein to SARS-CoV-2 variants of concern. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(21), 11509.
<https://doi.org/10.3390/ijms252111509>
- Cuantificación y caracterización de fucoidanos de distintas algas pardas del Golfo Nuevo, Chubut, Argentina. (s.f.). *Quantification and characterization of fucoidans from different brown algae from Nuevo Gulf, Chubut, Argentina*.
- Dawre, S., & Maru, S. (2021). Human respiratory viral infections: Current status and future prospects of nanotechnology-based approaches for prophylaxis and treatment. *Life Sciences*, 278, 119561. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119561>
- Ding, Y., Cao, Z., Cao, L., Ding, G., Wang, Z., & Xiao, W. (2017). Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/srep45723>
- Dodgson, K. S., & Price, R. G. (1962). A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*, 84(1), 106–110.
- Dörschmann, P., & Klettner, A. (2020). Fucoidans as potential therapeutics for age-related macular degeneration—Current evidence from in vitro research. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9272. <https://doi.org/10.3390/ijms21239272>
- ElHassan, N. O., Crawford, B., Alamarat, Z., & Painter, J. T. (2023). Clinical review of risk of nephrotoxicity with acyclovir use for treatment of herpes simplex virus infections in neonates and children. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics: JPPT: The Official Journal of PPAG*, 28(6), 490–503. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-28.6.490>
- Filisetti-Cozzi, T. M. C. C., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197(1), 157-162
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90372-Z](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90372-Z)
- Galiano, V., Garcia-Valtanen, P., & Garcia, J. L. (2016). Looking for inhibitors of the dengue virus NS5 RNA-dependent RNA-polymerase using a molecular docking approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 34(7), 1506-1519. DOI:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5066851/>

- Hadi, S. M., Asad, S. F., Singh, S., & Ahmad, A. (2000). Putative mechanism for anticancer and apoptosis-inducing properties of plant-derived polyphenolic compounds. *IUBMB Life*, 50, 167–171. <https://doi.org/10.1080/152165400300001471>
- Heck, C. I., & de Mejia, E. G. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72, R138–R151.
- Hong, E., Song, J., Kim, S., Cho, J., Jeong, B., Yang, H., ... & Ko, H. (2020). Morin hydrate inhibits influenza virus entry into host cells and has anti-inflammatory effect in influenza-infected mice. *Immune Network*, 20(4). <https://doi.org/10.4110/in.2020.20.e32>
- Hou, Y., Wang, J., Jin, W., Zhang, H., & Zhang, Q. (2012). Degradation of Laminaria japonica fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.031>
- Huemer, H. P., Larcher, C., Kirchbner, W., Klingenschmid, J., Gottinger, W., & Irschick, E. U. (1996). Susceptibility of human retinal pigment epithelial cells to different viruses. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1007/BF00462030>
- Hussain, S. A., Sulaiman, A. A., Balch, C., Chauhan, H., Alhadidi, Q. M., & Tiwari, A. K. (2016). Natural polyphenols in cancer chemoresistance. *Nutrition and Cancer*, 68(6), 879–891. <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1192201>
- Imbs, T. I., Skriptsova, A. V., & Zvyagintseva, T. N. (2015). Antioxidant activity of fucose-containing sulfated polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* by different extraction methods. *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 545–553. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0293-7>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2022). *Mortalidad por cáncer cervicouterino en Argentina* [Imagen]. Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad-ccu>
- Kumar, R., Nayak, M., Sahoo, G.C., Pandey, K., Sarkar, M.C., Ansari, Y., Das, V., Topno, R., Bhawna, Madhukar, M., Das, P. (2019) Iron oxide nanoparticles based antiviral activity of H1N1 influenza A virus. *J Infect Chemother*. 25(5):325-329. doi: 10.1016/j.jiac.2018.12.006

- Laredo Tiscareño, S. V., Guo, X., & Bocanegra García, V. (2012). *Virus del dengue: estructura de serotipos y epidemiología molecular*. CienciaUAT, 6(3), 27–33
DOI:[10.29059/cienciauat.v6i3.54](https://doi.org/10.29059/cienciauat.v6i3.54)
- Li, B., Lu, F., Wei, X., & Zhao, R. (2021). Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules*, 26(3), 711. <https://doi.org/10.3390/molecules13081671>
- Li, J., Wang, Y., Rajpoot, S., Lavrijsen, M., Pan, Q., Li, P., & Baig, M. S. (2023). Investigating theobromine as a potential anti-human coronaviral agent. *Microbiology and Immunology*, 67(9), 404–412. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.13086>
- Li, X., Wang, X., Wang, X., & Chen, X. (2021). Chitosan-based nanomaterials for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 176–188.
- Lin, Y., Qi, X., Liu, H., Xue, K., Xu, S., & Tian, Z. (2020). The anti-cancer effects of fucoidan: A review of both in vivo and in vitro investigations. *Cancer Cell International*, 20, 154.
- Looker, K. J., Magaret, A. S., May, M. T., Turner, K. M. E., Vickerman, P., & Gottlieb, S. L. (2015). Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS ONE*, 10(1), e114989.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación.
- Mak, W., Hamid, N., Liu, T., Lu, J., & White, W. L. (2013). Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 95, 606–614.
- Mandal, P., Mateu, C. G., Chattopadhyay, C., Pujol, C. A., Damonte, E. B., & Ray, B. (2007). Structural features and antiviral activity of sulfated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 18, 153–162.
<https://doi.org/10.1177/095632020701800305>

- Marinho-Soriano, E., Fonseca, P. C., Carneiro, M. A. A., & Moreira, W. S. C. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology*, 97, 2402–2406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.014>
- Marques, V., & Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*, 113, 1370–1376.
- Martínez, A., Caballero, M., Silva, S., & Jiménez, C. (2002). *Aislamiento y caracterización de coronavirus bovino asociado a un brote de diarrea epizootica (Disentería Bovina) en bovinos adultos en Costa Rica*. III Seminario Internacional de Sanidad Animal y I Seminario de Producción Animal. ESPE, Sangolquí, Ecuador.
- Ministerio de Salud de la Nación. (2024). *Boletín Epidemiológico Nacional* N.º 686 [PDF]. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/2024/04/ben_686_se_1.pdf. (página consultada en octubre 2025)
- Milewska, A., Nowakowska, M., Ciejka, J., Wychowska, D., Chojnacka, K., Szczubiałka, K., & Pyrc, K. (2013). Novel polymeric inhibitors of HCoV-NL63. *Antiviral Research*, 97(2), 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.11.006>
- Montiel Schneider, M. G., Favatela, M. F., Muñoz Medina, G. A., Fernandez van Raap, M. B., & Lassalle, V. L. (2021). Multitherapy magnetic theranostic: Synthesis, characterization and in vitro evaluation of their performance. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 198(111460), 111460. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111460>
- Moreno, G. G. (2024). *Evaluación de la actividad antiviral in vitro de extractos de hojas de Ilex paraguariensis, yerba mate*. [Tesis de grado, Universidad de Buenos Aires]
- Mushtaq, F., Raza, Z. A., Batool, S. R., Zahid, M., Onder, O. C., Rafique, A., & Nazeer, M. A. (2022). Preparation, properties, and applications of gelatin-based hydrogels (GHs) in the environmental, technological, and biomedical sectors. *International Journal of Biological Macromolecules*, 218, 601–633. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.168>
- Niyonizigiye, I., Ngabire, D., Patil, M. P., Singh, A. A., & Kim, G. (2019). In vitro induction of endoplasmic reticulum stress in human cervical adenocarcinoma HeLa cells by fucoidan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 137, 844–852. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.043>

- Osmond, M. J., & Mccall, M. J. (2010). Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: An analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology*, 4(1), 15–41. <https://doi.org/10.3109/17435390903502028>
- Pellá, M. C., Lima-Tenório, M. K., Tenório-Neto, E. T., Guilherme, M. R., Muniz, E. C., & Rubira, A. F. (2018). Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 196, 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>
- Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004>
- Pradhan, B., Nayak, R., Patra, S., Bhuyan, P. P., Behera, P. K., Mandal, A. K., Behera, C., Ki, J., Adhikary, S. P., MubarakAli, D., & Jena, M. (2022). A state-of-the-art review on fucoidan as an antiviral agent to combat viral infections. *Carbohydrate Polymers*, 119551.
- Revuelta, J., Rusu, L., Frances-Gomez, C., Trapero, E., Iglesias, S., Pinilla, E. C., ... & Fernández-Mayoralas, A. (2025). Synthetic heparan sulfate mimics based on chitosan derivatives show broad-spectrum antiviral activity. *Communications Biology*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-025-07763-z>
- Roy, S. K., & Bhattacharjee, S. (2021). Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Canadian journal of microbiology*, 67(10), 687-702.
- Saepudin, E., Qosthalani, F. A., & Sinurat, E. (2018). Fucoidan cytotoxicity against human breast cancer T47D cell line increases with higher level of sulfate ester group.
- Salaemae, W., Junaid, M., Angsuthanasombat, C., & Katzenmeier, G. (2010). Structure-guided mutagenesis of active site residues in the dengue virus two-component protease NS2B-NS3. *Journal of biomedical science*, 17(1), 1-8. DOI: [10.1186/1423-0127-17-68](https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-68)
- Scherer, W. F. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. *Journal of Immunology*, 71, 249–259.
- Schneider, S. L., & Lim, H. W. (2018). A review of inorganic UV filters zinc oxide and titanium dioxide. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, 35(6), 442–446. <https://doi.org/10.1111/phpp.12439>
- Simmons, C. P., Farrar, J. J., Nguyen, V. V., & Wills, B. (2012). Dengue. *New England Journal of Medicine*, 366(15), 1423–1432.

- Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., & Mohamad, D. (2015). Review on Zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
- Song, J. M., Lee, K. H., & Seong, B. L. (2005). Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Research*, 68(2), 66–74.
- Te Velthuis, A. J. W., et al. (2010). Zn²⁺ inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture. *PLoS Pathogens*, 6(11), e1001176.
- Troost, B., & Smit, J. M. (2020). Recent advances in antiviral drug development towards dengue virus. *Current Opinion in Virology*, 43, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.07.002>
- Tsai, R., Kuo, T., Hung, S., Lin, C., Hsien, T., Wang, D., & Hsieh, H. (2014). Use of gum arabic to improve the fabrication of chitosan–gelatin-based nanofibers for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 115, 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.108>
- Verssimo, J., & De Medeiros Fernandes, T. a. A. (2012). Human papillomavirus: biology and pathogenesis. In *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/27154>
- Warnes, S. L., Little, Z. R., & Keevil, C. W. (2015). Human coronavirus 229E remains infectious on common touch surface materials. *mBio*, 6(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01697-15>
- Whitehorn, J., & Simmons, C. P. (2011). The pathogenesis of dengue. *Vaccine*, 29(42), 7221–7228.
- Zandi, K., Teoh, B. T., Sam, S. S., Wong, P. F., Mustafa, M. R., & AbuBakar, S. (2011). Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology Journal*, 8, 560.
- Zhu, S., & Viejo-Borbolla, A. (2021). Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence*, 12(1), 2670–2702. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1982373>