

Tesis de Posgrado

Actividad antiviral de productos naturales

Wachsman, Mónica Beatriz

1987

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Wachsman, Mónica Beatriz. (1987). Actividad antiviral de productos naturales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2056_Wachsman.pdf

Cita tipo Chicago:

Wachsman, Mónica Beatriz. "Actividad antiviral de productos naturales". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2056_Wachsman.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE PRODUCTOS NATURALES

MONICA BEATRIZ WACHSMAN

Directora de Tesis: Dra. Celia E. Coto.

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Virología. Departamento
de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. U.B.A.

Tesis presentada para optar al título
de Doctor en Ciencias Químicas

- 1987 -

- 2056 -
g.2

A MIS PADRES,
A MI ESPOSO Y
A MIS HIJOS.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. CELIA E. COTO por la valiosa supervisión de este trabajo y por sus enseñanzas y apoyo continuo durante la realización del mismo, así como también por la lectura crítica del manuscrito original.

Al Dr. OSVALDO A. PESO por su apoyo desde mi iniciación en el campo de la investigación.

Al Dr. RAMON A. de TORRES por su apoyo y las sugerencias aportadas para la realización de este trabajo.

A la Dra. ELSA B. DAMONTE compañera y consejera durante la realización de este trabajo.

Al Dr. JUAN ACCORINTI por su asesoramiento en el trabajo con los extractos de algas y su constante estímulo.

A la Lic. GRACIELA M. ANDREI por su especial colaboración en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio LAURA ALICHE, FELIX COULOMBIE, SILVIA CORONATO, ANA CRISTINA D'AIUTOLO, NELIDA CANDURRA, SUSANA MERSICH, NOEMI STEYERTHAL, LUIS SCOLARO, JUAN CLAUS, ADRIANA DESCALZO, PATRICIA GADALETA, JORGE LAMPURI y SOFIA PICCINALI por su constante estímulo.

A la Sra. LILIANA INES VAZQUEZ por la tarea dactilográfica realizada.

Al Sr. PABLO RAVASCHINO por su ayuda en la realización de los gráficos.

ABREVIATURAS .

- p.i. : post-infección.
m.i. : multiplicidad de infección.
UFP : unidades formadoras de placa.
 μ g : microgramos.
c.p.m.: cuentas por minuto.
r.p.m.: revoluciones por minuto.
RNA : ácido ribonucléico.
DNA : ácido deoxiribonucléico.
log. : logaritmo en base 10.
UHA : unidad hemoaglutinante.
NDV : virus de la enfermedad de Newcastle.
VSV : virus de la estomatitis vesicular.
ACP : acción citopatogénica.
MA : extracto de Melia azedarach L.
PBS : "buffer" salino fosfatado.
DL₅₀ : dosis letal 50%.
i.p. : intraperitoneal.
PM : peso molecular.
PCA : ácido perclórico.

I N D I C E .

OBJETIVOS.....	1.
----------------	----

I N T R O D U C C I O N .

1. Prevención por vacunas.....	2.
1.1. Enfermedades que son blancos potenciales para la quimioterapia antiviral.....	4.
2. Quimioterapia antiviral.....	8.
2.1. Sustancias de síntesis química.....	10.
2.2. Interferones.....	17.
2.3. Actividad antiviral de productos naturales.....	21.
2.3.1. Extractos de plantas inferiores.....	23.
2.3.2. Extractos de plantas superiores.....	28.
2.3.2.1. Alcaloides.....	28.
2.3.2.2. Taninos.....	31.
2.3.2.3. Lignanós.....	32.
2.3.2.4. Hidratos de carbono.....	33.
2.3.2.5. Proteínas.....	34.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S .

1. Medios, soluciones y reactivos.....	42.
1.1. Medios.....	42.
1.2. Soluciones.....	43.
1.2. Reactivos.....	45.
2. Vírus.....	45.
3. Cultivos celulares.....	47.
4. Ratones.....	48.
5. Huevos embrionados.....	48.

6. Obtención de los extractos vegetales.....	48.
6.1. Extractos hidroalcohólicos de raíces.....	48.
6.2. Extractos hidroalcohólicos de parte aérea de <u>Melia azedarach L</u>	49.
6.3. Extractos acuosos de material fresco.....	51.
6.4. Extracto del alga <u>Coelastrum proboscideum</u> <u>var dilatalum</u>	53.
7. Preparación de stocks de los virus.....	53.
8. Ensayo de citotoxicidad.....	55.
9. Determinación de la infectividad.....	56.
9.1. Titulación por observación de la acción citopatogénica (ACP).....	57.
9.2. Titulación por el método de formación de placas bajo agar (UFP).....	58.
9.3. Titulación por hemaglutinación.....	59.
10. Métodos de detección de la actividad antiviral....	59.
10.1. Acción antiviral in-vitro.....	59.
10.2. Acción antiviral sobre la multiplicación.....	59.
11. Clonado del virus Sindbis en células BHK-21.....	60.
12. Determinación de centros infecciosos.....	61.
13. Obtención del inmunosuero anti-Sindbis.....	62.
13.1. Titulación del inmunosuero por ensayo de neutralización.....	62.
14. Ensayo de penetración del virus Sindbis en células BHK-21.....	63.
15. Ensayo de incorporación de (³ H)-uridina en el RNA de monocapas de células BHK-21 crecidas en viales.	64.

15.1. Ensayo de incorporación de $^3\text{(H)}$ -uridina en el RNA de células BHK-21 en ausencia y en presencia del extracto de <u>Melia azedarach L.</u>	65.
15.2. Ensayo de incorporación de $^3\text{(H)}$ -uridina a distintos tiempos p.i. en el sistema virus Sindbis-células BHK-21.....	65.
16. Ensayo de incorporación de $^3\text{(H)}$ -leucina.....	66.
17. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Análisis de las proteínas en células infectadas.....	67.
17.1. Preparación de las muestras.....	67.
17.2. Electroforesis en gel.....	69.
17.3. Fluorografía.....	70.
17.4. Determinación de los pesos moleculares utilizando marcadores.....	71.

R E S U L T A D O S .

PARTE I: BUSQUEDA DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL.

1. Plantas ensayadas.....	73.
1.2. Ensayo de citotoxicidad.....	73.
1.3. Acción de los extractos sobre la multiplicación viral.....	77.
1.4. Efecto de los extractos del alga <u>Coelastrum proboscideum</u> var dilatatum sobre la multiplicación de virus animales.....	84.

PARTE II: PROPIEDADES DEL PRINCIPIO ACTIVO DE MELIA AZEDARACH L: INDUCCION DE UN ESTADO ANTIVIRAL.

2.1. Acción del extracto de <u>Melia azedarach</u> sobre la viabilidad celular.....	88.
2.1.1. Sobre monocapa preformada.....	88.
2.1.2. Acción de M.a. sobre la adherencia celular.....	88.
2.2. Ensayo de toxicidad para animales.....	91.
2.2.1. Ratones adultos.....	91.
2.2.2. Ratones neonatos.....	91.
2.3. Ensayo de toxicidad para huevos embrionados.....	92.
2.4. Modo de acción del extracto de <u>Melia azedarach</u> L.	92.
2.4.1. El efecto de M.a. no se manifiesta por acción directa sobre la partícula viral.....	92.
2.4.2. Inducción de un estado antiviral por pretratamiento de las células con el extracto.....	94.
2.4.3. Influencia de la célula huésped sobre la acción antiviral del extracto.....	95.
2.4.4. Falta o carencia de pasaje de una sustancia anti viral al medio de cultivo.....	98.
2.4.5. Características del estado antiviral.....	100.
2.4.5.1. Determinación del tiempo mínimo de pretratamiento de las células con el extracto.....	100.
2.4.5.2. Duración del estado antiviral.....	102.
2.4.5.3. Efecto del extracto a distintos tiempos post-infección.....	102.

PARTE III: UBICUIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO DE MELIA AZEDARACH L: ENSAYOS ORIENTADOS A SU CARACTERIZACION Y PURIFICACION PARCIAL.

3. Presencia del inhibidor en diferentes partes de la planta.....	107.
3.1. Ensayos de toxicidad del extracto de MAsp para células, animales y huevos embrionados.....	108.
3.2. Espectro de acción antiviral del MAsp.....	109.
3.3. Caracterización parcial del extracto de <u>Melia azedarach L.</u>	109.
3.3.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto.....	111.
3.3.2. Tratamiento con proteasas.....	111.
3.3.3. Tratamiento del extracto MAsp con ácidos y álcalis.....	115.
3.4. Purificación parcial del principio activo.....	115.
3.4.1. Filtración de MAsp por columna de Sephadex G-25.	115.
3.4.2. Precipitación fraccionada del extracto con sulfato de amonio.....	118.

PARTE IV: MODO DE ACCION: PASO DE LA REPLICACION VIRAL AFECTADO POR LA ACCION DE MELIA AZEDARACH L.

4.1. Acción del extracto de MA sobre la multiplicación viral.....	123.
4.2. Efecto del extracto de MA en distintos estados de purificación sobre la multiplicación del virus Sindbis.....	125.
4.3. Inhibición de la replicación del virus Sindbis por MA cuando este multiplica bajo condiciones de un sólo ciclo.....	127.

4.4. Efecto de MA agregado a distintos tiempos p.i. sobre la replicación del virus Sindbis.....	129.
4.5. Efecto de MA sobre la adsorción y penetración del virus Sindbis a células BHK-21.....	129.
4.6. Efecto del extracto de MA sobre la síntesis del RNA viral.....	134.
4.7. Efecto de MA sobre la síntesis de proteínas vir <u>a</u> les.....	136.
D I S C U S I O N	142.
B I B L I O G R A F I A	152.

O B J E T I V O S

El objetivo de este trabajo de Tesis fue encontrar una sustancia de origen natural con un amplio espectro de actividad antiviral y que no resultara tóxica para la célula huésped como sucede con la mayoría de las drogas de síntesis química.

Para lograr tal propósito se analizaron en forma sistemática diferentes extractos de plantas seleccionados por ser considerados vulgarmente como plantas medicinales.

Durante el desarrollo de ese trabajo de búsqueda se encontró que el extracto crudo de Melia azederach L (nv paraíso) cumplía aparentemente con los requisitos definidos por nosotros al comenzar las investigaciones.

Por eso se procedió a caracterizar parcialmente el principio activo en lo referente a sus propiedades y naturaleza química y a determinar su posible mecanismo de acción antiviral utilizando como sistema modelo la infección de células BHK con el Togavirus Sindbis.

I N T R O D U C C I O N

1. PREVENCION POR VACUNAS.

Las enfermedades virales son una de las causas de mayor morbilidad y pérdidas económicas, principalmente en los países desarrollados, mientras que en otros se agravan aún más debido al mal estado nutricional y condiciones de vida de la población. Sin embargo es tranquilizador constatar que la incidencia de muchas enfermedades virales como: viruela, poliomielitis, fiebre amarilla y sarampión, ha disminuído notablemente a nivel mundial en las últimas décadas debido al éxito de las campañas de vacunación. Dado que, la mejor forma de combartirlas en el huésped es por la estimulación de respuestas inmunes específicas, mediante el uso de inmunógenos apropiados.

Los avances realizados en el aislamiento, purificación y clonado de antígenos virales, ha llevado al desarrollo de vacunas cada vez más efectivas y seguras, aunque existen todavía muchas infecciones en las que no se han obtenido resultados exitosos.

Un listado de las vacunas que se encuentran actualmente en uso se muestra en el Cuadro 1. En la última parte del mismo se encuentran las vacunas obtenidas por ingeniería genética, de reciente data, dentro de éstas debemos mencionar a aquellas que utilizan el virus de Vaccinia para la expresión de genes extraños. Los recombinantes de este virus, tienen una gran variedad de usos potenciales incluyendo la expresión e inmunogenicidad de antígenos de los virus de hepatitis B y SIDA (90).

Cuadro 1. Vacunas virales que se encuentran en uso y/o
experimentación para humanos.

V I R U S	V A C U N A	
	a t e n u a d a	i n a c t i v a d a
Polio	+	+
Influenza	+*	+
Paperas	+	+***
Sarampión	+	**
Respiratorio sincicial.	no recomendada	-
Rabia	-	+
Fiebre amarilla	+	-
Rubeola	+	+*
Viruela	+	-
Adeno 4,7	+*	+
Herpes simplex	+*	+*
Varicela-zoster	+*	-
Citomegalo (CMVO)	+*	-
Hepatitis A	+*	-
Hepatitis B	-	+
Vacunas obtenidas por Ingeniería Genética.		

+* : experimental.

+** : no recomendada.

+*** : inmunosuprimidas o embarazadas.

También se han usado las técnicas de ingeniería genética para la estabilización del genotipo del virus de Polio en forma de cDNA clonado en plásmidos bacterianos (92). Los resultados de los ensayos biológicos in-vitro y los de neurovirulencia en monos sugieren que el virus tiene la calidad deseada para su uso como vacuna.

Como es sabido, las vacunas son sólo efectivas cuando se administran antes de la infección. Por eso cuando aparece una nueva cepa de virus como sucede, por ejemplo con el caso de influenza, la enfermedad se disemina tan rápidamente que resulta imposible desarrollar, distribuir y administrar una vacuna contra esta nueva cepa lo suficientemente rápido como para proteger significativamente a gran parte de la población.

Lo mismo ocurre con algunos picornavirus en los que la variación antigénica es demasiado grande. Otro inconveniente con las vacunas ocurre con los miembros de la familia Herpesviridae por problemas de latencia, reactivación, teratogénesis y oncogénesis. En estos casos una terapéutica con antivirales resulta de suma importancia.

1.1. Enfermedades que son blancos potenciales para la quimioterapia antiviral.

En los casos en que no existen vacunas apropiadas y cuando se trata de inmunosuprimidos etc. el desarrollo de una quimioterapia antiviral específica es de primordial importancia para combatir una infección de origen viral. En el cua

dro 2 se muestra la necesidad del uso de antivirales cuando existe una morbilidad y/o mortalidad significativa.

En muchas infecciones virales los síntomas clínicos aparecen relativamente tarde y en algunas sólo cuando la replicación viral ha cesado. Conviene recordar que los antivirales sólo pueden tener valor terapéutico en aquellas infecciones donde los síntomas y cambios patológicos se desarrollan en presencia de replicación viral. Como se puede apreciar en el Cuadro 2 entre las enfermedades que son blanco adecuado para la quimioterapia antiviral se encuentran muchas de las infecciones por herpes virus que ocurren comunmente en humanos, las que tienen todas características de latencia después de la infección primaria.

Las infecciones por Citomegalovirus (CMV) también son blancos apropiados, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, ya que en sujetos normales las infecciones son generalmente asintomáticas y su prevención está centrada en el uso de vacunas.

El virus de Epstein-Barr (EBV) que produce la mononucleosis infecciosa también parece ser susceptible a una terapia antiviral, ya que hasta el presente no se han desarrollado vacunas contra este virus.

Existen muchos virus que causan enfermedades respiratorias en humanos, pero desgraciadamente éstos resultan difíciles de identificar debido a que las sintomatologías clínicas no son bien distinguibles; dentro de éstas tenemos las

Cuadro 2: Enfermedades humanas que son blanco potenciales para la quimioterapia antiviral.

CARACTERISTICAS	TIPO DE VIRUS O ENFERMEDAD O SINDROME
Alta incidencia y baja mortalidad.	Herpes simplex labialis, genitalis, queratitis. meningitis por enterovirus, herpangina, resfrio por Rinovirus. Varicela. Dengue. Influenza, parainfluenza. Respiratorio sincicial. Adenovirus. mononucleosis por Epstein-Barr virus. Hepatitis A, B no A no B.
Baja incidencia y alta mortalidad.	Rabia(humana). encefalitis por Herpes simplex virus Marburg. Lassa y otras fiebres hemorrágicas. Equina del este y otras encefalitis por Arbovirus.
Regular incidencia y alta mortalidad.	SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida).
Infecciones severas de oportunistas en inmunodeficientes o en inmunosuprimidos.	neumonía por Herpes simplex, neumonía por Varicella. desordenes linfoproliferativos por Epstein-Barr. neumonía, retinitis o colitis por CMV.
Infecciones persistentes o virus lentos.	leucoencefalitis multifocal progresiva. Enfermedad de Jakob-Creutzfeldt Panencefalitis esclerosante subaguda.

infecciones producidas por Rinovirus (agente responsable del resfrío común) que son muy importantes desde el punto de vista económico y además porque producen la exacerbación de ciertas enfermedades como: bronquitis, sinusitis y otitis media en pacientes predispuestos. Las infecciones por Rinovirus también resultan blancos apropiados para el desarrollo de drogas antivirales porque, si bien las infecciones con este virus se pueden prevenir por medio de una vacuna, en la actualidad resulta muy poco práctico el desarrollo de vacunas politípicas que puedan cubrir los por lo menos 120 tipos distintos de virus. El virus respiratorio sincicial, que produce neumonías y bronqueolitis severas y aún fatales en los niños, también es blanco indicado para el uso de antivirales ya que la vacunación no es adecuada, porque en niños vacunados se han producido enfermedades respiratorias severas.

De la misma manera que las enfermedades respiratorias son producidas por diferentes virus, muchos virus pertenecientes a diferentes familias incluyendo rotavirus, adenovirus, calicivirus y coronavirus están involucradas en gastroenteritis severas.

En países desarrollados los rotavirus son probablemente la causa más importante de muerte por diarreas. Muchos intentos se han realizado para tratar de desarrollar vacunas contra estos virus, pero éstos tienen una variabilidad antigénica semejante a la del virus de influenza y por ello también resultan blanco adecuado para el desarrollo de nuevas drogas antivirales.

Otro virus para el que también es necesario obtener un buen antiviral es el de Hepatitis B, ya que la vacunación con este virus hasta el presente sólo es recomendable para la inmunización de sujetos de alto riesgo de infección como: drogadictos, hemofílicos, homosexuales, personal médico y paramédico.

El SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia adquirida) es otra de las enfermedades para la que el desarrollo de drogas antivirales efectivas es de suma importancia debido al alto índice de mortalidad y morbilidad que el mismo produce en la actualidad y también debido al hecho de que no se cuenta todavía con una vacuna efectiva que pueda prevenir los estragos que está ocasionando en los últimos años especialmente en los países desarrollados (98).

2. QUIMIOTERAPIA ANTIVIRAL.

Durante mucho tiempo prevaleció la idea de que el ciclo de replicación viral seguía estrictamente el camino metabólico de la célula huésped y que era imposible bloquear la replicación viral sin afectar al metabolismo celular. Este concepto ya no es sostenible en la actualidad. En los últimos años han aumentado las evidencias de que los virus y las células infectadas exhiben algunas características que son cualitativa o cuantitativamente distintas a la célula normal sin infectar (41).

Esta diferencia se vé más claramente en los herpesvirus que son capaces de inducir una gran variedad de enzimas espe-

cíficas por ej.: timidino-quinasa; DNA-polimerasa; 3'-5'-exo-deoxiribonucleasa; ribonucleotido-sintetasa y dUTP-pirofofata. Estas enzimas, o están ausentes en la célula sin infectar o son fundamentalmente diferentes a las presentes en la célula normal. En general tienen una especificidad de sustrato más amplia.

La enzima timidinoquinasa inducida por los herpes virus puede reconocer como sustratos a los análogos timidina y deoxicitidina, estos sustratos no son reconocidos por las quinasas celulares y por ello restringen su acción antiviral a las células infectadas por virus.

Otros hechos específicos que ocurren sólo en las células infectadas por virus y por lo tanto pueden servir como blanco apropiado para la acción de drogas antivirales son:

- 1) Fusión de viriones con la membrana celular, fenómeno que ocurre durante la penetración y liberación.
- 2) Desnudamiento (uncoating) del virus que también requiere la interacción del virus con las membranas de las vacuolas lisosomales.
- 3) Ruptura proteolítica de precursores de proteínas virales que es un paso esencial en el ensamblaje de los viriones (por ej.: en orto y paramixovirus, picorna y togavirus).
- 4) Síntesis de DNA o RNA viral, que es realizada muchas veces por DNA polimerasas (herpesvirus) o RNA polimerasas (mixovirus) específicas del virus.
- 5) Maduración de los mRNA virales que puede imponer a la célula mayores demandas energéticas que la maduración del mRNA celular.

6) Glicosilación de las proteínas virales que son requeridas para el ensamblaje de los virus envueltos.

La mayoría de los agentes antivirales que han sido estudiados hasta el presente ejercen su acción sobre uno o más de estos blancos. Estos compuestos tienen una especificidad bastante grande en su acción antiviral. Algunos de éstos han sido introducidos en clínica y otros están siendo investigados como antivirales potenciales en el tratamiento de enfermedades virales (42).

Vamos a dividir a las sustancias con posible actividad antiviral en tres grandes grupos:

- Sustancias de síntesis química.
- Interferones.
- Productos de origen natural.

2.1. Sustancias de síntesis química.

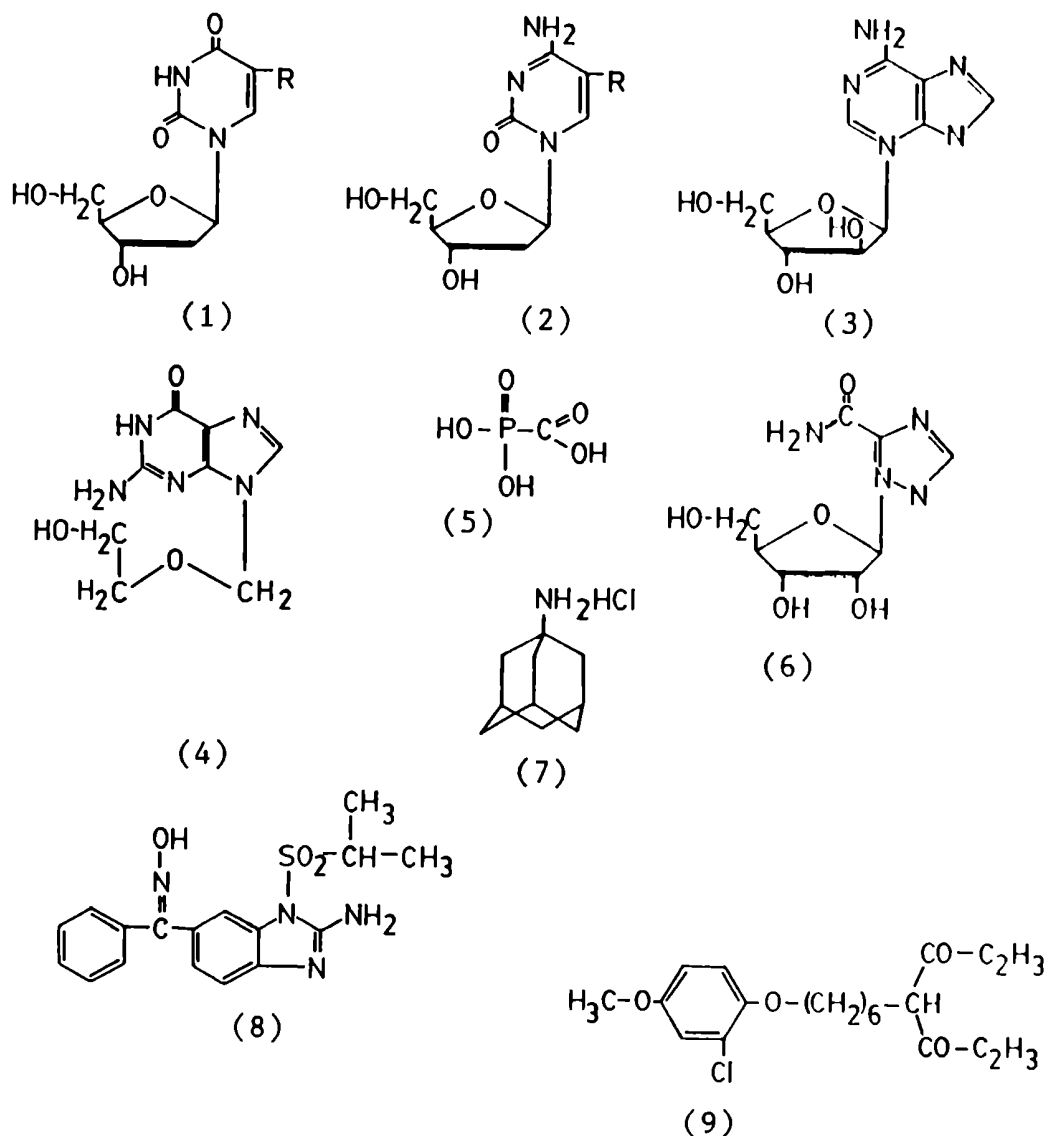
Los antivirales han sido agrupados en diferentes clases de acuerdo a su estructura química, modo de acción y espectro antiviral.

Las fórmulas de los compuestos más importantes se ven en la Figura 1 y su lugar de acción en el ciclo replicativo se encuentra en la Figura 2.

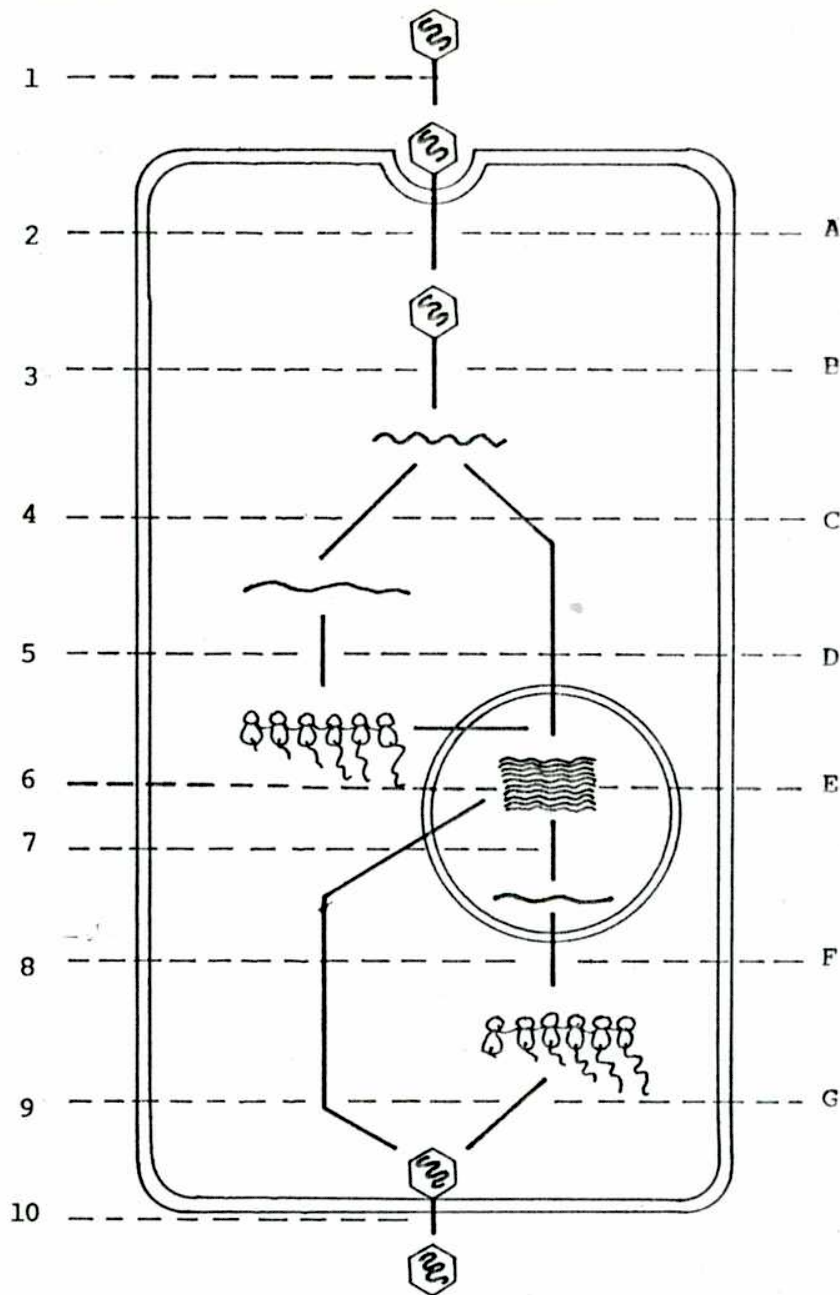
De todas las drogas antivirales ensayadas hasta el presente sólo un pequeño número han obtenido su licencia para ser utilizadas en humanos (Cuadro 3).

Algunas de estas drogas en ciertos casos son altamente activas pero son tóxicas, lo que limita su uso a aplicaciones

Figura 1: Estructura y abreviaturas de los antivirales de síntesis química.



- 1) R= 1,5-Iodo-2'-deoxiuridina(5-iodo-dUrd).
- 2) R= 1,5-Iodo-2'-deoxicitidina(5-iodo-dCid).
- 3) 9-B-D-Arabinofuranosil-adenina (Ara-A).
- 4) 9(2-Hidroxi-etoximetil)-guanina Acyclovir.
- 5) Acido fosfonofórmico.
- 6) Ribavirina.
- 7) Clorhidrato de 1-Adamantanamina (Amantadina).
- 8) 2-Amino-1-(isopropilsulfonil)-6-benzimidazolfenilacetona-oxima (Enviroxima).
- 9) 4-(6(2-Cloro-4-metoxi)fenoxi)-hexil)-heptano-3,5-diona (Arildone).



- | | |
|----------------------------|---|
| 1. Adsorción. | A. Oligopéptidos específicos. |
| 2. Penetración. | B. Amantadina. Arildone. |
| 3. Desnudamiento, | C. Ribavirina. Oligodeoxinucleótidos específicos. |
| 4. Transcripción temprana. | Inhibidores de la transcriptasa reversa. |
| 5. Traducción temprana. | D. Inhibidores de la síntesis de proteínas. In- |
| 6. Replicación. | terferón. |
| 7. Transcripción tardía. | E. Iodo-deoxi-uridina-Ara A. Aciclovir. Acido |
| 8. Traducción tardía. | fosfonoacético. |
| 9. Ensamblaje. | F. Inhibidores de la síntesis de proteínas. |
| 10. Liberación. | G. Inhibidores de la glicosilación. |

Cuadro 3: Drogas antivirales que hasta el presente han obtenido su licencia para ser usadas en humanos.

GRUPO DE VIRUS	TIPO DE VIRUS	DROGA	FORMA DE ADMINIS-TRACION.
Pox	Viruela	Metisazona	Oral
Herpes	Herpes simplex	Iododeoxiuridina	Tópico
		Acyclovir	Tópico y Oral.
	Varicella zoster	Iododeoxiuridina	Tópico
		Acyclovir	Parenteral.
Mixovirus	Influenza A	Amantadina	Oral.

tópicas o al tratamiento de enfermos en los cuales hay peligro de muerte, pero en otros la efectividad clínica es menor.

Una nueva era de drogas antivirales ha sido introducida por el acyclovir, un compuesto que es altamente efectivo contra el grupo de los herpesvirus, especialmente Herpes simplex y Varicela zoster, tiene un modo de acción que protege a células infectadas, se puede administrar en forma sistémica. La timidinoquinasa de los herpes virus fosforila esta droga mucho más eficientemente que las enzimas celulares, convirtiéndola en su forma activa (51).

La administración del acyclovir en forma tópica es efectiva para el tratamiento del herpes labialis (48), (91).

Para el tratamiento del herpes genital inicial y o recurrente se administra en forma tópica u oral. Esta última también ha dado resultados satisfactorios en la supresión de la recurrencia (88). El primer agente antiviral efectivo contra la queratitis herpética epitelial en aplicaciones tópicas ha sido la iodo-deoxiuridina (IDU) (74). Esta droga probablemente es incorporada tanto en el DNA de la célula huésped como en el viral, la misma llega a pocas células, de forma tal que no se produce una lesión seria y las células corneales lesionadas se regeneran una vez que se ha inhibido la multiplicación viral y que se han eliminado las células infectadas.

La amantadina es otra de las drogas cuyo uso está permitido en humanos. La misma se utiliza para el tratamiento y

profilaxis del virus de Influenza A. La rimamantadina que es el α -metil derivado parece ser más potente pero se encuentra todavía en estado de experimentación. Estas drogas aparentemente ejercen su acción sobre un proceso específico en el ciclo de replicación del virus ya que se cree que actúan entre el desnudamiento y la transcripción primaria (67), (109). No se usan con demasiada frecuencia debido a la necesidad de identificar que el brote es debido a Influenza A y porque pueden producir efectos adversos en la gestación (107).

La ribavirina también se ha utilizado en humanos en forma oral para el tratamiento de Influenza A (36) (82) (118) pero sólo se han obtenido éxitos parciales con la misma. Recientemente se ha aplicado en forma de aerosol para el tratamiento de Influenza A y B (76) y también del virus respiratorio sincicial (62) siendo los resultados alcanzados más promisorios. La ribavirina posee un amplio espectro antiviral contra una serie de virus a RNA y DNA tanto in vitro como in vivo (64) (115) (116). La inhibición de la replicación viral aparentemente se produce por un bloqueo en la síntesis del DNA ó RNA viral.

La metisazona (N-metilisantin-B-tiosemicarbazona) es una de las drogas clásicas, pero actualmente es de interés histórico porque su actividad antiviral es contra la viruela. El mecanismo de acción permanece oscuro pero parece que actúa en un paso tardío de la replicación después de la síntesis del DNA viral (21).

Es importante tener en cuenta, especialmente para las

aplicaciones tópicas de sustancias antivirales, que en las células infectadas por virus generalmente la permeabilidad está alterada y por lo tanto es factible administrar drogas que para las células normales son bastante tóxicas o no penetran en condiciones normales (32).

Teniendo en cuenta este hecho podremos obtener agentes antivirales mucho más poderosos que los que se encuentran en uso actualmente, especialmente para los virus a RNA para los cuales es difícil encontrar inhibidores efectivos.

En comparación con las vacunas el esfuerzo puesto en el diseño de nuevas drogas y en su experimentación no ha tenido demasiado éxito. Como lo muestra claramente el Cuadro 3 de las miles de drogas ensayadas solo pueden ser consideradas no más de tres.

A pesar de este desaliento el estudio de la terapia antiviral está adquiriendo una importancia cada vez mayor. A medida que estas drogas se apliquen a un número mayor de pacientes es probable que aparezcan efectos colaterales aún desconocidos y fenómenos de resistencia semejantes a los que se obtienen con los antibióticos en la actualidad, no obstante, es aconsejable el desarrollo de una quimioterapia adecuada para tener otra forma de combatir las enfermedades de origen viral independientemente de la existencia o no de una vacuna.

También será de primordial importancia poder utilizar estas drogas sintéticas en el tratamiento de virosis en animales y plantas.

2.2. Interferones.

Al hablar del uso de drogas antivirales no podemos dejar de citar a los interferones, que son proteínas sintetizadas por células de vertebrados en respuesta a una variedad de estímulos virales o no virales (ejemplo: endotoxinas bacterianas, micoplasmas, protozoos, rickettsias, polímeros sintéticos como ácido poliacrílico, polisacaridos de algas, etc.) que le confieren a la célula huésped un estado antiviral a través de un mecanismo que requiere síntesis de RNA Y proteínas.

Los interferones se dividen en 3 clases: α ó de leucocitos, β ó de fibroblastos y γ ó inmune. El interferón γ es producido por linfocitos T en respuesta a mitógenos o antígenos a los que están sensibilizados. Originariamente se ha pensado que los interferones solo son activos en las especies animales en las cuales han sido inducidos, pero ésto no es enteramente cierto, ya que el interferón humano α es activo en muchas especies de mamíferos, aunque los α y β interferones tienen un rango de huésped parecido.

En el Cuadro 4 se observan algunas de las proteínas sintetizadas en respuesta al interferón y su modo de acción. Estas enzimas sólo son activas en presencia de RNA doble cadena y ATP (14), (145), se produce una inhibición de la transcripción o traducción viral.

En el Cuadro 5 se ven otras acciones distintas a la actividad antiviral del interferón.

Una de las actividades más importantes es la inhibición

Cuadro 4: Actividades enzimáticas dependientes del RNA
doble cadena inducidas por el interferón.

E N Z I M A S	A C C I O N
Proteinoquinasa	Fosforila el factor de iniciación el $e\text{-F}_2$ inhibiendo la iniciación de la cadena peptídica.
2'5'-oligoadenilatosintetasa.	Activa endoribonucleasa. Degrada RNA mensajero.

Cuadro 5: Algunos efectos no antivirales del Interferón.

Inhibición del crecimiento.

Inmunomodulación.

Alteraciones de la superficie celular.

Efectos sobre la diferenciación celular.

Cambios en el metabolismo celular.

de la proliferación celular. El efecto anticelular ha sido observado in vitro, en modelos animales y en neoplasias humanas.

El interferón modula diversos aspectos de la inmunidad celular y humoral (122). La síntesis de anticuerpos puede ser disminuída o aumentada dependiendo de las condiciones experimentales. La actividad de las células asesinas naturales, de las células T citotóxicas y de la fagocitosis por los macrófagos está aumentada.

Los interferones tiene un amplio espectro de actividad antiviral aunque algunos virus son característicamente más sensibles a la inhibición in vitro que otros (121), por ejemplo VSV es extremadamente sensible, mientras que no ocurre lo mismo con el grupo de los Herpes virus.

La administración del interferón o la manipulación apropiada de los mecanismos naturales de defensa del huésped puede proveer un medio práctico de controlar las infecciones virales.

El interferón cuando es usado en clínica puede tener una serie de efectos colaterales no deseables como fiebre, fatiga, anorexia, pérdida de peso, náuseas y vómitos, dolor en el sitio de la inyección, linfadenopatía y pérdida del cabello(112). En algunos pacientes se produce un aumento de las transaminasas en suero. Por todos estos efectos que si bien son reversibles, es necesario establecer un esquema de dosis apropiado cuando es usado sólo o en combinación con otras drogas.

En el Cuadro 6 podemos ver las enfermedades para las que se usa actualmente en clínica y por que vía se administra.

Los tratamientos más exitosos con interferón han sido los de verrugas y papilomas asociados a virus (97).

Otras enfermedades virales en las cuales la terapia con interferón deberá ser considerada incluye rabia, encefalitis severas (como aquellas causadas por los Togavirus: Encefalitis de San Luis, encefalitis japonesa, encefalitis equina del este y del oeste), enfermedades producidas por Arenavirus (como fiebre Lassa, virus Ebola), Influenza y otras infecciones respiratorias y las infecciones por virus lentos tales como Jakob-Creutzfeldt y Panencefalitis esclerosante subaguda. El interferón ha demostrado ser de utilidad en el tratamiento del Sarcoma de Kaposi (77) y también en jóvenes homosexuales con inmunodeficiencias severas.

Como vemos también las grandes esperanzas cifradas en el Interferón como potente antiviral se han reducido drásticamente con la práctica de su uso, su utilidad como antiviral queda muy restringida a ciertas infecciones en especial a aquellas asociadas a tumores.

2.3. Actividad antiviral en productos naturales.

La dificultad de encontrar drogas terapéuticas activas de origen sintético y que no sean tóxicas, especialmente para las infecciones por RNA virus en animales, y la sugerencia de Herrmann (63) de que los productos naturales son preferibles a los sintéticos como fuente de nuevos agentes antiviral

Cuadro 6: Enfermedades que son controladas actualmente con el Interferón usado como antiviral.

ENFERMEDAD	VIA DE ADMINISTRACION	DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD CON LA TERAPIA.
Profilaxis del resfrío común producido por Rinovirus.	Tópico	Disminución de severidad de enfermedad y de la diseminación después del desafío viral.
Queratitis por Herpes simplex.	Tópico	Curación más rápida.
Herpes zoster en huéspedes inmunocomprometidos.	i.m.	Curación más rápida y menor diseminación.
Varicela en inmunocomprometidos.	i.m.	menor formación de nuevas vesículas.

les, ha llevado a muchos investigadores a buscar actividad biológica en extractos de algas y de plantas como se ven el Cuadro 7.

2.3.1. Extractos de plantas inferiores.

En los últimos años, las algas que viven en aguas dulces así como los organismos marinos han sido considerados una fuente potencial de agentes farmacológicamente activos.

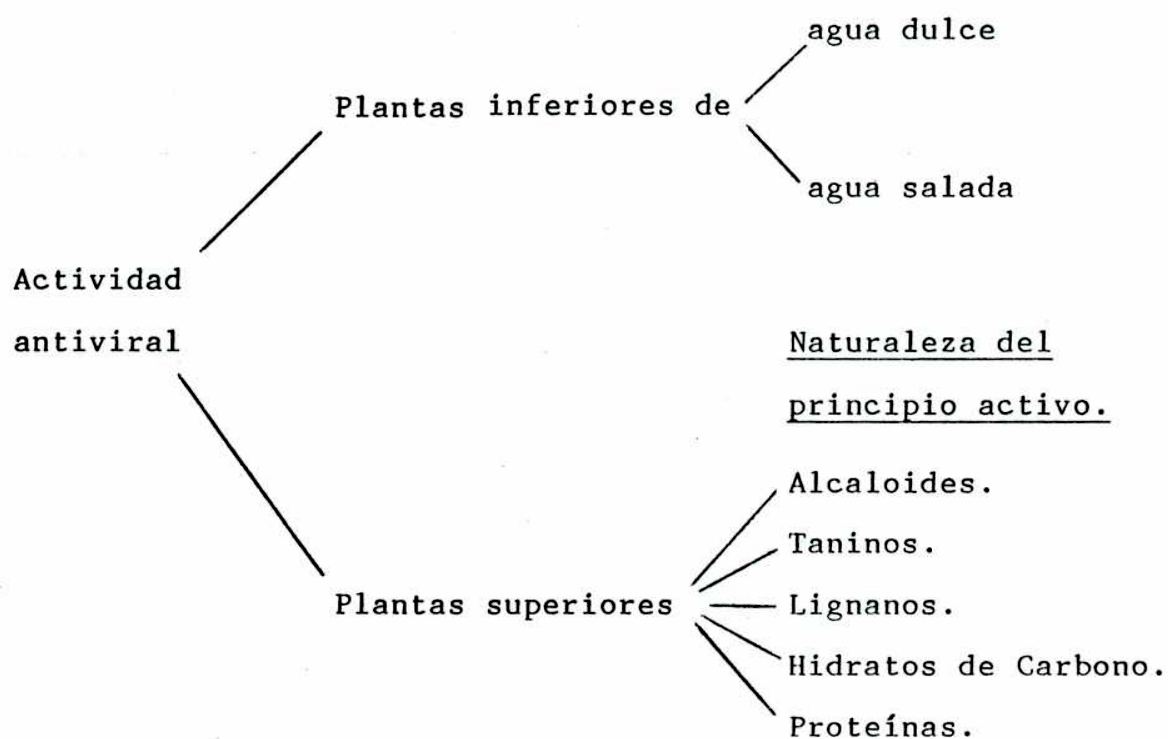
La posibilidad de que las algas verdes (de aguas dulces) posean sustancias antivirales no ha sido aún extensamente explorada.

En 1962, Dávýdova y col. (40) encontraron que fagos virulentos de Salmonella typhimurium, pierden su actividad bajo el efecto de Scenedesmus obliquus, mientras que no observan diferencias en presencia de Chlorella vulgaris. De esta manera es posible explicar la presencia simultánea de un considerable número de bacterias y algas en el agua.

En 1965 Sadovskaya y col. (108) demostraron que el desarrollo de cultivos de algas verdes (Chlorella vulgaris, Scenedesmus obliquus) inactiva a los fagos T_1 , T_4 y λ de Escherichia coli a concentraciones mayores que las naturales. La actividad biológica de estos fagos es completamente inhibida en un cultivo de S. obliquus en un tiempo de 15 días. Sin embargo estas algas no inhiben a los fagos cuando su concentración es cercana a la que existe ordinariamente en la naturaleza.

En 1972 Zhukova y col. (143) encuentran inactivación

Cuadro 7: Búsqueda de sustancias antivirales en productos naturales.



de RNA virus por extractos de cultivos de Chlorella vulgaris: Scenedesmus quadricauda (algas verdes): Oscillatoria splendida y Anabaena variabilis (cianofíceas) pero no dicen nada acerca del mecanismo de acción o naturaleza del principio activo.

Los primeros datos acerca de algas marinas macroscópicas con actividad antiviral se obtuvieron en 1958 cuando Gerber y col. (53) comprueban que extractos de Gelidium cartilagenium y Chondrus crispus protegen a huevos embrionados contra la infección con virus del Sarampión e Influenza B. Se ha estudiado la naturaleza de principio activo y se ha determinado que este es de naturaleza polisacáridica.

En 1965 Kathan (73) descubrió un inhibidor muy activo del virus de Influenza, obtenido a partir de extractos de algas marinas superiores, que tienen componentes protéicos e hidratos de carbono.

En 1974 Deig y col. (43) encontraron que la replicación de los virus Herpes simplex tipo I y II es inhibida en monocapas celulares pretratadas con extractos derivados de dos especies relacionadas del Orden Rhodophyta: Cryptosyphonia woodii y Farlowia mollis.

El principio activo ha sido caracterizado como un polisacárido de peso molecular 10.000. El mecanismo de acción no ha sido determinado pero se sugiere que el inhibidor podría bloquear el receptor celular requerido para la infección por el virus herpes.

En 1977, Ehresmann y col. (46) estudiaron 28 especies de algas marinas colectadas en las costas del norte de Cali-

fornia y encuentran que además de los extractos antes mencionados otros 8 extractos, todos pertenecientes a miembros del orden Rhodophyta, producen una inhibición similar de la infectividad de los herpes virus I y II. Además determinaron que extractos de Constantinea simplex interfieren con la infectividad del virus Coxsackie B5. Las sustancias activas presentes en estos extractos se cree que son polisacaridos de peso molecular mayor a 200.000. Estos autores consideran que los datos obtenidos son compatibles con la presencia de un compuesto estructural del alga, más que metabólico, y que el probable mecanismo de acción se deba a una inhibición de la adsorción del virus Herpes.

En 1978 Richards y col. (102) encontraron que extractos de dos especies de algas marinas Constantinea simplex y Farlowia mollis también recolectadas en las costas de California son activas contra Herpes simplex tipo I y II, Vaccinia y VSV, si se pretratan monocapas de células de embrión de ratón (son tratadas) antes de la infección. Estos extractos, no tienen actividad contra los virus de Encefalomiocarditis, Semliki Forest y Citomegalovirus murino. Los autores también determinaron que la administración profiláctica de estos extractos a ratones reduce la mortalidad cuando estos son inoculados con Herpes simplex tipo II por vía intraperitoneal, intracerebral o intranasal, mientras que los mismos no tienen efecto significativo cuando el tratamiento es iniciado después de la inoculación o en un sitio distinto al de la inoculación viral.

La actividad profiláctica pero no terapéutica de estas preparaciones limita seriamente su uso potencial en infecciones herpéticas humanas. En 1980 Carccamese y col. (31) encontraron que de más de 20 extractos de algas colectadas al este de Sicilia, algunos presentan actividad contra el virus del mosaico del tabaco.

La mayoría pertenece a las Feofitas entre los más activos se encuentran: Cystoseira crinita, Dictyota dichotoma var. intricata, Dilophus fasciola, Nereia filiformis y Taonia atomaria. Dentro de las rodofitas tenemos a Botryocladia botryoides y Laurencia paniculata y perteneciente a las clorofitas podemos citar a Caulerpa prolifera.

Las concentraciones de estos extractos lipídicos de algas usadas son las que normalmente se emplean para las sustancias antivirales purificadas. Esto sugiere que los extractos poseen una buena potencia del principio activo. En lo que respecta a la naturaleza del principio activo, los autores dicen que los extractos no contienen proteínas o hidratos de carbono y que se podría tratar de un metabolito lipofílico poco común.

En 1983 Anderson y col. (3) buscaron actividad biológica en 25 organismos marinos recolectados a lo largo de las costas Suecas. Los extractos orgánicos de los mismos se ensayaron para determinar actividad antiviral pero solamente los de Fucus serratus y Laminaria saccharina (ambas feoficeas) son activos contra el virus Herpes y no presentan toxicidad para cultivos de tejidos.

Estos resultados en conjunto parecen promisorios sin embargo, en este campo queda aún mucho por investigar ya que en la mayoría de los casos no se conoce la naturaleza del principio activo del extracto de alga y menos aún su mecanismo de acción antiviral.

2.3.2. Extractos de Plantas Superiores.

En las plantas se encuentran muchos compuestos diferentes que son los productos de su metabolismo y que son necesarios para la vida de las mismas.

Muchas plantas poseen caminos metabólicos específicos para producir moléculas pequeñas, tales como los alcaloides, que parecen tener más utilidad para el hombre que para la planta misma; mientras que otros sintetizan proteínas que no parecen tener una función vital en la planta que les dá origen.

Vamos a tratar de agrupar a las sustancias derivadas de plantas superiores con actividad antiviral según su posible composición química en los siguientes grupos: alcaloides, taninos, lignanos, polisacáridos y proteínas, aunque se han descrito muchos extractos derivados de plantas cuyas características no se conocen, algunos de los cuales se tratarán de incluir dentro de estos cinco grupos y otros serán mencionados sin hablar de su composición.

2.3.2.1. Alcaloides.

D.A. Van den Berghe y colaboradores, han preparado

extractos de 100 plantas superiores y evaluado su actividad antiviral contra algunos DNA y RNA virus, tales como: Semliki Forest; Coxackie; sarampión, polio; herpes y adenovirus.

Estos autores demuestran (133) que los extractos de la familia Amaryllidaceae son los que presentan una actividad antiviral más efectiva. Clivia miniata, Clivia cyrtanthiflora, Narcissus pseudonarcissus, Narcissus tazetta e Hymenocallis littoralis son las especies de esta familia activas contra los virus; Coxackie, Semliki Forest y sarampión; mientras que las especies del género Clivia resultaron ser muy efectivas para inhibir la replicación de los virus Polio y herpes y ninguno de los extractos ensayados resultó tener actividad para inhibir a adenovirus.

Posteriormente estos autores también determinaron que la sustancia biológicamente activa presente en las especies del género Clivia es un alcaloide al que denominan licorina (66).

Esta sustancia no tienen acción virucida ya que la inhibición de la replicación viral es concentración dependiente y se debe a un bloqueo en la síntesis de proteínas o de la adsorción viral (65).

Existen alrededor de 150 alcaloides aislados de plantas pertenecientes a esta familia, algunos de los cuales tienen actividades biológicas interesantes por ej.: algunos son anti tumorales y producen la inhibición de la síntesis de proteínas en células eucarióticas ya que impiden la formación de uniones

peptídicas (33), (71).

Extractos de Magnolia kobus y Narcissus tazetta que han surgido de un programa de estudio de plantas medicinales de la China, tienen marcada actividad contra el virus de la Co-riomeningitis Linfocítica (LCM) en ratones (50). Ensayos realizados in-vitro con estos extractos demuestran que éstos no son virucidas.

En el trabajo de Furusawa y col. (49) también se demuestra que otra planta superior Sambucus sieboldiana tiene actividad antiviral contra LCM y Columbia SK en ratones. Esta es la única planta entre las 250 especies japonesas y chinas estudiadas que tiene una actividad importante frente a estos dos virus, pero en el trabajo nada se menciona a cerca de la naturaleza del principio activo.

En 1976 Kelling y col. (75) estudiaron 28 extractos de plantas de los cuales sólo el extracto alcohólico de Narcissus tazetta (familia Amaryllidaceae) posee actividad antiviral contra el virus de la Rinotraqueitis bovina (IBR) en cultivo de tejido a la concentración no citotóxica. En este trabajo se realizan ensayos tendientes a demostrar que este extracto no es virucida y que es de amplio espectro ya que también inhibe al virus de la Rinoneumonitis equina perteneciente también a la familia Herpesviridae.

en 1976 Susan Tafur (129) y col. encontraron que extractos alcohólicos de hojas, raíces y tallos de Ophiorrhiza mungos (familia Rubiaceae) contienen un potente inhibidor

del virus Herpes tipo I. Estos extractos poseen dos compuestos activos de camptotecina y la 10-metoxicamptotecina, los que también han sido aislados en pequeñas cantidades de un árbol poco común de la China Camptotheca acuminata (familia Nyssaceae) por Wall y col. (138). La planta superior Mappia foetida (familia Olinaceae), también ha sido citada como rica en estas sustancias (2). Se sabe que la camptotecina es un potente agente antileucémico y antitumoral en animales de experimentación (138). Como antiviral inhibe la replicación del virus herpes (25), aunque el metoxi derivado resulta ser ocho veces más activo.

en 1960 Goulet y col. (57) demostraron que extractos de Calvatia gigantea y especies de Cattleya inhiben a distintas cepas del enterovirus ECHO en forma diferencial, en células de riñón de mono. En este trabajo se llega a la conclusión de que los extractos no tienen acción virucida, pero nada se dice sobre la naturaleza del principio activo.

2.3.2.2. Taninos.

Los extractos de Melissia officinalis (35) inhiben tanto DNA virus (Herpes simplex y Vaccinia) como a RNA virus (NDV y Semliki Forest) se ha sugerido que la actividad antiviral está en la fracción que tiene tanino o polifenoles tipo tanino que ejercen su acción en la superficie de la célula bloqueando la entrada o salida de ciertos virus y no produciendo efecto virucida sobre los mismos. Esto se contrapone con el mecanismo de acción propuesto para los taninos del té(60)

ó el ácido tánico con el virus Influenza A (34), los que como se sabe ejercen un efecto virucida sobre el mismo. En este último caso estos inhibidores pueden ser considerados como absolutos ya que su acción es independiente de la célula huésped.

En 1983 Suganda y col. (128) estudiaron los efectos inhibitorios de 96 extractos de plantas indígenas francesas, crudos y semipurificados sobre la multiplicación del virus Herpes tipo I y Polio tipo II en cultivos celulares. De los mismos sólo cuatro poseen actividad antiviral. Matricaria chamomilla e inodora (ambas de la familia Compositae) y Anthyllis vulneraria (familia Leguminosae) inhiben a ambos virus, mientras que Bryonia dioica (familia Cucurbitaceae) es activo sólo contra polio.

Las cuatro especies de plantas superiores mencionadas anteriormente poseen alcaloides y algunas de ellas taninos, pero en el trabajo no se aclara nada acerca del mecanismo de acción antiviral, así como tampoco si las sustancias encontradas son las responsables de la actividad inhibitoria.

2.3.2. 3. Lignanos.

En 1978 May y Willuhn (85) encontraron actividad antiviral contra Herpes simple tipo II, Influenza A y Vaccinia , en la planta superior Podophyllum peltatum. Estos autores suponen que lignanos glicosilados solubles en agua son los responsables del efecto notado, pero la naturaleza del compuesto activo recién la determinan fehacientemente Bedows

y Hatfield (26) en 1982. Estos últimos también encuentran que el efecto antiviral es debido a la ruptura de los microtúbulos celulares.

En 1981 Markkanen y col. (83), también encontraron que un lignano extraído y purificado de Juniperus commúmis tiene actividad contra Herpes simple tipo I.

Debido a su naturaleza altamente citotóxica, el potencial terapéutico de estos compuestos como antivirales está muy limitado.

2.3.2.4. Hidratos de carbono.

En 1974 Moraes y col. (89) encontraron que una sustancia, posiblemente un polisacárido de alto peso molecular, presente en hojas aparentemente sanas de Abutilon striatum inhibe la infección de Nicotiana glutinosa L con el virus del mosaico del tabaco (TMV), pero en el trabajo no se discute nada acerca de su mecanismo de acción antiviral.

Otro inhibidor de naturaleza polisacarídica ha sido aislado y purificado de la planta superior Brassica olearacea L (140). Esta sustancia tiene un PM de 20.000 y no es virucida. Aparentemente el polisacárido produce cambios en la superficie de la célula, que hacen que disminuya la adsorción viral, aunque no se observa un bloqueo de receptores.

Hasta el presente se han aislado pocos inhibidores virales semejantes a éstos de plantas superiores. En general se aislan de hongos como por ej: los obtenidos de Trichothecium rosaceum (23) y Phytophthora infestans (117).

2.3.2.5. Proteínas.

Se conocen muchas proteínas de plantas que dañan ribosomas eucaritóticos inhibiendo así la síntesis protéica. Algunas de ellas formadas por dos componentes, una cadena B capaz de unirse a las células y una cadena A que daña la subunidad mayor del ribosoma de 60 S. Este grupo incluye las toxinas ricino, abrino y modeccino (94), (52).

Algunas lectinas menos estudiadas también inhiben síntesis de proteínas de una manera similar pero no son tóxicas para animales o células (17).

Otro grupo de inhibidores de la síntesis de proteínas, no tóxicos y similares a la cadena A de las toxinas reciben el nombre de RIPs (ribosome-inactivating-proteins) y están ampliamente distribuídas en todo el reino vegetal. Se obtienen de semillas, raíces, hojas o de savia de plantas y se encuentran generalmente a una concentración muy alta. Por ej.: 2,300 mgr prot/100 gr de tejido de plantas (18). Su concentración varía de una planta a otra y entre los diferentes tejidos de la misma planta. Los extractos de semilla son generalmente más activos que los de otras partes de la planta.

Las RIPs no han sido encontradas nunca en otras especies que no fueran plantas. Reconocen e inactivan ribosomas extraños, aunque el mecanismo de reconocimiento e inactivación es aún desconocido. Estas RIPs constituyen tanto como el 10% de las proteínas extraíbles del tejido celular, pero su función biológica también es desconocida. Son fáciles de

aislar en grandes cantidades,, pero su uso potencial como agentes antivirales, antiparasitarios y anticelulares permanece oscuro.

Muchas plantas contienen aparentemente un sólo tipo de RIP, mientras que otras tienen varios. Por ej.: se han aislado dos o tres RIPs cromatográficamente distinguibles de fitolaca (16), clavel (124), trigo (104), cebada (37) y muchas otras especies de plantas. Estas "isoenzimas" de RIP son muy parecidas unas con otras, pero no se sabe aún su origen y su significado. Las RIPs de distintas fuentes generalmente no comparten determinantes antigénicos.

Las RIPs actúan sobre los ribosomas inhibiendo la elongación de la cadena polipeptídica (18), (68). El lugar de ataque de las RIPs es la subunidad 60 S del ribosoma (93) y la consecuencia de la inactivación es que la subunidad ya no une el factor de elongación EF-2 en forma efectiva y así la traslocación de la cadena cesa (18 , 69).

Todavía resulta difícil sacar conclusiones generalizadas a cerca de las familias que contienen las RIPs pero parece que las semillas de Amaranthaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Leguminosae, Phytolaccaceae y Solanaceae (22), (24), (58), (59), (100), (119), (131) y (142) muchas veces contienen elevadas concentraciones de RIPs. Estas proteínas son de bajo peso molecular, que oscila entre los 10.000 y 38.000 Daltons, tienen ciertas similitudes con el interferón aunque en general no son glicoproteínas.

La mayoría de estas RIPs tienen un amplio espectro antiviral, son relativamente estables al calor y son precipitables por altas concentraciones de sulfato de amonio, pero a diferencia del interferón animal por lo menos una de estas es sensible al ácido performico (47).

En los últimos años muchas RIPs han sido descubiertas y se ha visto que inhiben la replicación de una variedad de virus animales y de plantas (18). Esto ha llevado a la hipótesis de que las RIPs funcionan como agentes antivirales, protegiendo a las plantas de la infección con una gran variedad de virus..

Sin embargo esta hipótesis parece contradictoria debido a que las RIPs sólo inactivan ribosomas heterólogos de plantas (18), (68) o sea que ellas inhiben la transmisión de virus a especies distintas a aquellas en que se encuentran normalmente, entonces sucede justo lo contrario que con el interferón (70), (56).

La primera RIP descubierta y una de las más intensamente estudiadas es la proteína antiviral de Phytolacca americana (PAP). Posee un amplio espectro antiviral que incluye al virus del mosaico del tabaco (45), virus del mosaico del pepino (141), virus del mosaico de la haba (95), (141), Influenza (141), Polio (132), y Herpes (10), (130).

Se han aislado dos proteínas una de PM 30.000 y otra de PM 29.000 pero con diferente distribución peptídica detectada por hidrólisis tríptica y con propiedades inmunológicas diferentes (69).

Este inhibidor parece no tener efectos tóxicos sobre las células de animales y de plantas a diferencia de las fitotoxinas abriño y ricino que como se mencionó anteriormente tienen una actividad bioquímica semejante (69). En las células infectadas en cambio, el virus parece que de alguna manera facilita la entrada de estas RIPs, las que inactivan los ribosomas de la célula huésped y se produce así la inhibición de la replicación viral. Este mecanismo puede explicar la acción antiviral de PAP contra los RNA virus pero no los resultados obtenidos con Herpes simplex tipo I (HSV-1) en los que aparentemente se produce una inhibición de la síntesis del DNA viral (130), es posible sin embargo que se inhiba de una manera selectiva alguna proteína necesaria para la síntesis del DNA.

Otras RIPs con propiedades antivirales se encuentran presentes en un gran número de plantas además de fitolaca pero sólo unas pocas han sido purificadas y caracterizadas.

Uno de los inhibidores mejor caracterizado es el que se obtiene de las hojas del clavel, Dianthus caryophyllus, en realidad se han obtenido dos proteínas que son potentes inhibidores de la formación de lesiones por el virus del mosaico del tabaco en Nicotiana glutinosa L (100). En un estudio más reciente Stirpe y col. (124) han purificado dos proteínas de las hojas de Dianthus caryophyllus, la diantina 30 y 32 respectivamente (en base a sus PM). Las diantinas también son RIPs ya que inhiben síntesis de proteínas en un

sistema libre de células por daño de ribosomas y tienen poco efecto sobre células intactas y son semejantes a las purificadas anteriormente por Rageltli y Weintraub (100). Al igual que el inhibidor de Phytolacca (PAP) las diantinas no tienen efecto sobre la transmisión de virus a Dianthus y a otros miembros de las Caryophyllales.

El uso potencial de las diantinas en medicina es menos promisorio que el de PAP porque se ha visto que son citotóxicas para fibroblastos de pollo y que no son capaces de proteger a fibroblastos de embrión de pollo de la infección con el virus de Semliki Forest (47), (99), (100).

En los últimos años se han caracterizado varias RIPs semejantes a PAP. Las más importantes se encuentran en el Cuadro 8.

Las RIPs tienen la ventaja de que se pueden aislar fácilmente y en gran cantidad pero hasta el presente no se han aplicado para la terapia antiviral de organismos completos, aunque se ha demostrado que son potentes inhibidores de la multiplicación viral en cultivos de tejidos.

2.3.2.6. Sustancias que se inducen en las plantas por infección viral.

Por otra parte existen en las plantas sustancias antivirales que se producen cuando estas son infectadas con un virus.

En 1962 Sela y Applebaum (113) encontraron un factor antiviral en hojas de Nicotiana glutinosa L infectadas con

Cuadro 8: Proteínas semejantes a PAP.

Fuente	Actividad		Inhibición de la síntesis de prot.	PM	Cita
	Antiviral	Antiviral			
<u>Chenopodium amaranticolor</u>	sí	sí	no se determinó	29.000	119
<u>Dianthus caryophyllus</u>	sí	sí	sí	30.000	100
				32.000	124
<u>Gelonium multiflorum</u>	sí	sí	sí	30.000	123
					120
<u>Mormordica charantia</u>	sí	sí	sí	23.000	19
					120
<u>Triticum aestivum</u>	no se determinó	sí	sí	30.000	104

el virus del mosaico del tabaco (TMV), que no esta presente en las plantas sin infectar. Esto hace suponer que éste factor juega algún papel importante en el mecanismo de protección de los tejidos vegetales frente a la infección viral.

En 1963, Loebenstein y Ross (81) demostraron que la concentración de un factor antiviral extraíble (semejante al interferón) de las hojas de Datura stramonium L, es mucho mayor después de la infección con el virus del mosaico del tabaco (TMV).

En 1966 Sela y col. (114) encontraron que la savia de hojas de Nicotiana glutinosa L no infectadas tiene actividad antiviral, pero que una nueva sustancia se produce cuando las plantas son infectadas con TMV. Esta nueva sustancia que se forma es una nucleoproteína y difiere del interferón de pollo por su comportamiento frente a intercambiadores iónicos de celulosa.

En 1981 Awasthi (11) describió la presencia de una sustancia antiviral con propiedades inhibitorias en extractos acuosos de Cuscuta reflexa. Las propiedades biofísicas y químicas indican que el inhibidor es de naturaleza protéica.

Al igual que los inhibidores virales presentes en otras plantas como el pimiento (86), (9) y Boerhaavia diffusa (134), (135) este inhbidor es no dializable, de naturaleza protéica e induce en la planta resistencia sistémica (resistencia en sitios no tratados).

La inducción de esta resistencia puede ser revertida

por la aplicación de Actinomicina D hasta 6 horas después del tratamiento con el inhibidor.

Este tipo de respuesta sistémica (resistencia sistémica adquirida) puede ser inducida también en plantas por virus que producen lesiones locales (106), (79), (29), (105), ácido poliacrílico (55) , (72), ácido acetilsalicílico(139) y un gran número de agentes virales y no virales (80).

Actualmente se cree que las plantas superiores pueden producir sustancias tipo interferón después de la infección viral, pero desgraciadamente mientras que las investigaciones con los interferones humanos y animales han sido muy intensivas, en las plantas estas han sido mucho menores. Esto es lamentable ya que tales estudios podrían contribuir a elaborar una teoría generalizada a cerca de la fisiología de la resistencia a la infección viral y conducir a un posible uso terapéutico de los interferones de plantas contra enfermedades de animales y plantas.

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

1. MEDIOS, SOLUCIONES Y REACTIVOS.

1.1. MEDIOS.

1.1.1. Medio de crecimiento celular: MC.

Medio esencial mínimo de Eagle (MEM) en solución salina balanceada de Earle, con glutamina (Medio sintético Gibco). Suplementado con 5% de suero bovino Gibco inactivado a 56°C 30 minutos y 50 µg/ml de gentamicina. pH 7 - 7,2.

1.1.2. Medio de mantenimiento celular: MM.

Medio basal de Eagle (MBE) en solución salina balanceada de Earle, con glutamina (Medio sintético Gibco). Suplementado con 3% de suero bovino inactivado a 56°C 30 minutos y 50 µg/ml de gentamicina. pH 7,6 - 7,8.

1.1.3. Medio para marcación de proteínas celulares o virales.

Medio basal de Eagle (MBE) en solución salina balanceada de Earle, sin metionina y/o leucina (Medio sintético Gibco). Suplementado con 3% de suero bovino Gibco inactivado a 56°C 30 minutos y 50 µg/ml de gentamicina. pH 7,2 - 7,4.

1.1.4. Medio de plaqueo: MP.

a. MEM 2X.

Medio esencial mínimo de Eagle de doble concentración, en solución salina balanceada de Earle con glutamina (Medio sintético Gibco).

Suplementado con 4% de suero fetal bovino Gibco

inactivado a 56°C 30 minutos y 100 µg/ml de gentamicina.

b. Agar Doble al 2% en agua bidestilada.

En el momento de ser usado se mezclan volúmenes iguales de a. y b. pH 7,4.

1.2. SOLUCIONES.

1.2.1. Solución balanceada de fosfatos: PBS para 1000 ml).

Cl Na	8	g.
Cl K	0,2	g.
PO ₄ H ₂ K	0,2	g.
PO ₄ HNa ₂ . 2 H ₂ O	1,44	g.

1.2.2. "Buffer" para radioinmunoprecipitación: RIPA.

Tris-ClH	0,01 M	pH 7,4
Cl Na	0,15 M	
SDS	0,1%	
Tripton X-100	1%	
PMSF	1	mM
Dodecil sulfato de Na	1%	

1.2.3. "Buffer" de muestra para electroforesis: PAGE 1X.

Tris-ClH	0,0625 M	pH 6,8.
SDS	5%	
Glicerol	10%	
β-mercapto etanol	2%	
Azul de bromofenol	0,005%	

1.2.4. "Buffer" de corrida para electroforesis.

Tris-ClH 0,05M pH 8,3

SDS 0,1%

Glicina 0,005M

1.2.5. Gel de resolución.

Acrilamida-bisacrilamida (40:0,8) 12%.

Tris-ClH 0,375M pH 8,8

SDS 0,1%

TEMED

$S_2O_8 (NH_4)_2$

1.2.6. Gel de separación.

Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8) 3,8%

Tris-ClH 0,125M pH 6,8

SDS 0,1%

TEMED

$S_2O_8 (NH_4)_2$

1.2.7. Colorante.

Azul brillante de Coomassie R.250 al 0,25% en metanol: agua: ácido acético glacial (50:50:10).

1.2.8. Decolorante.

Metanol: agua: ácido acético glacial (50:80:70).

1.2.9. Solución centelleadora.

Triton X-100 500 mg.

PPO 8,25 g.

dimetil-POPOP 150 mg.

Tolueno 1.000 ml.

1.3. REACTIVOS.

(³H) Uridina New England Nuclear, actividad específica 40,8 Ci/mmol.

³⁵S-metionina New England Nuclear 1.030 Ci/mmol.

³H-leucina New England Nuclear 111,1 Ci/mmol.

Tripsina (Trypsin 1:250) Difco.

Actinomicina D Merck Sharp & Dohme.

Sephadex G-25 y G-100 Pharmacia Fine Chemicals.

2. VIRUS.

2.1. VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR (VSV).

Cepa Indiana, el stock se preparó en células Vero, cosechando sobrenadantes y células a las 24 hs. p.i. El título en células Vero fué del orden de 10^7 UFP/ml.

2.2. VIRUS SINDBIS.

Cepa proveniente del National Institute of Health, Estados Unidos, el stock se preparó amplificando esta cepa en células BHK-21 y cosechando el sobrenadante a las 24 hs p.i. El título en células BHK-21 fué del orden de 10^8 UFP/ml.

2.3. VIRUS AFTOSO.

Cepa O₁ Caseros, el stock se preparó en células BHK-21 cosechando sobrenadante y células a las 24 hs p.i. El título en células BHK-21 fué del orden de 10^6 UFP/ml.

2.4. VIRUS DE POLIOMIELITIS.

Se usó la cepa Sabin (vacuna) que contenía las copas de

Polio tipo I, II y III, después de ser multiplicadas 2 veces por células Hela y una vez por Vero. El título en células Vero del Stock usado fué del orden de 10^6 UFP/ml.

2.5. VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE(NDV).

Se trabajó con un stock de la cepa LA SOTA preparado en huevos embrionados, cosechando el líquido alantoideo a los 5 días p.i. El título del stock fué de 100 UHA/ml.

2.6. VIRUS HERPES SIMPLE TIPO I.

Se utilizó la cepa Mac Intyre prototipo obtenida del Instituto Carlos G. Malbrán. Stock preparado en células Vero a partir de sobrenadante y células, teniendo un título en Vero del orden de 10^6 UFP/ml.

2.7. VIRUS JUNIN.

Se trabajó con la cepa de virus Junín atenuada denominada XJCl₃ (61) y mantenida en el laboratorio por pasajes en cerebro de ratón lactante. El título de los stocks fué del orden de 10^6 UFP/ml en células Vero.

2.8. VIRUS TACARIBE.

La cepa de virus empleada fué de TRLV 11573, propagada como en el caso anterior en cerebro de ratón lactante y con títulos del orden de 10^6 UFP/ml en células Vero.

2.9. VIRUS PINCHINDE.

Se empleó la cepa An-3739 crecida en cerebro de ratón lactante. El título del stock fué del orden de 10^7 UFP/ml en células Vero.

3. CULTIVOS CELULARES.

3.1. CELULAS VERO.

Se utilizaron células Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), cultivadas en monocapa. Las líneas se mantuvieron por repiques cada 3 ó 4 días con MEM (Medio Esencial Mínimo con sales de Earle) suplementado con 10% de suero bovino inactivado a 56°C 30 min. y 50 µg/ml de gentamicina. Se las empleó entre los pasajes 180 - 240.

El medio de mantenimiento empleado fué Eagle, adicionada de 3% de suero de ternera inactivado y 50 µg/ml de gentamicina.

3.2. CELULAS RK₁₃.

La línea continua RK₁₃ de riñón de conejo se mantuvo con medio MEM suplementado de 8% de suero de ternera y 50 µg/ml de gentamicina. Se utilizó entre los pasajes 130 y 170.

3.3. CELULAS BHK-21 CLON 13.

La línea continua de riñón de hamster bebé fué mantenida por repiques cada 3 ó 4 días con MEM suplementado con 10% de suero bovino inactivado y 50 µg/ml de gentamicina. Se la utilizó entre los pasajes 26 y 56.

El medio de mantenimiento empleado fué MEM, adicionado de 3% de suero de ternera inactivado y 50 µg/ml de gentamicina.

4. RATONES.

Se usó la cepa OF₁ (Iffa-credo, Lyon, Francia) para realizar ensayos de toxicidad.

5. HUEVOS EMBRIONADOS.

Se utilizaron huevos embrionados de gallina de 9 - 12 días de desarrollo, para el cultivo del virus NDV en cavidad alantoidea.

6. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.

6.1. EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS DE RAICES.

6.1.1. Material vegetal: Se prepararon extractos hidroalcohólicos de raíces de las siguientes plantas: Baccharis crispa, Baccharis notoserigila, Pluchea sagittalis, Pterocaulom virgatum, Achyrocline flaccida, Conyza bonariensis, Phyllanthus selowianus y Melia azedarach; las plantas fueron recolectadas de distintas regiones de la República Argentina y del Paraguay y se depositó una muestra de cada especie en el herbario del Museo de Botánica de la Universidad de Buenos Aires.

6.1.2. Preparación de los extractos: Los extractos hidroalcohólicos fueron llevados a sequedad, suspendidos o solubilizados en agua destilada para llegar a una concentración de 50 mg/ml estas soluciones fueron fraccionadas en alícuotas de 1 ml que se colocaron en tubos de ensayo. Posteriormente se llevaron a 10 ml con

agua destilada, la concentración final del extracto fué de 5 mg/ml. A estas soluciones se les registró el pH, se filtraron por Millipore 0,22 μ y se conservaron a -20°C en caso de no ser usados in mediatamente. Estos extractos fueron preparados en la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

6.2. EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS DE PARTE AEREA DE MELIA AZEDARACH L.

- 6.2.1. Material vegetal: Se colectaron las partes aéreas (hojas y ramas) de árboles de paraíso de la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores (zonas de Palermo y San Isidro) durante el mes de Noviembre de 1982, las mismas fueron clasificadas como Melia azedarach L en la Cátedra de Botánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, donde se ha guardado y registrado un espécimen de herbario.
- 6.2.2. Extracción del principio activo: Hojas, ramas y tallos fueron lavados; exhaustivamente, secados a 37°C y pulverizados por medio de un molino de cuchillas rotativas. Sesenta gramos de este material vegetal seco se maceraron en etanol 50% durante 96 horas. El extracto alcohólico se filtró y el filtrado se centrifugó a 100.000 xg en un rotor SW 28 (Beckman) durante 2 horas. El sedimento se eliminó y el sobrenadante fué llevado

a sequedad a 40°C en un evaporador rotativo y disuelto en agua destilada a una concentración de 5 mg/ml constituyendo el denominado extracto crudo.

La obtención del extracto semipurificado se efectuó a partir del sobrenadante (sin secar) el que se precipitó por el agregado gota a gota de dos volúmenes de alcohol absoluto y dejándolo una noche a -20°C. El precipitado formado se separó por centrifugación a 10.000 rpm en un rotor JA 14 (Beckman) durante 1 hora, posteriormente fué llevado a sequedad y se resuspendió en buffer fosfato 20 mM hasta llegar a una concentración de 100 mg/ml. La solución se llevó a pH 7, se centrifugó 50 minutos para clasificar, el sobrenadante obtenido se filtró por Millipore 0,22 u y se congeló a -20°C hasta su uso. El extracto semipurificado se lo denominó M.A. s.p.

6.2.3. Precipitación con sulfato de amonio: 3 ml de MAsp se precipitaron con sulfato de amonio sólido en forma fraccionada (de 0-30%, 30-60% y 60-100%). Las precipitaciones se hicieron en frío agregando el sulfato de amonio en forma lenta y en agitación continua. Luego se dejó 20 minutos con agitación y se centrifugó a 10.000 rpm en rotor JA 20 (Beckman). Los precipitados obtenidos se resuspendieron en 1 ml de buffer fosfato 20 mM y se dializaron contra el mismo buffer durante 48 horas con dos cambios de medio. Luego de la diáli-

sis cada una de las muestras se llevó a 10 ml con MM de manera que todas sufrieran una dilución 1:10 a partir de su volúmen original.

- 6.2.4. Filtrado por columna de Sephadex G-25. 2 ml de MAsp se sembraron en una columna de Sephadex G-25 equilibrada con solución reguladora de fosfato 20 mM. La calibración de la columna se realizó con azul dextrano y se determinó el volúmen de exclusión. Como el extracto activo es coloreado (verde parduzco), se colectaron las fracciones coloreadas correspondientes al volúmen de exclusión, las que fueron precipitadas con dos volúmenes de alcohol absoluto. El precipitado obtenido se llevó a sequedad y fué disuelto en medio de cultivo (MM) hasta obtener una concentración de 5 mgr/ml.

6.3. EXTRACTOS ACUOSOS DE MATERIAL FRESCO.

- 6.3.1. Material vegetal: Se utilizaron hojas verdes de Melia azedarach L, Trichilia glabra L y Cedrela tubiflora Bert. Estas plantas fueron clasificadas en la Cátedra de Botánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA donde se ha guardado y registrado un espécimen de herbario de cada una. El material vegetal, recolectado de árboles de calles y parques de la ciudad de Buenos Aires, fue lavado con agua destilada y congelado a -20°C hasta su uso.

6.3.2. Preparación de los extractos: Se utilizó la técnica de extracción y preparación desarrollada en nuestro laboratorio por la Lic. Graciela M. Andrei (5). Los extractos crudos fueron obtenidos macerando hojas verdes con "buffer" fosfato de potasio 10 mM, pH 7, conteniendo 0,35 M de ClK (1 g de material/ml de buffer) a 4°C los que filtraron por una gasa doble de algodón. todas las operaciones subsiguientes fueron realizadas a 4°C. El extracto crudo verde oscuro obtenido fué centrifugado a 10.000 g durante 1 hora y el sobrenadante fué dializado contra buffer fosfato durante una noche. La fracción no dializable que conservó el 100% de la actividad se denominó So. Posteriormente el So se precipitó con sulfato de amonio entre 30-70% de saturación (S1). El precipitado se resuspendió en "buffer" y posteriormente se dializó contra el mismo "buffer". En este paso el principio activo se concentra 10 veces. El S1 se cromatografió en una columna de Sephadex G-100 resultado incluido el principio activo, eluyendo toda la actividad en 3 fracciones (F11, 12, 13). Estos datos coincidieron con experimentos previos realizados por nosotros en nuestro laboratorio.

Esta purificación parcial del principio activo se realizó con el extracto de Melia azedarach L, con los extractos de Cedrela tubiflora y Trichilia glabra se utilizó el So en todas las determinaciones a la concentra

ción no citotóxica.

6.4. EXTRACTO DEL ALGA COELASTRUM PROBOSCIDEUM VAR. DILATAIUM.

Cultivos axénicos de algas fueron obtenidos en los medios de macronutrientes de Detmer y el de Arnon's (A4) (1), con la adición de 10% de glucosa. Los cultivos fueron crecidos a temperatura ambiente (20°C) bajo iluminación constante de 5 lámparas fluorescentes de 40 W (radiación de 50 microeinstein m^2/seg) y agitación mecánica a 120 ciclos/min. El alga fué crecida, después de la inoculación, durante 36 días más; se tomaron muestras a los 5, 14 y 36 días. Se determinó el peso seco con membranas de filtro Sartorius y la densidad óptica con densitómetro óptico. Los sobrenadantes fueron liofilizados después después de medir el pH. Las características de los extractos obtenidos se encuentran en el cuadro 9. Los extractos fueron preparados en la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

7. PREPARACION DE STOCKS DE LOS VIRUS.

7.1. JUNIN, TACARIBE Y PICHINDE.

Los stocks de los distintos virus se prepararon en cerebro de ratón lactante para lo cual ratones albinos suizos de 24 a 48 horas, se inocularon intracerebralmente con 1×10^3 DL_{50} para ratón de virus Junín ó Tacaribe ó

Cuadro 8: Extractos del alga Coelastrum proboscideum var. dilatatum obtenidos en distintas condiciones.

Días de cultivo	Cultivo (ml)	Liofilizado Vol. inicial (ml)	pH filtrado	Peso seco equivalente mg/ml	D.O. liofilizado concentrado (ml)	pH del extracto liofilizado
5 (1 DG)	1017	450	7,8	0,108	0,03 27,3	6,0
14 (2 DG)	950	150	8,4	0,209	0,25 10	6,5
36 (3 DG)	890	150	9,6	1,243	0,37 12	7,0

Pichindé. Los animales se sacrificaron al séptimo día después de la inoculación, cosechándose los cerebros. Luego se preparó un homogeneizado con 10% de cerebro de ratón en solución buffer fosfato suplementado con 10% de suero de ternera inactivado y antibióticos. El homogeneizado se centrifugó a 12.500 g durante 1 hora utilizándose el sobrenadante como fuente de virus. Los homogeneizados así obtenidos se fraccionaron y congelaron a -70°C , determinándose su infectividad por el método de unidades formadoras de placa bajo agar.

7.2. VSV, SINDBIS, AFTOSA, POLIO, HERPES Y NDV.

Los stocks de los distintos virus se prepararon tal como se detalló para cada caso en la Sección 2 de Materiales y Métodos.

8. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.

8.1. a) SOBRE MONOCAPA PREFORMADA.

Sobre una monocapa de células de 24 horas de sembrada se colocó medio basal de Eagle conteniendo 2% de suero de ternera, 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina y distintas diluciones del extracto en estudio. El tiempo de contacto varió entre 24, 48 y 72 horas.

Los cultivos se observaron al microscopio por alteraciones morfológicas o desprendimiento celular.

La citotoxicidad se clasificó como:

++++: desprendimiento total del tejido.

++ : desprendimiento parcial del tejido.

- : sin efecto citotóxico.

Simultáneamente con los cultivos tratados se observaron cultivos controles conteniendo sólo medio de cultivo.

En algunos casos se efectuaron recuentos del número de células, utilizando la cámara cuenta glóbulos de Newbauer.

8.2. b) EFFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA FORMACION DE LA MONO-CAPA CELULAR.

En algunos experimentos las células fueron tripsinadas y sembradas en tubos resuspendidas en medio de crecimiento MEM (Medio Esencial Mínimo con sales de Earle) suplementado con 10% de suero bovino inactivado a 56°C 30 min y 50 µg/ml de gentamicina, conteniendo distintas diluciones del extracto en estudio. Se observó entonces si existían diferencias en la adhesión de las células al vidrio como así también si su velocidad de crecimiento era afectada.

9. DETERMINACION DE LA INFECTIVIDAD.

La infectividad de los distintos stocks de virus utilizados se determinó por observación del efecto citopático producido en células Vero, RK₁₃ o BHK-21 según el virus, ó utilizando la técnica de formación de placas bajo agar en células Vero, RK₁₃ ó BHK-21.

Para el virus NDV (Newcastle disease virus) se utilizó la técnica de hemaglutinación.

9.1. a) TITULACION POR OBSERVACION DE LA ACCION CITOPATOGENICA (ACP).

En todos los casos se usaron 4 tubos por dilución los que fueron inoculados con 0,2 ml de diluciones decimales seriadas de virus en monocapas de células crecidas en tubos de ensayo a las 24-48 horas después de sembradas. El inóculo se dejó adsorber 1 hora a 37°C, al cabo de ese tiempo se descartaron los inóculos y se agregó a cada tubo 1 ml de medio de mantenimiento que se renovó cada 3 ó 4 días para los virus Junín, Tacaribe y Pichindé. Los cultivos se observaron diariamente al microscopio óptico durante 10 días para los virus antes mencionado y 24 a 48 horas para VSV, Polio, Aftosa, Sindbis o Herpes. En todos los casos se registró la evolución e intensidad de la ACP. La dosis infectante 50% para cultivo de tejidos (DI CT 50) se calculó de acuerdo al método de Reed y Muench (10¹).

La ACP se tabuló arbitrariamente de +1 a +4, de acuerdo al siguiente criterio general ya que cada virus origina acciones citopáticas diferentes.

Grado 1+: Aparición de focos de células redondeadas y oscuras en la monocapa. Pocas células en el sobrenadante.

Grado 2+: Los focos involucran a todo el tejido celular con gran desprendimiento de células.

Grado 3+: Todo el tejido está formado por células redondeadas y se observan grandes áreas de lisis. Muchas células en el sobrenadante.

Grado 4+: Quedan pocas células adheridas a la superficie del vidrio. En el caso de los virus lentos (Tacaribe, Junín) estas células sobrevivientes son las que pueden regenerar la monocapa dando origen a líneas persistentemente infectadas.

9.2. b) TITULACION POR EL METODO DE FORMACION DE PLACAS BAJO AGAR (UFP).

Se utilizó el método de Damonte y Coto (39). Monocapas de células Vero, RK₁₃ ó BHK-21 se infectaron al segundo día de sembradas con 0,2 ml de la dilución adecuada de la muestra a titular. Se dejó adsorber el inóculo durante 1 hora a 37°C con agitación periódica. Luego de la adsorción se retiró el inóculo, se lavó la monocapa con PBS y se cubrió con medio semisólido nutritivo. Las botellas se incubaron en forma invertida durante 48, 72 horas para los virus rápidos y 6 a 7 días para los lentos, a 37°C en oscuridad. Al cabo de dicho tiempo, las células se fijaron con formol 10% durante 30 minutos, se extrajo el agar y las placas se revelaron con cristal violeta 1/1000 durante 15 minutos. Se utilizaron dos botellas por dilución y los títulos se calcularon según la fórmula:

$$\text{Título (UFP/ml)} = \frac{n}{v \times d}$$

Donde: n = número promedio de placas.

v = volúmen del inóculo.

d = dilución.

9.3. c) TITULACION POR HEMAGLUTINACION.

Se inocularon 0,05 ml de diluciones seriadas al medio del virus NDV en una microplaca de 96 cavidades con fondo en U. Simultaneamente se realizó un control con 0,05 ml de PBS. Se agregó a cada dilución y al control 0,05 ml de una suspensión de glóbulos rojos de pollo al 0,5%. Se agitó y se dejó a temperatura ambiente de 30 a 45 min., hasta que en el control los glóbulos rojos hayan sedimentado formando un botón.

La mayor dilución de virus que produjo aglutinación, se consideró que contenía una unidad hemoaglutinante. El título se expresó como la inversa de esta dilución por ml.

10. METODOS DE DETECCION DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL.

10.1. ACCION ANTIVIRAL IN-VITRO.

Distintas concentraciones del extracto (no citotóxicas) se pusieron en contacto con un determinado número de partículas virales a 4°C por 24 horas juntamente con un control sin extracto. La cantidad de virus remanente se determinó por el método de plaqueo expresando los títulos en UFP/ml.

10.2. ACCION ANTIVIRAL SOBRE LA MULTIPLICACION.

Se siguió el mismo esquema para todos los virus variando

los tiempos de contacto según el virus en estudio (24 horas para los rápidos: VSV, Polio, Aftosa, Sindbis y Herpes) y 48 ó 72 horas para los lentos).

Después de infectar los cultivos a una multiplicidad aproximada de 1 el inóculo se dejó absorber por 1 hora a 37°C y luego se incubaron los cultivos infectados con y sin extracto. Al tiempo indicado según el virus se midió el rendimiento viral por plaqueo de los sobrenadantes en otras monocapas.

Las placas se revelaron a los 3 días p.i. para los virus rápidos y a los 7 días p.i. para los Arenavirus.

11. CLONADO DEL VIRUS SINDBIS EN CELULAS BHK-21.

Se infectaron monocapas de células BHK-21 de 48 horas con 50 UFP de virus Sindbis en botellas de 60 cm³ de capacidad. El inóculo se dejó adsorber durante 1 hora a 37°C y luego se volcó, se lavó la monocapa celular con PBS y luego se cubrió con una mezcla de MEM 2 x con 4% de suero fetal bovino inactivado y agar al 2%. Se incubaron las células durante 24 horas a 37°C. A las 24 horas p.i. se agregó una mezcla de agar al 1% y rojo neutro 1/1000. El colorante se dejó difundir 24 horas a 37°C y a las 48 horas p.i. se picaron sólo las placas nítidas y aisladas. El virus cosechado se amplificó en células BHK-21 haciendolo crecer durante 24 horas, este procedimiento se repitió 3 veces.

Se obtuvieron 2 clones cuyos títulos fueron los siguientes:

Clon Nº 1 = $2,65 \times 10^8$ UFP/ml.

Clon Nº 2 = $2,25 \times 10^8$ UFP/ml.

12. DETERMINACION DE CENTROS INFECCIOSOS.

Se utilizaron monocapas de células BHK-21 crecidas en frascos de 60 cm^3 . Estas fueron pretratadas 2 horas con dil 1/5 de la mezcla F11, 12, 13 del extracto de Melia azedarach L (sección 6.3.2.) ó con medio de mantenimiento adicionado de 2% de suero de ternera inactivado y antibióticos (serie control). Las células se lavaron 2 veces con PBS y se infectaron con el Clon-1 del virus Sindbis m.o.i.= 1. El virus se dejó adsorber 30 minutos a 4°C , se lavó con PBS para eliminar el virus no adsorbido y se cubrió con medio de mantenimiento adicionado de 2% de suero de ternera y antibióticos. Luego se incubó 1 hora a 37°C , se volcó el medio y las monocapas celulares se tripsinaron, se resuspendieron en PBS y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces a fin de eliminar toda la tripsina. Finalmente las células se resuspendieron en medio nutritivo y se contaron las células viables en cámara de Newbauer. Se infectaron monocapas de células BHK-21 con 0,2 ml de diluciones decimales de dicha suspensión celular. Se incubaron 2 horas a 37°C y luego se agregó cuidadosamente medio semisólido nutritivo.

A las 72 horas se revelaron los cultivos realizados por

duplicado y se contaron las placas como en una titulación habitual.

Se determinó el número de células formadoras de placas basándose en: el hecho de que cada placa era producida por una célula infectada productora de virus. El porcentaje de centros infecciosos se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ CI} = \frac{\bar{n}}{N} \times 100$$

Donde \bar{n} = número promedio de placas.

N = número total de células.

13. OBTENCION DE INMUNOSUERO ANTI-SINDBIS.

Se inocularon 2 conejos machos en la vena de la oreja, administrándoles 4 dosis de 1 ml cada una para ello se utilizó el Clon-1 de virus Sindbis de título 8×10^8 UFP/ml. Las dosis se suministraron con 7 días de intervalo. Los animales se sangraron por punción cardíaca a los 7 días de la última inoculación. La sangre obtenida se dejó coagular 1 hora a 37°C y luego se colocó a 4°C durante 24 horas para permitir la retracción del coágulo. Se centrifugó durante 20 minutos a 3.000 rpm. El suero se fraccionó en alícuotas de 1 ml y se conservó a -20°C.

13.1. TITULACION DEL INMUNOSUERO POR ENSAYO DE NEUTRALIZACION.

El suero anti-Sindbis obtenido se inactivó 30 minutos a 56°C para decomplementarlo y se realizaron diluciones

seriadas al medio en medio de mantenimiento. Se mezclaron volúmenes iguales de las diluciones del inmunosuero con una suspensión de virus Sindbis (Clon-1) que contenía 100 UFP. Estas mezclas se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Simultáneamente, se incubaron muestras controles de 100 UFP de Clon-1 con suero normal de conejo. Se inocularon monocapas de células BHK-21 con 0,2 ml de las muestras y de los controles. Se utilizaron 2 botellas por dilución y la infectividad residual se tituló por el método de UFP. El título del inmunosuero se calculó como la inversa de la mayor dilución de suero con capacidad de neutralizar el 80% de las placas del control. El título del suero obtenido fué:

Suero anti-Sindbis: 16.000.

14. ENSAYO DE PENETRACION DEL VIRUS SINDBIS EN CELULAS BHK-21.

Los cultivos celulares fueron preincubados con MM (medio de mantenimiento adicionado de 2% de suero bovino inactivado y 50 µg/ml de gentamicina) o con MA (MM adicionado de dil. 1/5 de la mezcla F11, 12, 13 del extracto de Melia azedarach L) durante 2 horas a 37°C, las monocapas fueron después lavadas, (se grafico el logaritmos del nº de centros infecciosos no neutralizantes en función del tiempo) e infectadas con virus Sindbis a una m.i. = 1. El virus se dejó adsorber durante 30 min a 4°C y los cultivos fueron luego lavados nuevamente con PBS y cubiertos con MM e

incubados a 37°C. El número de centros infecciosos ya no neutralizables por antisuero anti-Sindbis fué determinado por el agregado de antisuero anti-Sindbis de conejo en una dilución final de 1/10 a intervalos de 15 minutos. La incubación se continuó por 30 minutos más a 37°C. Luego se decantó el medio y las células fueron tripsinadas y ensayadas por centros infecciosos.

15. ENSAYO DE INCORPORACION DE (³H)-URIDINA EN EL RNA DE MONOCAPAS DE CELULAS BHK-21 CRECIDAS EN VIALES.

El método usado correspondió al descripto por Ball y colab. (15) adaptado al cultivo de células BHK-21 crecidas en monocapas desarrollado por Mersich S. (87).

En cada vial de vidrio del contador de centelleo líquido (87) se sembraron entre 1 a $2,5 \times 10^5$ células, las que se contaron después de 24 horas de incubación previa tripsinización, según se describió en (87) para obtener el verdadero nº de células al comenzar el experimento en algunos de los viales. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado a ese mismo tiempo de el resto de los cultivos se infectaron falsamente con MEM sin suero y después de la hora de adsorción, se marcaron con ³H-Uridina diluída de tal modo de agregar 1 uCi por vial. Se marcó por 30 min. 4 horas después del cambio de medio. Una vez finalizado el período de marcación se agregaron 10 ml de solución isotónica fría en cada vial y 10 ml de ácido per

clórico (PCA) 1,5% v/v para fijar las células. Se lavó luego dos veces con el mismo ácido y una vez con alcohol. El vial se dejó secar antes de agregar 1 ml de ácido perclórico 5% v/v en cuya presencia se calentó 3 horas a 80°C. Una vez frío se agregaron 10 ml de la solución centelleadora y se contó las radiactividades incorporadas en un contador de centelleo Packard FRIAS 240 CL/D.

15.1. ENSAYO DE INCORPORACION DE ^3H -URIDINA EN EL RNA DE CELULAS BHK-21 EN AUSENCIA Y EN PRESENCIA DEL EXTRACCION DE MELIA AZEDARACH L (M.a.).

Se sembraron viales del contador de centelleo líquido con células BHK-21, como se describió en 15.a las 20 horas de incubación a 37°C se les cambió el medio por MEM sin suero o MEM sin suero adicionado de M.A. dil. 1:20. A distintos tiempos post tratamiento, la incorporación fue por pulsos, se agregó 1 uCi de ^3H -Uridina por vial se les dió pulsos de 30 minutos y se continuó como en el caso anterior.

15.2. ENSAYO DE INCORPORACION DE ^3H -URIDINA EN EL RNA VIRAL A DISTINTOS TIEMPOS P.I. EN EL SISTEMA VIRUS SINDBIS-CELULAS BHK-21.

Un promedio de 8×10^4 células BHK crecidas como monocapas en viales de 5 ml fueron tratadas con MM ó MA durante 2 horas y luego infectadas con el Clon-1 del virus Sindbis con una m.o.i. de 10. Después de 1 h. de adsorción, el virus fué removido, las monocapas celulares

fueron lavadas con PBS y se agregó medio sin suero. A las 1, 2, 5 y 7 horas post-adsorción se agregó Actinomicina D a una concentración de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y las células fueron incubadas a 37°C por 60 minutos más. El medio fué luego reemplazado por 0,5 ml de medio conteniendo 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de Actinomicina D y 10 $\mu\text{Ci/ml}$ (^3H)-Uridina. Dos horas más tarde el medio fué aspirado y se agregaron a cada vial 4 ml de PBS frío. Después de 30 minutos a 4°C se volcó el PBS y se lo reemplazó por 3 ml de ácido perclórico PCA 1,5% v/v frío y se dejó a 4°C por otros 15 minutos. Las monocapas se lavaron luego dos veces con 3 ml de ácido perclórico 1,5% y luego se agregó 3 ml de etanol, dejandolo actuar por 15 minutos. El líquido del vial se volcó y se secó invertido. Finalmente las células fueron hidrolizadas con 0,5 ml de ácido perclórico 5% v/v durante 3 horas. Se dejó enfriar y se agregó a cada vial 3 ml de la mezcla centelladora. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y el valor promedio se expresó en cpm como la cantidad de RNA sintetizado por 8×10^4 células.

16. ENSAYO DE INCORPORACION DE (^3H) LEUCINA.

Para determinar el efecto de MA sobre la síntesis de proteínas celulares, los cultivos de células BHK fueron incubados en viales de 5 ml con MA por 2 u 8 horas, luego se lavaron y se agregó medio sin leucina y 1 hora más tarde

se agregó 2,5 µg/ml de Actinomicina D. Después de 60 minutos las células se marcaron con 2 mCi/ml de (³H) leucina. Para determinar la incorporación de leucina tritiada los viales se procesaron de la siguiente manera: se agregó 4 ml de PBS frío a cada vial por 15 minutos, luego se volcó el PBS y se agregó 1 ml de PCA 1,5%. Después de 15 minutos las monocapas se lavaron 2 veces con PBS y luego se hidrolizaron con 0,5 ml de NaOH 0,1 N por 4 horas a 80°C. La radiactividad se midió como se describió anteriormente.

17. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

ANALISIS DE LAS PROTEINAS EN CELULAS INFECTADAS.

17.1. PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

a) Se utilizaron 4 botellas de 60 cm³ de células BHK-21 de 24 horas.

Se pretrataron las células con dilución 1/5 (F11, 12,13) del extracto acuoso de M.a. ó con medio de mantenimiento adicionado de 3% de suero de ternera y antibióticos. A las 20 horas se lavaron las monocapas con PBS y se infectaron con el Clon-1 de virus Sindbis a una m.o.i. de 1 (Se utilizaron 2 frascos, uno pretratado con el extracto y uno control de virus; los otros 2 frascos se usaron de control de células pretratadas y normales).

Una hora después de la adsorción se retiró el inóculo

de las células infectadas y las falsamente infectadas y se agregó 2,5 µg/ml de Actinomicina D.

Siete horas después de la infección se cosecharon los sobrenadantes que se titularon y las células se lavaron 3 veces con PBS, se despegaron con una varilla de vidrio y se resuspendieron en 0,2 ml de "buffer" de muestra de electroforesis (1.2.3.).

Las muestras se congelaron y descongelaron, se calentaron 5 minutos en baño de agua hirviendo y se conservaron a -70°C hasta el momento de la siembra.

b) La muestra se preparó de igual manera que en el caso anterior pero entre las 5 y 7 horas p.i. las células infectadas se marcaron con 25 μ Ci/ml de L-(³⁵S)-Metionina

c) Se prepararon muestras como en el caso a), una vez transcurridas 7 horas post-infección se cosecharon los sobrenadantes que se titularon.

Las monocapas se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron raspando con una varilla de vidrio recubierta con goma en uno de los extremos en 1 ml de buffer RIPA(1.2.2.) (buffer para radioinmunoprecipitación).

La suspensión celular se sometió a 3 ciclos de congelado y descongelado y finalmente se sonicó durante 60 segundos en un Sonifier cell disruptor Model 185 Heat-System Ultra sonic Inc. y se centrifugó durante 30 minutos a 10.000 xg en un rotor JA 14 (Beckman). El sobrenadante se congeló a -70°C hasta el momento de su uso como fuente de antígenos virales para la prueba de inmunoprecipitación.

d) Inmunoprecipitación: Se incubaron 400 μ l de cada ex-

tracto intracelular con 50 μ l de suero hiperimmune anti-Sindbis durante 30 minutos a 37°C y 30 minutos a 4°C. A cada mezcla se agregó 90 μ l de suero anti- γ -globulina de conejo.

La mezcla obtenida se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y 90 minutos a 4°C, el precipitado formado se sedimentó por centrifugación a 10.000 xg durante 30 minutos, se lavó tres veces con "buffer" RIPA centrifugando cada vez 30 minutos a 10.000 xg y finalmente se re-suspendió en 50 μ l de buffer de muestra para electroforesis. Las muestras se calentaron durante 5 minutos en baño de agua hirviendo y se conservaron a -70°C hasta el momento de la siembra.

- 17.2. e) Electroforesis en gel: Se utilizaron geles planos de poliacrilamida según el sistema de Laemmli (78) y con la modificación en el sistema "buffer" de Marsden (84). Para la resolución de proteínas se preparó un gel con una relación(anterior)acrilamida a bisacrilamida de 30 a 0,8 siendo la concentración final del 12% de acrilamida en "buffer" Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 con agregado de SDS al 0,1% y como agentes polimerizantes TEMED (N,N,N',N'-tetra-metil-etilendiamina) y persulfato de amonio. Sobre el gel de resolución, se agregó un pequeño volumen de gel separador consistente en una solución de acrilamida 3,8% en Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 con SDS 0,1% y los mismos agentes polimerizantes del "buffer" de resolución.

En el gel así preparado se sembraron 50 μ l de cada muestra y se sometieron a la electroforesis a 150 voltios a 4°C hasta que el frente de corrida entró en el gel de resolución. A partir de ese momento se subió el voltaje a 180 voltios prosiguiendo la corrida hasta que el colorante alcanzó la parte inferior de la placa (aproximadamente 8 horas).

Junto con las muestras se sembró 25 μ l dilución 1/5 del marcador de pesos moleculares de proteínas de Pharmacia consistente en: PM 97.400, 43.000 y 25.700.

Terminada la corrida, el gel se tiñó sumergiendolo en la solución colorante (1.2.7.).

Luego se decoloró efectuando varios lavados con la solución (1.2.8.).

- 17.3. f) Fluorografía: Los polipéptidos marcados radiactivamente fueron visualizados por fluorografía de acuerdo al método de Bonner y Lasky (28), una vez desteñidos los geles. Para ello se sumergió el gel en dos baños sucesivos consistentes en 20 volúmenes de DMS (Dimetil-sulfóxido) durante 30 minutos cada vez. Una vez impregnado el gel se colocó en una solución de PPO (2,5 difeniloxazol) al 20% en DMS durante 3 horas. Finalmente se sumergió el gel en agua desilada hasta el día siguiente. Luego fue colocado sobre papel Whatman y se secó por aplicación de vacío y calor. Una vez seco el gel se puso en contacto con películas Kodak X-OMAT RP a -70°C en oscu-

ridad. Después de un período de 10-15 días las películas se revelaron con una solución de revelador Kodak GBX durante 1 minuto y luego de lavarlas en acético 0,1% se fijaron en fijador Kodak. Todo el proceso de revelado se realizó a temperatura ambiente.

- 17.4. g) Determinación de los pesos moleculares utilizando marcadores: Para determinar los PM de las proteínas del virus Sindbis se utilizaron los siguientes marcadores: A 97.400, B 43.000 y C 25.700 (Farmacia). Se calculó el PM de las sustancias incógnitas comparando las distancias recorridas en el gel por éstas, con aquellas alcanzadas por los marcadores mediante la fórmula:

$$\text{PM incógnita} = \text{PM}_C + \frac{(z \cdot y)}{x}$$

donde x = distancia recorrida por c - distancia recorrida por B.

$$y = \text{PM}_B - \text{PM}_C$$

z = distancia recorrida por C - distancia recorrida por Incógnita.

Esta fórmula se aplica si la distancia recorrida por la proteína incógnita es intermedia entre B y C

R E S U L T A D O S .

Parte I.

BUSQUEDA DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL.

1. PLANTAS ENSAYADAS.

Se estudiaron los extractos hidroalcohólicos y/o acuosos pertenecientes a las familias de plantas superiores: Compositae, Euforbiaceae y Meliaceae, así como los correspondientes al alga Coelastrum proboscideum var dilatatum perteneciente al orden Chlorococcales de las plantas inferiores. Las especies ensayadas se muestran en el Cuadro 10.

1.2. Ensayo de citotoxicidad.

En primer lugar se determinó la máxima concentración no tóxica de los extractos tolerada por los distintos sistemas celulares usados.

Con ese fin cada extracto fué diluído al medio en forma seriada partiendo de la máxima concentración de 0,5 mgr de peso seco/ml correspondiente a una concentración relativa de 0.1 ml/ml.

En el Cuadro 11 se presentan los resultados obtenidos cuando monocapas de células Vero. BHK-21, RK₁₃ y L₉₂₉ fueron incubadas durante 24 horas en presencia de las distintas concentraciones de los extractos, aunque no se muestra, los resultados observados no variaban si la incubación proseguía por 72 horas. En general las diluciones de 0,1 y 0,05 ml/ml resultaron citotóxicas para todas las células. Si bien se observa alguna variabilidad individual, se puede concluir que sólo la dilución 0,01 ml/ml de cada extracto ofrece la seguridad de no toxicidad por lo que esta concentración fué elegida para

Cuadro 10. Especies de plantas superiores e inferiores en-
sayadas para detectar actividad antiviral.

FAMILIA	ESPECIE
Compositae	<u>Baccharis crispa.</u>
	<u>Baccharis notoserghila.</u>
	<u>Pluchea sagittalis.</u>
	<u>Pterocaulom virgatum.</u>
	<u>Achyrocline flaccida.</u>
<u>Conyza bonariensis.</u>	
Euforbiaceae	<u>Phyllanthus selowianus.</u>
Meliaceae	<u>Melia azedarach L.</u>
	<u>Cedrela tubiflora.</u>
	<u>Trichilia glabra.</u>
Chlorophyceae	<u>Coelastrum proboscideum.</u>
Orden Chlorococcales	<u>var. dilatatum.</u>

Cuadro 11. Acción citotóxica de los extractos vegetales y de algas después de 24 horas de contacto.

Especie	Concentración relativa*	Cultivo celular			
		BHK-21	RK ₁₃	Vero	L ₉₂₉
<u>B. crispa</u>	0,1	++	++++	++++	++++
	0,05	-	++++	++	++
	0,025	-	++	-	-
	0,01	-	-	-	-
<u>B. notosergila</u>	0,1	-	++++	++	++++
	0,05	-	++	-	++
	0,025	-	-	-	-
<u>P. sagittalis</u>	0,1	++	++	-	++
	0,05	++	-	-	-
	0,01	-	-	-	-
<u>P. virgatum</u>	0,1	++	++	++	++
	0,01	-	-	-	-
<u>A. flaccida</u>	0,1	++++	++	++	++++
	0,05	++	-	-	++
	0,01	-	-	-	-
<u>C. bonariensis</u>	0,1	++++	++	-	++
	0,05	++	-	-	-
	0,01	-	-	-	-

Cuadro 11.

Especie	Concentración relativa*	BHK-21	Cultivo celular		
			RK ₁₃	Vero	L ₉₂₉
<u>P. selowianus</u>	0,1	++++	++	++++	++++
	0,05	++	-	++	++
	0,01	-	-	-	-
<u>C. tubiflora</u>	0,1	++++	++	++++	++++
	0,05	++++	++	++	++
	0,025	++	-	-	-
	0,01	-	-	-	-
<u>T. glabra</u>	0,1	++++	++	++++	++++
	0,05	++++	++	++	++
	0,025	++	-	-	-
	0,01	-	-	-	-
<u>M. azedarach L.</u>	0,1	++++	++++	++	++
	0,05	++++	++++	-	++
	0,025	++	++	-	-
	0,01	-	-	-	-
<u>C. proboscideum</u>	0,1	NH	++++	-	++
	0,05	NH	-	-	-
	0,01	NH	-	-	-

NH: No hecho.

++++: Destrucción total del tejido.

++: Destrucción parcial del tejido.

-: Concentración no citotóxica.

Dilución de peso seco equivalente a 5 mgr/ml de cada extracto.

la búsqueda de actividad antiviral.

Como conclusión podemos decir que la citotoxicidad variaba con el extracto y con la línea celular utilizada.

1.3. Acción de los extractos sobre la multiplicación viral.

La actividad antiviral de los extractos crudos, a la concentración no citotóxica (50 µg/ml) sobre la multiplicación de una serie de virus tanto a DNA como a RNA se presenta en los Cuadros 12, 13, 14, 15, 16 y 17. Se observa que ninguno de los extractos tiene acción sobre la multiplicación del virus aftoso O₁ Caseros y sólo el extracto de Melia azedarach L tiene efecto, aunque no muy pronunciado, sobre la multiplicación del virus Polio. Es interesante recordar que ambos virus no son envueltos y pertenecen a la familia Picornaviridae.

Los virus VSV, HSV-1, Sindbis y los arenavirus Junín, Pichindé y Tacaribe fueron significativamente inhibidos por los extractos de Melia azedarach, Cedrela tubiflora y Trichilia glabra. Llamativamente estas tres especies pertenecen a la familia Meliaceae.

La susceptibilidad de cada virus varió sin embargo respecto al extracto usado. Todos son altamente susceptibles a Melia azedarach pero comparativamente la inhibición para el virus Tacaribe es mayor que para Pichindé y Junín para los tres extractos de la familia

Cuadro 12. Efecto de los extractos sobre la multiplicación del virus aftoso O₁ Caseros.

Extracto	Rendimiento viral UFP/ml	Inhibición %
Control	5,0 x 10 ⁶	0
<u>B. crispa.</u>	1,5 x 10 ⁷	0
<u>B. notoserčila</u>	1,5 x 10 ⁷	0
<u>P. sagittalis</u>	5,4 x 10 ⁶	0
<u>P. virgatum</u>	5,8 x 10 ⁶	0
<u>A. flaccida</u>	6,0 x 10 ⁶	0
<u>C. bonariensis</u>	6,0 x 10 ⁶	0
<u>P. selowianus</u>	5,4 x 10 ⁶	0
<u>M. azedarch L</u>	5,0 x 10 ⁶	0
<u>C. tubiflora</u>	5,2 x 10 ⁶	0
<u>T. glabra</u>	5,8 x 10 ⁶	0

Las placas se revelaron a las 72 horas post-infección en células BHK-21.

Los extractos se agregaron después de la hora de adsorción a la concentración no citotóxica (50 µg/ml) y estuvieron presentes o hasta la cosecha del virus.

Cuadro 13: Efecto de los extractos sobre la multiplicación del virus Polio.

Extracto	Rendimiento viral UFP/ml	Inhibición %
Control	2,4 x 10 ⁶	0
<u>B. crispa</u>	2,0 x 10 ⁶	16,7
<u>B. notoserghila</u>	1,8 x 10 ⁶	25
<u>P. sagittalis</u>	1,8 x 10 ⁶	25
<u>P. virgatum</u>	2,2 x 10 ⁶	8,4
<u>A. flaccida</u>	2,0 x 10 ⁶	16,7
<u>C. bonariensis</u>	2,4 x 10 ⁶	0
<u>P. selowianus</u>	1,4 x 10 ⁶	41,7
<u>M. azedarach L.</u>	5,0 x 10 ⁵	80
<u>C. tubiflora</u>	8,2 x 10 ⁵	65,9
<u>T. glabra</u>	7,9 x 10 ⁵	67,1

Las placas se revelaron a las 48 horas post-infección en células Vero.

Los extractos se agregaron después de la hora de adsorción a la concentración no citotóxica (50 µg/ml) y estuvieron presentes hasta la cosecha viral.

Cuadro 14: Efecto de los extractos sobre la multiplicación del virus VSV.

Extracto	Rendimiento viral UFP/ml	Inhibición %
Control	7,4 x 10 ⁶	0
<u>B. crispa</u>	4,2 x 10 ⁵	94,2
<u>B. notosergila</u>	1,3 x 10 ⁵	82
<u>P. sagittalis</u>	7,4 x 10 ⁶	0
<u>P. virgatum</u>	5,8 x 10 ⁶	21,7
<u>A. flaccida</u>	7,6 x 10 ⁶	0
<u>C. bonariensis</u>	6,0 x 10 ⁶	19
<u>P. selowianus</u>	5,4 x 10 ⁶	27
<u>M. azedarach L</u>	4,0 x 10 ⁴	99,5
<u>C. tubiflora</u>	9,1 x 10 ³	99,8
<u>T. glabra</u>	1,05x 10 ²	99,86

Las placas se revelaron a las 72 horas post-infección en células Vero.

Los extractos se agregaron después de la hora de adsorción a la concentración no citotóxica (50 µg/ml) y estuvieron presentes hasta la cosecha del virus.

Cuadro 15: Efecto de los extractos sobre la multiplicación del virus Sindbis.

Control	Rendimiento viral UFP/ml	Inhibición %
Control	$8,5 \times 10^8$	0
<u>B. crispa</u>	$8,0 \times 10^8$	5,9
<u>B. notoserčila</u>	$7,6 \times 10^8$	10,6
<u>P. sagittalis</u>	$8,0 \times 10^8$	5,9
<u>P. virgatum</u>	$8,2 \times 10^8$	3,6
<u>A. flaccida</u>	$7,4 \times 10^8$	13
<u>C. bonariensis</u>	$7,4 \times 10^8$	13
<u>P. selowianus</u>	$6,0 \times 10^8$	29,5
<u>M. azedarach L</u>	$4,3 \times 10^7$	95
<u>C. tubiflora</u>	$9,0 \times 10^5$	99,8
<u>T. glabra</u>	$6,2 \times 10^7$	92,8

Las placas se revelaron a las 72 horas post-infección en células BHK-21.

Los extractos se agregaron después de la hora de adsorción a la concentración no citotóxica (50 µg/ml).

Cuadro 16: Efecto de los extractos sobre la multiplicación del virus Herpes simple tipo I.

Extracto	Rendimiento viral UFP/ml	Inhibición %
Control	2,2 x 10 ⁵	0
<u>B. crispa</u>	2,0 x 10 ⁵	9,1
<u>B. notosergila</u>	1,8 x 10 ⁵	19,2
<u>P. sagittalis</u>	2,2 x 10 ⁵	0
<u>P. virgatum</u>	2,0 x 10 ⁵	9,1
<u>A. flaccida</u>	1,8 x 10 ⁵	19,2
<u>C. bonariensis</u>	1,8 x 10 ⁵	19,2
<u>P. selowianus</u>	1,2 x 10 ⁵	45,5
<u>M. azedarach L</u>	2,1 x 10 ⁴	90
<u>C. Tubiflora</u>	1,2 x 10 ⁴	94,5
<u>T. glabra</u>	1,8 x 10 ⁴	91,8

Las placas se revelaron a los 5 días post-infección en células Vero.

Los extractos se agregaron después de la hora de adsorción a la concentración no citotóxica (50 µg/ml).

Cuadro 17: Efecto de los extractos vegetales sobre la multiplicación de los Arenavirus

Extracto	Junín		Inhibición		Tacaribe		Inhibición		Pichindé		Inhibición	
	Control	Tratado	%	Tratado	Control	Tratado	%	Tratado	Control	Tratado	%	%
	UFP/ml			UFP/ml		UFP/ml			UFP/ml			
<u>B. crisepe</u>	3,4 x 10 ⁶	3,5 x 10 ⁶	0	2,4 x 10 ⁴	2,8 x 10 ⁴	0	2,3 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁵	13,1			
<u>B. notoseriile</u>	3,4 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	29,5	2,4 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	12,5	2,3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	21,8			
<u>P. sagittalis</u>	3,4 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	5,9	2,4 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴	0	2,3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁵	21,8			
<u>P. virratum</u>	3,4 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁶	0	2,4 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴	0	2,3 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁵	-,4			
<u>A. flaccida</u>	3,4 x 10 ⁶	3,2 x 10 ⁶	5,9	2,4 x 10 ⁴	2,2 x 10 ⁴	8,4	2,3 x 10 ⁵	2,2 x 10 ⁵	4,4			
<u>C. bonariensis</u>	3,4 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁶	35,3	2,4 x 10 ⁴	2,2 x 10 ⁴	8,4	2,3 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁵	13,1			
<u>P. selowianus</u>	3,4 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	29,5	2,4 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	25	2,3 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁵	13,1			
<u>M. azedarach L</u>	3,4 x 10 ⁶	5,4 x 10 ⁵	80,0	2,4 x 10 ⁴	9,0 x 10 ²	96	2,3 x 10 ⁵	1,8 x 10 ⁴	92			
<u>C. tubiflora</u>	8,4 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶	70,6	2,4 x 10 ⁴	2,8 x 10 ³	88,4	2,3 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵	52,2			
<u>T. glabra</u>	3,4 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁶	55,9	2,4 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴	90	2,3 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁴	90,9			

Todas las titulaciones se hicieron en células Vero y las placas se revelaron a los 7 días post-infección.

Los extractos se agregaron después de la hora de adsorción a la concentración no citotóxica.

Meliaceae en conjunto.

El virus VSV resultó ser sensible además a los extractos de Baccharis crispa y Baccharis notoserghila.

Se puede observar que existe un contraste entre la gran labilidad de VSV y la estabilidad del virus aftoso frente a los extractos ensayados.

1.4. Efecto de los extractos del alga Coelastrum proboscideum var. dilatatum sobre la multiplicación de virus animales.

El efecto de los extractos sobre la multiplicación viral se muestra en el Cuadro 18. Para obtener estos resultados los cultivos celulares fueron infectados con una multiplicidad de infección de uno con cada uno de los virus y después de la hora de adsorción a 37°C el inóculo fué volcado. Luego se cubrieron las células con medio conteniendo los extractos, mientras que otras incubadas únicamente con medio sirvieron de control. Los sobrenadantes de los controles y de las células tratadas infectadas con VSV, Polio y Herpes fueron cosechados a las 24 horas post-infección, mientras que los arenavirus: Tacaribe y Junín se cosecharon a las 72 horas p.i. Todas las titulaciones virales fueron realizadas en el mismo sistema usado para la multiplicación. Los resultados del Cuadro 18 muestran que el extracto 1 DG del alga inhibe significativamente a los virus ensayados y que los extractos 2 DG y 3 DG tienen un efecto muy moderado o ninguno.

Para descartar un efecto del medio de cultivo que

se utilizó para cultivar el alga, se realizó un experimento control con el medio DG (Detner-Glucosa) diez veces concentrado y el virus VSV como indicador.

Los resultados obtenidos se encuentran en el Cuadro 19 y muestran que la multiplicación del virus VSV no es afectada por incubación de las células infectadas con el medio de crecimiento del alga.

Los resultados presentados aquí sugieren que el alga produce uno o varios productos que han sido liberados en el medio de cultivo. Como este producto(s) parece depender de la edad del cultivo se supone que podría ser un metabolito que es transformado o parcialmente metabolizado por el subsiguiente crecimiento masivo del alga.

Como conclusión de esta etapa de búsqueda de antivirales en plantas se seleccionó uno de los extractos el de Melia azedarach para continuar investigaciones más detalladas.

Esta selección se basó en tres factores:

- a) El amplio rango de espectro antiviral.
- b) Baja toxicidad para cultivos celulares.
- c) La posibilidad de obtener material ya que el árbol del Paraíso es una especie de ornamentación que se cultiva en parques y calles de la ciudad de Buenos Aires.

Cuadro 18: Efecto de los extractos del alga Coelastrum proboscideum var. dilatatum sobre la multiplicación viral.

Virus	Control UFP/ml	U F P / m l		
		1 DG	2 DG	3 DG
Junín	$1,4 \times 10^4$	< 5 (99,9)*	$3,5 \times 10^3$ (75)	$5,0 \times 10^3$ (64)
Tacaribe	$1,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^3$ (94)	$4,5 \times 10^5$ (0)	$9,1 \times 10^4$ (24)
VSV	$8,9 \times 10^7$	$8,6 \times 10^6$ (96)	$1,1 \times 10^8$	NH
Polio	$2,4 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$ (88)	NH	NH
Herpes	$1,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$ (99)	$1,6 \times 10^4$ (90)	$5,0 \times 10^5$ (69)

* = % de inhibición

NH = No hecho.

Todas las titulaciones se realizaron en células Vero.

Cuadro 19: Efecto del medio DG (Detmer-Glucosa) concentrado 10 veces sobre la multiplicación de VSV.

Virus	Control UFP/ml	Medio DG UFP/ml
VSV	$8,2 \times 10^7$	$5,5 \times 10^7$

Las placas se leyeron a las 72 horas post-infección en células Vero.

Parte II.

PROPIEDADES DEL PRINCIPIO ACTIVO DE
MELIA AZEDARACH L: INDUCCION DE UN
ESTADO ANTIVIRAL.

Los resultados presentados en la Primera Parte de esta Tesis indican que la actividad antiviral detectada en el extracto de Melia azedarch L lo señala como un producto natural de potencial importancia como antiviral.

Resultó entonces necesario investigar la toxicidad de dichos extractos para monocapas celulares, animales (ratones) y huevos embrionados.

2.1. ACCION DEL EXTRACTO DE MELIA AZEDARCH SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.

2.1.1. Sobre monocapa preformada.

En el Cuadro 20 se encuentran los resultados obtenidos cuando células Vero y BHK-21 fueron incubadas en presencia de diluciones seriadas al medio decrecientes del extracto por 24 hs, se observa que las células BHK-21 son más susceptibles puesto que una concentración de 0,125 mgr de peso seco/ml reduce la viabilidad celular en un 25%. En todos los experimentos se utilizó la concentración de 50 µg de peso seco/ml como concentración no citotóxica.

2.1.2. Acción de M.a. sobre la adherencia celular.

Los resultados anteriores (Cuadro 20) muestran que a la concentración no citotóxica no se producen alteraciones en el número de células y morfología, indicando que no se produce una acción marcada sobre la síntesis de las macromoléculas celulares, ni acción directa sobre estructuras de la célula (membranas). Como

Cuadro 20: Acción de M.a. sobre la viabilidad de células
crecidas en monocapa.

Viabilidad celular %		
Concentración de M.a. (mgr/ml)*	Células Vero	Células BHK-21
0	100	100
0,0625	100	100
0,125	100	75
0,250	75	50
0,500	50	50

* mgr de peso seco/ml.

Se utilizaron cultivos celulares de 24 horas los que fueron tratados con diluciones seriadas del extracto de M.a. a las 24 horas se determinó la viabilidad celular por el método de exclusión del azul de tripan. El número de células viables en los controles fué de 2×10^5 células/ml.

en este caso las células no están en división activa, se quiso determinar que ocurriría si el extracto estuviera presente en el momento de sembrar las células ya sea alterando la membrana o bien inhibiendo la división celular.

Para ello se diseñó el siguiente experimento:

Se trabajó por triplicado en forma paralela partiendo de 2×10^6 células recientemente tripsinadas las que fueron resuspendidas en:

- 1) Células + medio de crecimiento 5% Suero de ternera.
- 2) Células + medio de crecimiento + M.a. concentración citotóxica (0,5 mgr de peso seco/ml).
- 3) Células + medio de crecimiento + M.a. concentración no citotóxica (0,05 mgr de peso seco/ml).

Los resultados mostraron que a las 24 horas:

Serie 1: adherencia normal al vidrio.

Serie 2: las células se pegaban pero aparecían redondeadas.

Serie 3: adherencias similar al control.

A todas las monocapas se les cambió el medio por medio MC para ver si se recuperaban. A las 48 se observó:

Serie 1: normal.

Serie 2: se recuperó en un 30%.

Serie 3: normal.

Debe señalarse que aún con altas concentraciones del extracto de M.a. (0,5 mgr de peso seco/ml) el crecimiento celular no fué totalmente inhibido puesto que

la monocapa celular llegó a formarse aunque el número de células viables resultó menor. De este experimento también se deduce que la adherencia celular no está inhibida por acción del extracto de M.a. a la concentración no citotóxica.

2.2. ENSAYO DE TOXICIDAD PARA ANIMALES.

2.2.1. Ratones adultos.

Se inocularon dos lotes de 20 animales cada uno, uno de ellos se utilizó de control.

Al primero de ellos (15 machos y 5 hembras) se lo inculó con 3 dosis vía intraperitoneal (i.p.) en 3 días sucesivos de 0,5 ml de MM adicionado de 2,5 mgr/ml de M.a. Al lote control se lo trató de igual manera pero con 0,5 ml de MM.

Los animales fueron observados durante 15 días sucesivos. No se observaron diferencias de comportamiento, pérdida de peso o enfermedad evidente en ninguno de ellos ya sea control o tratados, por lo que en estas condiciones no se pudo calcular la DL_{50} (dosis letal 50% .

2.2.2. Ratones neonatos.

Se inocularon ratones de 48 horas de vida. Se utilizaron 4 lotes de 9 animales cada uno, dos de los cuales se usaron como controles. El experimento se realizó igual que en el caso anterior salvo que la dosis utilizada por vía i.p. fué de 0,02 ml. Tampoco se

encontraron diferencias en el peso y sobrevida entre los lotes tratados y controles después de 30 días de observación.

Estos resultados parecieron bastante alentadores ya que la mayoría de los antivirales sintéticos que se conocen tienen el inconveniente de que resultan altamente tóxicos para el huésped.

Cabe destacar que las concentraciones del extracto utilizadas para los ensayos fueron 50 veces mayores que las utilizadas para la determinación de actividad antiviral in-vitro.

2.3. ENSAYO DE TOXICIDAD PARA HUEVOS EMBRIONADOS.

Se inocularon huevos embrionados de 10 días de desarrollo con 0,2 ml de M.a. en cavidad alantoidea. Se utilizaron 3 lotes de 10 huevos cada uno. Uno se utilizó de control y fué inoculado con MM. Los otros dos fueron inoculados con 0,5 mgr/ml y 0,05 mgr/ml de M.a. respectivamente.

La concentración de 0,5 mgr/ml resultó altamente tóxica ya que todos los embriones murieron con hemorragias a las 24 horas de iniciado el tratamiento. Con la concentración 0,05 mgr/ml no se observaron diferencias con respecto al control.

2.4. MODO DE ACCION DEL EXTRACTO DE MELIA AZEDARACH L.

2.4.1. El efecto de M.a. no se manifiesta por acción directa sobre la partícula viral.

Para realizar el ensayo se pusieron en contacto dis-

Cuadro 21: Ensayo de actividad antiviral in-vitro del extracto de M.a.

Tiempo de contacto (horas)	VSV*		Junín*	
	Control	Tratado	Control	Tratado
0	$3,5 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
24	$2,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$

* = UFP/ml. Todas las titulaciones se realizaron en células Vero.

Se utilizó la concentración de M.a. de 0,05 mgr/ml de peso seco.

tintas concentraciones no citotóxicas del extracto con un número determinado de partículas virales a 4°C por 24 horas. Al mismo tiempo se mezclaron diluciones similares de virus en medio sin M.a. Al cabo de este tiempo se determinó la cantidad de virus remanente. Los virus utilizados fueron: VSV y Junín. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 21, en el mismo se observa que con el extracto se perdió el 53% de la infectividad del virus VSV y sin extracto el 32% a las 24 horas. La pérdida de la infectividad se puede atribuir a la inactivación por la temperatura. En cuanto al virus Junín no se observaron diferencias significativas, indicando que el extracto no actuaría en forma directa sobre los viriones.

2.4.2. Inducción de un estado antiviral por pretratamiento de las células con el extracto.

Como se ha presentado en la Parte I, el extracto de M.a. se agregó en todos los casos después de la adsorción viral. Esto en principio presupone que la acción de M.a. es intracelular tal como se deduce de los experimentos realizados in-vitro (2.4.1.).

Se planteó entonces la pregunta si M.a. era capaz de inducir en la célula un estado antiviral, esta idea surgió porque según Babbar y col. (13) existen ciertos extractos de plantas superiores (Beberis asiática, Melia azedarach, Pinus longifolia y Cleitanthus callinus) que poseen factores tipo interferon que inhiben

a los virus Vaccinia y NDV.

Para probar la hipótesis anterior, los cultivos celulares fueron tratados con el extracto por 24 horas a 37°C, transcurrido este tiempo las monocapas fueron lavadas dos veces con PBS e infectadas con una m.o.i. de 1, luego de la adsorción el inóculo fué volcado y se agregó MM. Cultivos no tratados e infectados de una manera similar se usaron como controles. Si comparamos estos resultados (Cuadro 22) con los que se presentan en los cuadros de la sección 1.3. concluimos que el rango de acción antiviral se ha reducido y además de aftosa, los virus polio y Tacaribe ya no son sensibles. Creemos importante el hecho que se desencadene un estado antiviral ya que de alguna manera elimina la interpretación del efecto directo sobre la partícula viral. Esta propiedad interesante la presenta solamente el interferón o los inductores del mismo.

2.4.3. Influencia de la célula huésped sobre la acción antiviral del extracto.

En el Cuadro 23 se presentan los resultados obtenidos cuando los virus VSV, Tacaribe y Herpes (HSV) que tienen la propiedad de multiplicar en distintos sistemas celulares, son crecidos y titulados en los mismos ya sea en presencia del extracto o por pretratamiento de los mismos. Siempre se corrió un control en paralelo sin extracto.

Evidentemente son tres los factores en juego:

Cuadro 22: Efecto del extracto de Melia azedarach L sobre la producción de virus por pretratamiento de las células antes de la infección.

Familia	Especie	Control	Tratamiento	Inhibición %
		UFP/ml		
Arenaviridae	Junín**	$2,7 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	30
	Tacaribe**	$8,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	8,7
	Pichindé**	$3,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	90
Togaviridae	Sindbis*	$2,7 \times 10^8$	$1,6 \times 10^6$	99,5
Picornaviridae	Aftosa*	$1,7 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	0***
	Polio**	$3,8 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$	10,6
Rhabdoviridae	VSV**	$1,0 \times 10^8$	$1,3 \times 10^5$	98,3
Herpesviridae	HSV-1**	$2,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	90

* Ensayo realizado en células BHK.

** Ensayo realizado en células Vero.

*** En este caso hubo reducción del tamaño de las placas. Concentración del extracto de

M.a. utilizada 0,05 mgr/ml de peso seco.

Cuadro 23: Influencia de la célula huésped en la acción antiviral de M.a.

Virus	Célula huésped	Pretratamiento		M.a. agregada post-adsorción		Inhibición %
		No tratado	Tratado	No tratado	Tratado	
VSV	Vero	$5,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$8,6 \times 10^5$	33
	BHK ₂₁	$5,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$	$6,3 \times 10^8$	$3,8 \times 10^8$	40
	L929	$8,0 \times 10^6$	$8,4 \times 10^4$	$5,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^5$	97
	RK ₁₃	NH	NH	$3,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	96
Tacaribe	Vero	$8,0 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	88
	RK ₁₃	NH	NH	$2,4 \times 10^4$	$9,0 \times 10^2$	96
BSV ₁	Vero	$2,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	90
	RK ₁₃	$7,9 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$8,2 \times 10^3$	$2,2 \times 10^2$	97,3
	BHK ₂₁	$1,7 \times 10^5$	$1,7 \times 10^3$	$1,6 \times 10^5$	$2,4 \times 10^3$	98,5

Concentración del extracto 0,05 mg/ml de peso seco.

NH: no hecho.

- 1) El virus.
- 2) La célula huésped.
- 3) M.A. (su modo de acción).

Ya que de los datos del Cuadro 23 se deduce:

- 1) que VSV es mucho más susceptible al pretratamiento y que este efecto no depende de la célula huésped o sea que en células no productoras de interferón como las Vero ocurre el mismo fenómeno.
- 2) Por post-tratamiento hay diferencias en la actividad antiviral según la célula huésped.
- 3) Para HSV el efecto es independiente de la célula y dá lo mismo pre y post-tratamiento.

2.4.4. Falta o carencia de pasaje de una sustancia antiviral al medio de cultivo.

Los experimentos anteriores señalaban que la acción de M.a. se ejercía intracelularmente. Pero desconocíamos si M.a. penetra a las células o si M.a. desencadena la síntesis de novo de otro factor. En cualquiera de los dos casos se buscó determinar si existía pasaje de la "sustancia" activa antiviral al medio de cultivo. Para ello se pretrataron células L y Vero con el extracto, luego de la remoción del mismo se cubrieron las monocapas con medio de cultivo fresco.

Luego de 24 horas de tratamiento este medio se utilizó para pretratar otras monocapas las que luego de

Cuadro 24: Carencia de pasaje de una sustancia antiviral al medio de cultivo.

Tratamiento	Rendimiento viral	Inhibición
	UFP/ml	%
1	$1,05 \times 10^7$	0
2	$5,50 \times 10^2$	99,99
3	$1,15 \times 10^6$	89,1
4	$7,50 \times 10^5$	92,8
5	$3,0 \times 10^6$	71,5
6	$1,07 \times 10^7$	0

Se utilizaron células Vero, virus VSV y extracto M.a. concentración 0,05 mgr/ml de peso seco. Los rendimientos se cosecharon a las 24 horas y se titularon.

- 1: Control de virus: Células Vero infectadas con VSV m.o.i. = 1 y cubiertas con medio de cultivo (MM).
- 2: Idem 1 pero se cubrieron las células con MM adicionado de extracto.
- 3: Idem 1 pero se cubrieron las células con sobrenadante del medio de cultivo de otras células sin diluir con medio fresco.
- 4: Idem 1 pero se cubrieron las células con sobrenadante de medio de cultivo de otras células diluido al medio con medio fresco.
- 5: Idem 1 pero se cubrieron las células con sobrenadante del medio de cultivo adicionado de extracto sin diluir con medio fresco proveniente de otras células.
- 6: Idem 1 pero se cubrieron las células con medio de cultivo adicionado de extracto proveniente de otras células diluido al medio con medio fresco.

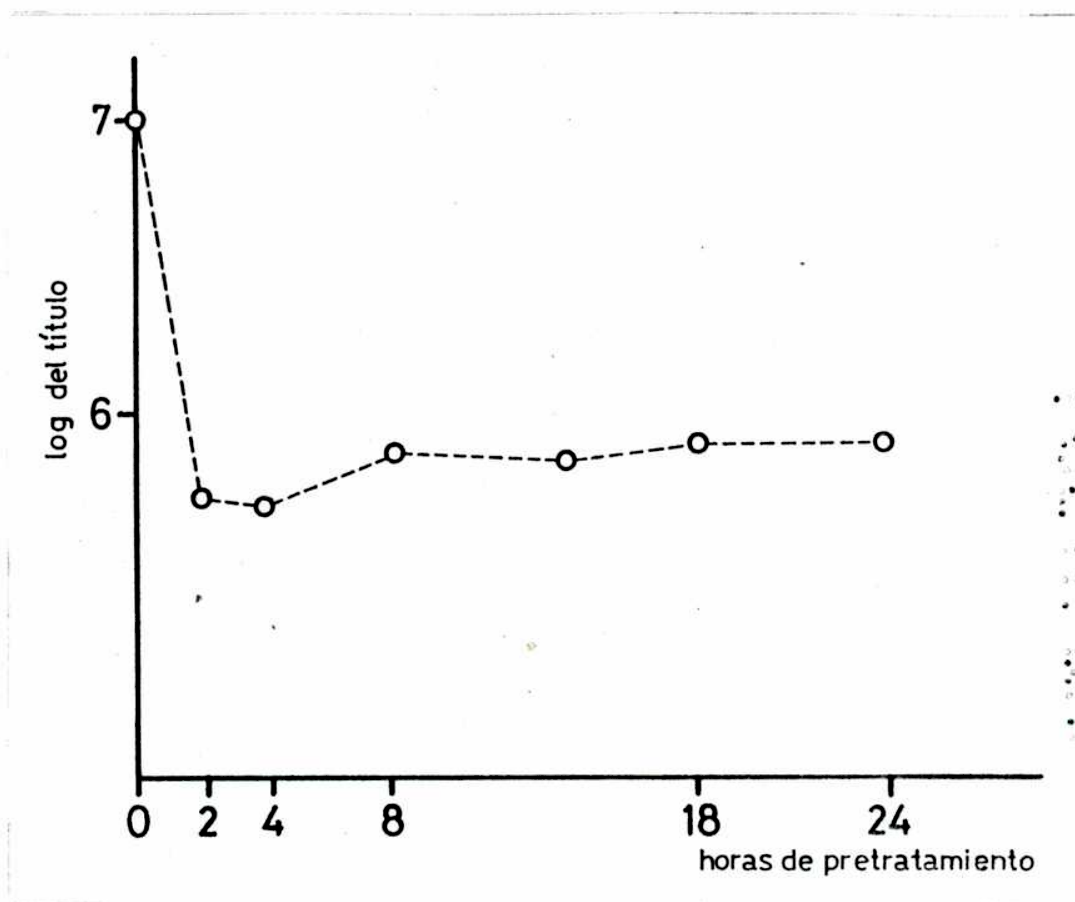
24 horas se lavaron e infectaron con VSV. Los resultados obtenidos se encuentran en el Cuadro 24. Del mismo se deduce que no hay una segunda sustancia antiviral que pasa al medio de cultivo tal como sucede con el Interferón. En el Cuadro 24 también observamos que los sobrenadantes de las células no tratadas inhiben la multiplicación viral. Esto concuerda con los trabajos de Baron S. y col. que demostraron que diferentes tipos de cultivos celulares producían espontáneamente un inhibidor extracelular de amplio espectro (20).

2.4.5. Características del estado antiviral.

2.4.5.1. Determinación del tiempo mínimo de pretratamiento de las células con el extracto.

Se trató de determinar cual era el tiempo mínimo necesario para inducir en la célula un estado antiviral. Para ello se utilizó como sistema indicador al virus VSV y a las células Vero. Se pretrataron células Vero a distintos tiempos preinfección, luego se lavaron dos veces con PBS y se infectaron con VSV, a las 24 horas se cosecharon los sobrenadantes que se titularon por el método de placas.

Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 3, de ella se deduce que el tiempo mínimo de pretratamiento necesario para desencadenar un estado antiviral en la célula es de 2 horas, para la máxima concentración antiviral (no tóxica) usada.

Figura 3: Determinación del tiempo mínimo de pretratamiento.

Células Vero de 24 horas fueron pretratadas distintos tiempos con 0,05 mgr/ml del extracto de M.a. Luego se infectaron con VSV m.o.i. de 1. A las 24 horas se cosecharon los sobrenadantes que se titularon por el método de placas.

2.4.5.2. Duración del estado antiviral.

Se tenía interés en establecer la duración del estado antiviral. Para ello se pretrataron células Vero de 24 horas de siembra con 0,05 mgr de peso seco de M.a./ml durante 2 horas. A distintos tiempos post-lavado de M.a. las células se infectaron con VSV m.i. de 1. Los sobrenadantes se cosecharon siempre a las 24 horas p.i. respecto del momento de la infección. Los resultados obtenidos se encuentran en el Cuadro 25 de estos se deduce que la duración del estado antiviral inducido por el extracto es bastante prolongada ya que incluso infectando las células 24 horas después de lavado el extracto existe aún una inhibición del 60% en la replicación viral.

2.4.5.3. Efecto del agregado del extracto a distintos tiempos post-infección.

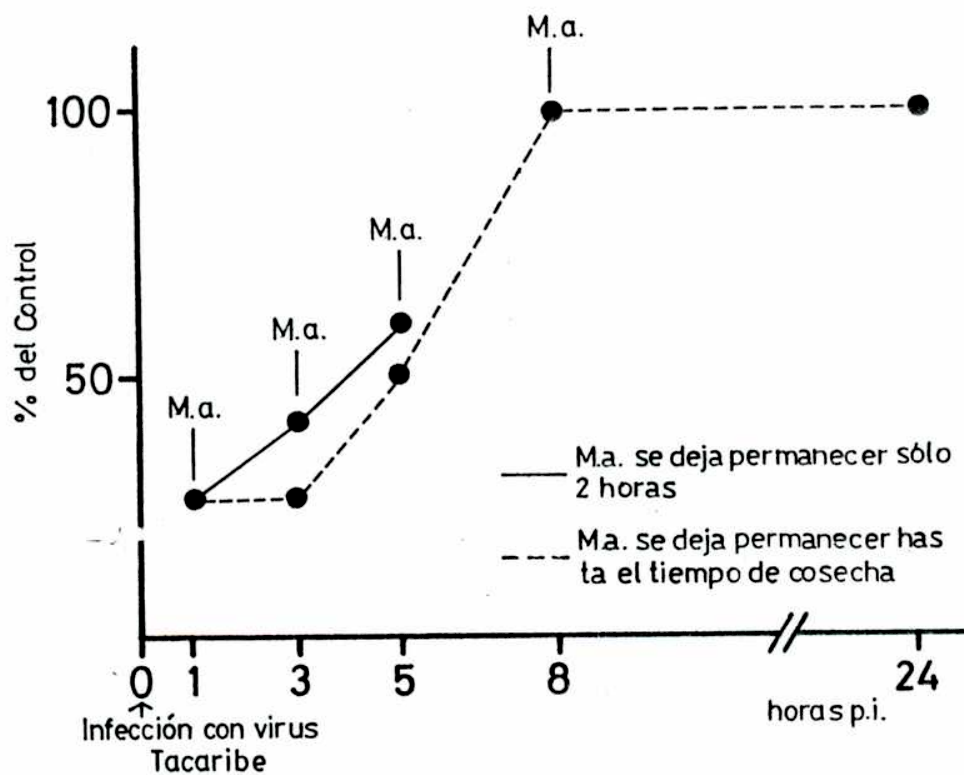
Otro dato interesante era conocer hasta que momento de transcurrido el ciclo de multiplicación se podría agregar M.a. para que esta fuese efectiva; para ello se infectaron células Vero con virus Tacaribe con una m.i. de aproximadamente 1 para ver si era un evento temprano o tardío en la replicación viral el que estaba afectado por el extracto. Se utilizó este virus porque resultó ser uno de los más susceptibles cuando el extracto era agregado después de la adsorción viral (Cuadro 17).

Cuadro 25: Duración del estado antiviral.

Tiempo hs*	Rendimiento viral		Inhibición %
	control	UFP/ml tratado	
0	$4,7 \times 10^7$	$4,6 \times 10^6$	90
2	$7,2 \times 10^7$	$7,5 \times 10^6$	89,6
6	$1,2 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$	85,8
24	$4,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	60

*: Indica los tiempos post-lavado a los que se infecta con VSV con una m.o.i. de 1. Las células Vero fueron pretra_utadas durante 2 horas con 0,05 mgr/ml de M.a.

Figura 4: Efecto del agregado del extracto de M.a. a distintos tiempos post-infección.



M.a. Melia azedarach concentración 0,05 mgr/ml.

A distintos tiempos p.i. se agregó el extracto que se dejó permanecer todo el tiempo hasta que se cosecharon los sobrenadantes (experimento A) ó se dejó permanecer durante 2 horas a los tiempos indicados y luego se lavaron las monocapas y se agregó MM sin extracto hasta el momento de la cosecha (experimento B).

Los resultados se encuentran en la Figura 4 en ella se vé que ya a las 5 horas la replicación se vé disminuída y a las 8 horas no se observa efecto alguno. Se obtuvieron resultados semejantes en los experimentos A y B. Todo parecería indicar que en este caso lo que estaría afectado es un evento temprano de la replicación, ya que este virus tiene un ciclo de replicación relativamente largo.

Parte III.

UBICUIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO DE
MELIA AZEDARACH L: ENSAYOS ORIENTADOS
A SU CARACTERIZACION Y PURIFICACION
PARCIAL.

3. PRESENCIA DEL INHIBIDOR EN DIFERENTES PARTES DE LA PLANTA.

Durante la búsqueda de sustancias con actividad antiviral (screening) descrito en las partes I y II de este trabajo de Tesis en los ensayos con Melia azedarch L se utilizaron extractos hidroalcohólicos de raíces de árboles oriundos del Paraguay. Las dificultades de obtención del material en cantidades suficientes para encarar otros estudios nos indujeron a recolectar hojas y ramas de árboles de la ciudad de Buenos Aires con el objeto de investigar la presencia en las mismas. En principio al utilizar parte aérea (hojas y ramas) se trabajó con material seco al que se sometió a una extracción hidroalcohólica. Posteriormente resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que las hojas verdes contenían el principio activo el que podía ser extraído con solución buffer

En esta sección describiremos los experimentos realizados con el extracto denominado MAsp (ver en Materiales y Métodos sección 6.2.(hojas y ramas secas extracto hidroalcohólico)) semipurificado, ya que en principio no se quiso cambiar el método de extracción, usado con raíces, para asegurar el éxito del aislamiento del principio activo. Dado que en pruebas preliminares realizadas con virus VSV y células Vero encontramos que el extracto de MAsp poseía actividad antiviral, se decidió determinar su toxicidad para células, ratones y huevos embrionados a fin de establecer las dosis de trabajo apropiadas.

3.1. Ensayos de toxicidad del extracto de MAsp para células, animales y huevos embrionados.

Los ensayos se realizaron de manera análoga a los descritos en las secciones 2.1, 2.2, y 2.3 de la parte II de resultados de este trabajo de Tesis. Con el fin de no repetir datos similares se resúmen los resultados obtenidos a manera de conclusión.

- 1) La capacidad citotóxica se ensayó en los sistemas celulares Vero y BHK-21. La máxima concentración no tóxica de MAsp en ambos casos fué la de 10 mgr de peso seco/ml. la concentración de 50 mgr de peso seco/ml redujo la viabilidad celular en un 50% para las células BHK-21 y en un 25% para las células Vero.
- 2) La toxicidad para ratones adultos y neonatos se ensayó administrando una concentración de 500 mgr/ml de peso seco por vía i.p.. Las dosis utilizadas fueron 0.5 ml para los adultos y 0,02 ml para los neonatos. Esta concentración no resultó tóxica en forma análoga a lo obtenido con el extracto de M.a. comentado en sección 2.2.
- 3) La toxicidad para huevos embrionados también se ensayó de manera similar a la descrita en la sección 2.3. Las concentraciones de MAsp usadas en el experimento fueron: 100 mgr/ml y 10 mgr/ml. La primera resultó altamente tóxica ya que todos los embriones murieron con hemorragias a las 24 horas

post-inoculación. Con la concentración de 10 mgr/ml no se observaron efectos tóxicos con respecto al control.

3.2. Espectro de acción antiviral del MAsp.

La presencia del inhibidor en hojas y ramas de Melia azedarach L se manifestó por su acción sobre los distintos virus.

Como se detalla en el Cuadro 25, el extracto MAsp produce una inhibición semejante al de raíz a la concentración no citotóxica (10 mgr de peso seco/ml). Es interesante observar además la susceptibilidad aumentada de los virus HSV-1 y Tacaribe que se inactivan más de cuatro logs. De modo que, a pesar de que la capacidad citotóxica de MAsp es similar a la del extracto M.a., su potencial antiviral es mayor. El virus de NDV también resultó marcadamente inhibido con este extracto, confirmando datos publicados por Babbar y col. (13).

Una vez que se comprobó que MAsp reproducía el espectro antiviral de M.a. se procedió a realizar ensayos de orientación destinados a conocer la naturaleza química del principio activo desarrollando para ello un método de purificación apropiado.

3.3. Caracterización parcial del extracto de Melia azedarach L.

En esta parte del trabajo de tesis la mayoría de los experimentos se realizaron con los extractos M.a. y MAsp.

Cuadro 25: Efecto del extracto MAsp sobre la multiplicación viral.

Virus	Control UFP/ml	Tratado	Inhibición %
Sindbis*	$4,2 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	92,4
Pichindé**	$1,5 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	86
Tacaribe**	$4,0 \times 10^4$	< 5	99,99
Junín**	$2,3 \times 10^4$	$5,2 \times 10^3$	77
Herpes**	$1,7 \times 10^5$	< 5	99,99
VSV***	$1,3 \times 10^8$	$8,0 \times 10^6$	94
		UHA/ml	
NDV***	100	1	99
	32	1	97

* Ensayo realizado en células BHK.

** Ensayo realizado en células Vero.

*** Se determinó el título hemoaglutinante en huevos embri_o nados de 10 días de desarrollo.

En todos los casos la concentración de MAsp fué de 10 mgr de peso seco/ml, este se agregó después de la adsorción vi ral, salvo en el caso de NDV en que los huevos embrionados fueron pretratados en cavidad alantoidea por 24 horas con el extracto.

3.3.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto.

3.3.1.1. Efecto del autoclavado.

Los extractos MAsp y M.a. se autoclavaron 20 minutos a 120°C y 1 atm. de presión. Se ensayó luego su efecto sobre la multiplicación del virus Tacaribe (Cuadro 26). Este tratamiento destruyó por completo la actividad antiviral de los extractos.

3.3.1.2. Efecto del calentamiento.

Los extractos MAsp y M.a. se calentaron a 60°C durante 1 hora y luego se probó la acción de los mismos sobre la multiplicación de VSV (Cuadro 27). Con este tratamiento los extractos retuvieron su actividad.

3.3.2. Tratamiento con proteasas.

3.3.2.1. Efecto de la tripsina sobre la actividad del extracto.

Para tratar de caracterizar el principio activo extracto se lo trató con tripsina en dos concentraciones diferentes: 0,25% y 1% durante 1 hora a 37°C. Luego se realizó una dilución con MM y se probó su actividad contra los distintos virus. En el Cuadro 28 se observa que la concentración de tripsina de 1% inactiva completamente al extracto ya que pierde su actividad frente a los virus VSV, Polio y Herpes. Estos experimentos señalan que por lo menos una entidad de naturaleza polipeptídica estaría involucrada en la actividad antiviral. Los ensayos realizados

Cuadro 26: Efecto del autoclavado sobre la actividad del extracto.

Virus	Control	Tratado	Inhibición
		UFP/ml	%
Tacaribe	$2,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$ (MAsp)	93,5
	$2,3 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$ (MAsp autoclav.)	4,4
Tacaribe	$2,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5$ (M.a.)	95,7
	$2,3 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$ (M.a. autoclav.)	4,4

Se infectaron células Vero con una m.o.i. = 1 de virus Tacaribe. Luego de la hora de adsorción se cubrieron con MM (control) ó con MM adicionado de MAsp (concentración final 10 mgr/ml) ó con MM adicionado de M.a. (concentración final 0,05 mgr/ml) ó de los respectivos extractos autoclavados 20 min. a 120°C y 1 atm. de presión.

Cuadro 27: Efecto del calentamiento sobre la actividad extracto.

Virus	Control UFP/ml	Tratado	Inhibición %
VSV	$2,2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$ (M.a.)	89
	$2,2 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$ (M.a. calentado)	85,5
VSV	$1,8 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$ (MAsp)	90
	$1,8 \times 10^7$	$2,0 \times 10^6$ (MAsp calentado)	88,9

Se infectaron células Vero con una m.o.i. = 1 de virus VSV. Luego de la hora de adsorción se cubrieron con MM (control) ó con MM adicionado de M.a. (concentración final 0,05 mgr/ml) ó con MM adicionado de MAsp (concentración final 10 mgr/ml) ó de los respectivos extractos calentados 1 hora a 60°C.

Cuadro 28: Efecto del extracto de M.a. tratado con tripsina sobre la multiplicación viral.

Virus	Control UFP/ml	Tratado	Inhibición %
VSV	$2,2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$	89
	$2,2 \times 10^7$	$3,6 \times 10^6$ (a)	84
	$6,2 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$ (b)	0
Polio	$1,5 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	73,4
	$1,5 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$ (b)	0
Herpes	$7,9 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	97,5
	$7,9 \times 10^3$	$7,6 \times 10^3$ (b)	0

(a) Concentración de tripsina 0,25%.

(b) Concentración de tripsina 1%.

En todos los casos se usó el extracto M.a. ó M.a. tratado con tripsina concentración final 0,05 mgr/ml.

sometiendo los extractos a distintas temperaturas también apoyarían esta hipótesis.

3.3.3. Tratamiento del extracto MAsp con ácidos y álcalis.

Los resultados se encuentran en el Cuadro 29. De él se deduce que el extracto pierde su actividad cuando es sometido a condiciones extremas de pH.

3.4. Purificación parcial del principio activo.

3.4.1. Filtración de MAsp por columna de Sephadex G-25.

La filtración por gel de Sephadex G-25 se realizó tal como se explicó en la sección 6.2.4. de Materiales y Métodos, con el objeto de desalar la muestra y obtener un extracto parcialmente purificado. La concentración utilizada para ensayar la actividad antiviral fué de 5 mgr de peso seco/ml. El percolado resultó altamente activo contra los virus Sindbis, Herpes y VSV (Cuadro 30) indicando que el principio activo de MAsp queda excluido del gel. De este comportamiento podemos concluir que se trata de una sustancia de peso mayor o igual a 5.000.

3.4.2. Precipitación fraccionada del extracto con sulfato de amonio.

Basandonos en los resultados obtenidos en las secciones anteriores y considerando la probable naturaleza polipeptídica del principio activo se sometió al MAsp a una precipitación fraccionada con sulfato de amonio sólido

Cuadro 29: Efecto del tratamiento del extracto de MAsp con ácidos y con álcalis sobre la actividad antiviral.

Tratamiento	Rendimiento viral UFP/ml	Inhibición %
Control	8,4 x 10 ⁶	0
Ninguno	7,8 x 10 ⁵	90,8
pH = 2	8,2 x 10 ⁶	0
pH = 10	8,0 x 10 ⁶	0

Se probó la acción antiviral de los distintos tratamientos sobre la infectividad del virus VSV en células L₉₂₉. Para llevar el extracto a pH = 2, se trataron 2 ml de MAsp concentración 100 mgr/ml con HCl 1 N y para pH = 10 con HONa 1 N. Los extractos fueron llevados luego a pH = 7 para probar su actividad antiviral.

Cuadro 30: Efecto del filtrado de MAsp por columna de Sephadex G-25 sobre la actividad antiviral.

Virus	Control	Tratado	Inhibición
	UFP/ml		%
Sindbis	$5,4 \times 10^7$	$8,0 \times 10^6$	85,2
	$2,2 \times 10^7$	$1,8 \times 10^6$ (G-25)	91,8
Herpes	$3,1 \times 10^3$	< 5	99,99
	$3,1 \times 10^3$	< 5 (G-25)	99,99
VSV	$2,7 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$	66,7
	$2,7 \times 10^6$	$7,0 \times 10^5$ (G-25)	74

Se utilizaron células Vero para los virus VSV y Herpes y células BHK-21 para el virus Sindbis de 24 horas, las que se infectaron con una m.o.i. de 1. Después de la hora de adsorción las monocapas se cubrieron con MM (control) ó con MM adicionado de 10 mgr/ml de MAsp ó de MM adicionado de 5 mgr/ml de MAsp pasado por Sephadex G-25 (se utilizó el percolado). A las 24 horas se cosecharon los sobrenadantes que se titularon por el método de placas.

tal como se explicó en Materiales y Métodos sección 6.2.3.

Las precipitaciones se realizaron entre 0-30%, 30-60% y 60-100% de saturación. Los precipitados obtenidos fueron resuspendidos en 1 ml de buffer fosfato 20 mM y dializados contra el mismo buffer, finalmente se diluyeron al décimo del volumen original de cada una de las fracciones. Dichas diluciones se utilizaron para probar su actividad antiviral en el sistema virus Sindbis-células BHK-21. Como control positivo se utilizó MAsp dializado y diluido de igual manera que las fracciones. Los resultados se encuentran en el Cuadro 31, de los datos obtenidos se deduce que la fracción más activa es la que precipita al 30-60% de saturación aunque no se pueden descartar las otras fracciones. La actividad del sobrenadante resulta despreciable.

3.5. Conclusiones.

Los experimentos realizados en esta parte del trabajo de Tesis nos llevaron a deducir las siguientes propiedades del extracto:

- No sedimenta por centrifugación a 100.000 xg (ver Materiales y Métodos sección 6.2.2.).
- No es dializable.
- Es excluido del Sephadex G-25.
- Precipita con alcohol absoluto 2:1 (Ver Materiales y Métodos sección 6.2.2.).

Cuadro 31: Precipitación fraccionada con sulfato de amonio del extracto MAsp.

Tratamiento	Rendimiento viral UFP/ml	Inhibición %
Control	$6,3 \times 10^8$	-
Diálisis (fracción no dializable)	$2,3 \times 10^7$	96,4
Precipitación con Sulfato de amonio:		
0 - 30%	$1,2 \times 10^8$	80,3
30 - 60%	$4,0 \times 10^7$	93,7
60 - 100%	$1,3 \times 10^8$	79,1
Sobrenadante	$1,9 \times 10^8$	69,9

Se probó la actividad antiviral de las distintas fracciones sobre la multiplicación del virus Sindbis en células BHK-21. Las muestras en ensayo se agregaron luego de la adsorción viral, utilizando una dilución 1:10 del volumen original de cada una de las fracciones.

- Precipita con sulfato de amonio fracción de mayor actividad entre 30-60% de saturación.
- Sensible al tratamiento con tripsina.
- Resistente al calentamiento a 60°C 1 hora.
- Sensible al autoclavado 20 min. a 120°C y a 1 atm. de presión.
- Se inactiva a pH ácido y alcalino extremos.
- La citotoxicidad varía con la línea celular utilizada.
- Acción antiviral de amplio espectro.
- No tóxico para ratones lactantes y adultos.
- Toxicidad moderada para huevos embrionados.
- En distintos estados de purificación presenta el mismo espectro de actividad antiviral.

Los resultados sugieren que el principio activo estaría constituido por uno o varios polipéptidos de peso molecular mayor que 5.000, sin descarta su asociación con hidratos de carbono o lípidos.

P a r t e I V .

M O D O D E A C C I O N :

P A S O D E L A R E P L I C A C I O N V I R A L A F E C T A D O
P O R L A A C C I O N D E M E L I A A Z E D A R A C H L .

En esta parte del trabajo de Tesis, se detallan los experimentos realizados para determinar cual era la etapa de la replicación viral afectada por el inhibidor obtenido de Melia azedarach L. Para ello se eligió el sistema virus Sindbis -células BHK-21. Los alfavirus, Sindbis y Semliki Forest, multiplican en diversas líneas celulares, como ser BHK-21, cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo y también en células de mosquito. Son virus a RNA de cadena positiva, cuyos genomas tienen un PM de $4 - 4,5 \times 10^6$ y un coeficiente de sedimentación de 49 S.

Para la replicación el RNA parental 49 S de cadena positiva, se debe transcribir en una cadena negativa complementaria que sirve como templado para la síntesis de la cadena positiva 49 S y para el mRNA subgenómico de 26 S. Este último es traducido a proteínas estructurales del virus (126). La nucleocápside es ensamblada en el citoplasma y el virus brota a través de la membrana plasmática de la célula huésped adquiriendo una envoltura lipoprotéica que contiene sólo las glicoproteínas codificadas por el virus.

El virus Sindbis tiene dos glicoproteínas de superficie que están involucradas en la adsorción a células, la E_1 (PM 45-50 K) y la E_2 (PM 52-59 K).

Este virus resulta ideal para el estudio de sustancias con actividad antiviral, ya que el período de latencia del mismo en células BHK-21 es de 3 - 4 horas, alcanzando su producción máxima antes de las 24 horas, y además porque la mayor parte de sus eventos intracelulares en una infección

lítica estan caracterizados. En esta parte del trabajo se utilizó el extracto acuoso de hojas verdes de Melia azedarach L (MA), ya que estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que es más activo que el de raíz y parte aérea seca (Andrei, G.M. comunicación personal) y porque el material se puede obtener con mayor facilidad. Este extracto se preparó tal como se indicó en materiales y métodos sección 6.3.2. Para ello se procedió a procesar una gran cantidad de hojas provenientes de árboles de la ciudad de Buenos Aires obteniéndose un "batch" que se caracterizó y purificó parcialmente antes de establecer el mecanismo de acción antiviral de su principio activo.

4.1. Acción del extracto de MA sobre la multiplicación viral.

La presencia del inhibidor en hojas y ramas secas ya se había demostrado en la sección 3.2. de resultados. En el Cuadro 32 se presenta la actividad antiviral del extracto de MA (preparado a partir de hojas verdes y frescas). Se puede apreciar que inhibe a los virus en ensayo (Junín, VSV, Sindbis) en 1 a 3 logaritmos en su infectividad. A partir de este stock de MA con actividad antiviral confirmada se procedió a su purificación y al seguimiento de su actividad antiviral en los distintos pasos de la purificación.

Cuadro 32: Efecto del extracto de MA (hojas verdes) sobre la multiplicación viral.

Virus	Control	Tratado	Inhibición
	UFP/ml		%
VSV**	2,6 x 10 ⁷	1,8 x 10 ⁴	99,94
Sindbis*	1,5 x 10 ⁷	9,0 x 10 ⁵	94
Junín **	1,2 x 10 ⁴	1,2 x 10 ³	90

* Ensayo realizado en células BHK.

** Ensayo realizado en células Vero.

Concentración del extracto de MA utilizada: 1/20 de So que corresponde a 0,3 mgr/ml de proteínas medida por el método de Bradford (30). El extracto se agregó después de la adsorción viral.

4.2. Efecto del extracto de MA en distintos estados de purificación sobre la multiplicación del virus Sindbis.

En el Cuadro 33 se muestra la actividad antiviral relativa del material obtenido en cada paso de la purificación.

Considerando que el contenido proteico de la fracción So fué 6 mgr/ml, medido por el método de Bradford (30), y la DE_{100} (dilución que produce una disminución del número de placas del 100%) correspondiente es de 1:160 se puede calcular la actividad específica (AE), como el cociente entre la DE_{100} y la concentración de proteínas en mgr/ml, lo que dá un valor de 26,6. Mientras que para la mezcla de fracciones F11, 12, 13 la concentración de proteínas fué de 0,1 mgr/ml y la DE_{100} de 10 por lo que la AE resultó ser 100. En consecuencia el principio activo se ha purificado ya que la actividad específica de F11, 12, 13 es aproximadamente 4 veces mayor que la del extracto crudo (So).

En los experimentos siguientes tendientes a determinar la etapa de la replicación viral afectada por el principio activo de M. azedarach L se utilizó la mezcla de fracciones F11, 12, 13 diluída 1:5, lo que corresponde a una concentración protéica de 0,02 mgr/ml y que se denominó MA.

Cuadro 33: Acción antiviral del So, S₁ y mezcla F(11, 12, 13) eluidas del Sephadex G-100 sobre la multiplicación del virus Sindbis en células BHK-21.

Extracto	número de placas/monocapa							sin extracto
	diluciones usadas							
	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	
So	0	0	0	0	0	0	64	80
S ₁	0	0	0	0	0	64	65	64
F(11,12,13)	0	0	11	30	36	44	NH	44

NH: Significa no hecho.

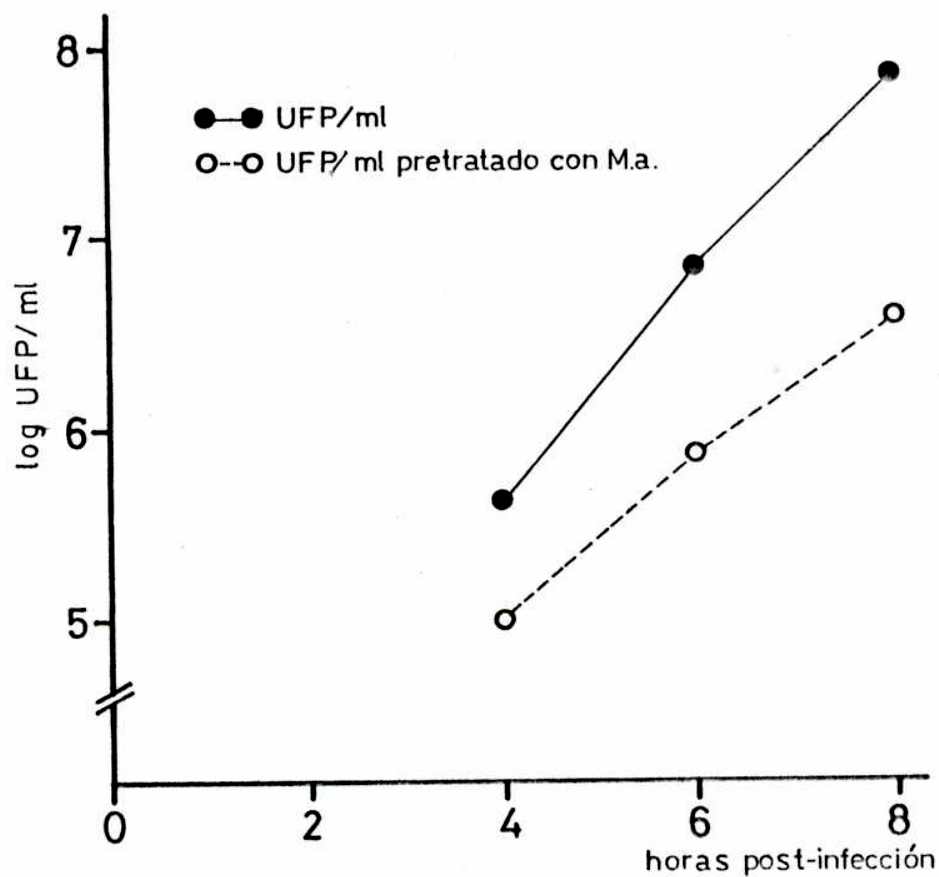
Las distintas diluciones de los extractos se agregaron después de la adsorción viral junto con la mezcla nutritiva.

4.3. Inhibición de la replicación del virus Sindbis por MA cuando éste multiplica bajo condiciones de un sólo ciclo.

En los experimentos anteriores los sobrenadantes de las células infectadas con el virus Sindbis se cosecharon a las 18 horas p.i., cuando ya han ocurrido varios ciclos de multiplicación (126). En este experimento se quiso determinar el efecto de MA sobre el virus Sindbis cuando este multiplicaba bajo condiciones de un sólo ciclo, para poder luego estudiar la acción de MA en las distintas etapas de la replicación. Para ello las células BHK fueron incubadas 2 horas con MA, luego lavadas e infectadas con virus Sindbis a una m.i. de 10; después de la hora de adsorción se cubrieron con MM. A distintos tiempos post-infección se cosecharon los sobrenadantes (virus extracelular) que se titularon para determinar virus infeccioso.

Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 5 donde se observa que un título de virus significativo se detecta a las 4 horas p.i. y luego hay un aumento logarítmico en la producción viral con un máximo de 10^8 en los cultivos controles, mientras que en los tratados hay una inhibición del 94% a las 8 horas p.i. Este valor es semejante al obtenido cuando los sobrenadantes se cosechan a las 18 horas p.i. (Cuadro 32).

Figura 5: Acción de MA sobre la curva de crecimiento del virus Sindbis en células BHK-21.



Células pretratadas con MA durante 2 horas y controles se infectaron con virus Sindbis ($mi=10$). A los tiempos indicados se cosecharon los sobrenadantes que se titularon por el método de placas.

4.4. Efecto de MA agregado a distintos tiempos p.i. sobre la replicación del virus Sindbis.

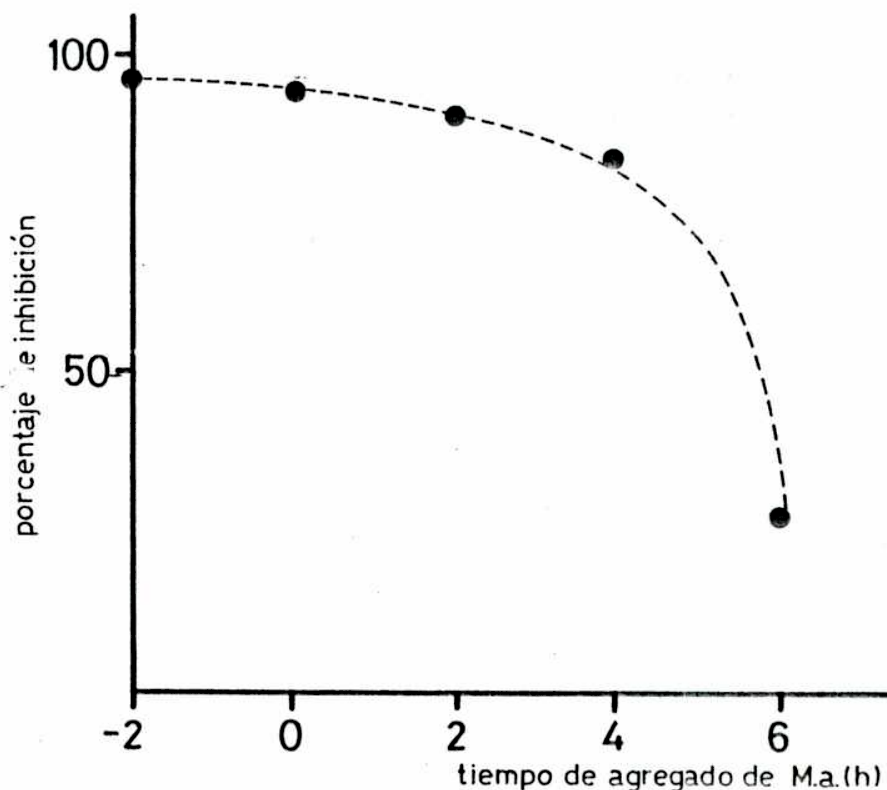
Para determinar si MA era capaz de inhibir la replicación viral durante una de las etapas identificables dentro del ciclo del virus, el extracto fue agregado a distintos tiempos antes y después de la adsorción viral. En todos los casos la incubación, en presencia de MA, se continuó hasta las 7 horas post-adsorción. A dicho tiempo se midió la producción de virus infeccioso en los sobrenadantes.

Los resultados obtenidos se graficaron en la Figura 6, de los mismos se deduce que la inhibición de la producción viral fué máxima cuando las células fueron pretratadas con MA por 2 horas o cuando MA se agregaba hasta las 2 horas post-infección. Sin embargo a las 4 horas p.i. el agregado de MA produjo una inhibición del 85%. De acuerdo con la curva de un sólo ciclo (Figura 5) se puede inferir que MA actúa preferencialmente en la etapa temprana de la replicación probablemente adsorción, penetración o transcripción temprana.

4.5. Efecto de MA sobre la adsorción y penetración del virus Sindbis a células BHK-21.

Debido a que la inhibición de la replicación era más efectiva cuando el extracto se agregaba hasta las 2 horas p.i., se trató de determinar si el extracto afec

Figura 6: Inhibición de la multiplicación del virus Sindbis cuando MA es agregado a distintos tiempos antes y después de la infección.



Las células BHK-21 se pretrataron 2 horas con MA ó previamente se infectaron con virus Sindbis (m.i.=1) y a distintos tiempos p.i. (2,4,6 horas) se trataron con el extracto. A las 7 horas p.i. se cosecharon los sobrenadantes que se titularon por el método de placas. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de los cultivos tratados con respecto al control (título del control: $1,5 \times 10^7$ UFP/ml).

taba la adsorción viral a 4°C. Para ello se utilizaron células pretratadas y controles que se infectaron con una m.i. de 1. Después de 1 hora de adsorción se cosecharon los inóculos y se lavaron las monocapas 2 veces con PBS. se determinó la infectividad remanente en los inóculos y lavados de los cultivos tratados y controles la que resultó muy semejante en ambos casos (Cuadro 34) indicando que la adsorción ocurre normalmente en presencia del extracto.

Debido a que aparentemente la etapa más afectada por MA es temprana se quizo estudiar la influencia del extracto sobre la penetración viral determinando en función del tiempo el número de centros infecciosos no neutralizables por inmunosuero anti-Sindbis.

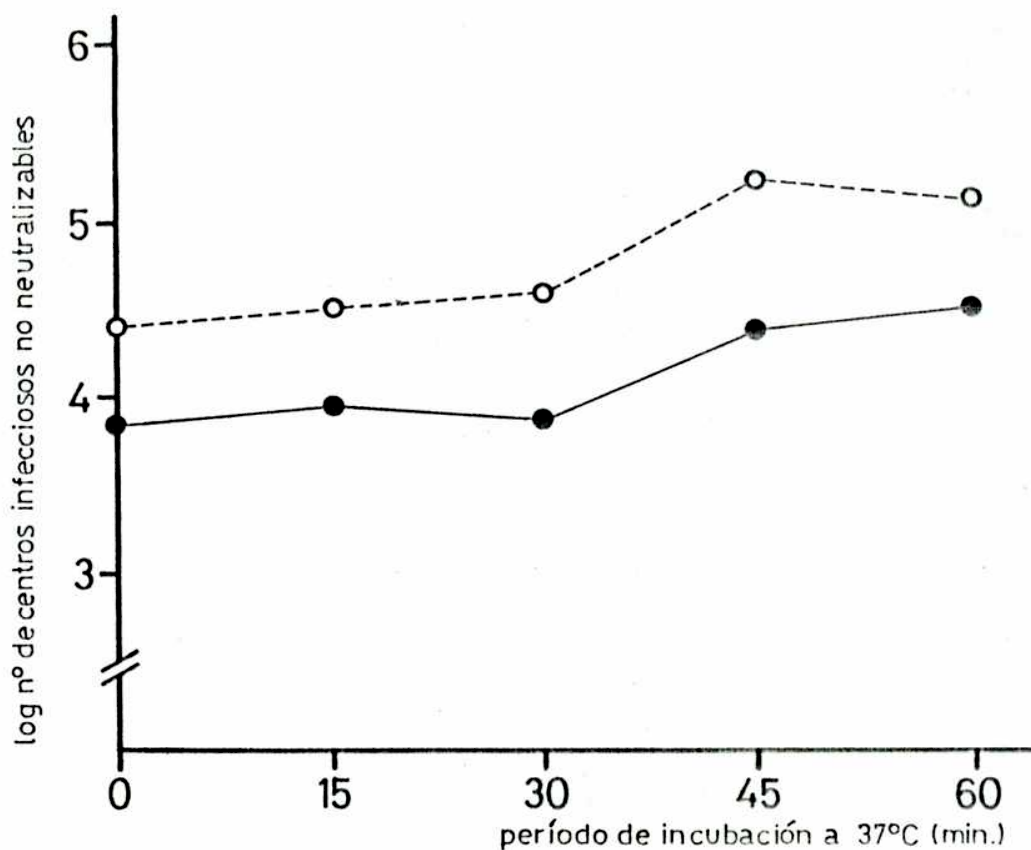
Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 7, donde cada valor representa el promedio de 3 experimentos idénticos. Se puede ver que a todos los tiempos ensayados el tratamiento con MA produce una reducción del número de centros infecciosos en 0,6 a 0,9 logaritmos, pero que la cinética de aumento de centros infecciosos no neutralizables es casi idéntica en las células tratadas y controles. Esto indicaría que la velocidad de penetración viral, medida por la incapacidad del anti-suero anti-Sindbis de neutralizar al virus adsorbido a la célula, no estaría afectada por el pretratamiento con el extracto.

Cuadro 34: Adsorción del virus Sindbis a células BHK-21 pretratadas con MA.

	Control	Tratadas
	UFP/ml	
V.N.A.	$1,1 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
1er. lavado	$2,8 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
2do. lavado	$1,1 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$

Las células BHK-21 fueron pretratadas con MA ó MM, luego se lavaron y se infectaron con el virus Sindbis (m.i.=1). Después de 1 hora de adsorción a 40C se cosecharon los inóculos y se lavaron 2 veces las monocapas con PBS. Los lavados también se cosecharon. Posteriormente se determinó el virus no adsorbido.(V.N.A.).

Figura 7: Efecto de MA sobre la penetración del virus Sindbis.



El virus Sindbis se adsorbió, por 30 minutos a 4°C, a células BHK-21 pretratadas durante 2 horas con MM (O-O) o con MA (●-●). Las monocapas se cubrieron con MM y se incubaron a 37°C. El número de centros infecciosos no neutralizables por inmunosuero se determinó por el agregado al medio de cultivo de suero anti-Sindbis (dilución final 1:10), a intervalos de 15 min., y los cultivos se incubaron otros 30 minutos a 37°C. Posteriormente las células se tripsinaron y se ensayaron para determinar centros infecciosos.

4.6. Efecto del extracto de MA sobre la síntesis del RNA viral.

Como se vió anteriormente, en el sistema virus Sindbis-células BHK-21 aparentemente la adsorción y penetración viral no estaban afectadas por el extracto, como paso siguiente se trató de determinar cual era el efecto de MA sobre la síntesis del RNA y proteínas.

En primer lugar se determinó si MA afectaba la síntesis de las macromoléculas celulares, en este caso RNA.

Los resultados volcados en el Cuadro 35 muestran que no existe una diferencia significativa en la incorporación de $^3\text{(H)}$ -uridina en células pretratadas con MA en comparación con los controles e independientemente de la presencia de actinomicina D (Experimento A). Es necesario trabajar con actinomicina D porque el virus Sindbis no produce inhibición de la síntesis de las macromoléculas celulares durante los primeros estadios de la infección (110). La falta de acción de MA sobre la síntesis del RNA celular se confirma en el experimento B en que después de una incubación de 8 horas los niveles de incorporación son similares a las células controles.

Una vez que se constató que el extracto de MA no afectaba al RNA celular, se determinó la cinética de incorporación de $^3\text{(H)}$ -uridina en el RNA de células controles e infectadas con el virus Sindbis, en presencia de actinomicina D, tal como se explicó en materiales y métog

Cuadro 35: Efecto de MA sobre la síntesis del RNA celular.

Tiempo de incubación con MA (h)	Actinomicina D	Incorporación de Uridina (³ H) cpm
Experimento A*		
0	+	521
2	+	459
Experimento B**		
0	-	8102
8	-	10548

* Cultivos celulares fueron incubados con MA durante 2 horas, luego fueron lavados, se agregó medio sin suero y una hora más tarde se agregó Actinomicina D 2,5 µg/ml. Después de 60 minutos se marcaron con 1 µCi/ml de ³(H)-uridina se midió la incorporación como se describió en Materiales y Métodos.

** Monocapas celulares fueron incubadas con MA durante 8 horas, luego se lavaron con PBS y se agregó medio sin suero conteniendo 1 µCi/ml de ³(H)-uridina por 2 horas. Los cultivos fueron procesados luego como en el Experimento A.

dos sección 15.2. Simultaneamente se determinó en cada punto el rendimiento viral. Los resultados obtenidos se encuentran en la Figura 8, en la misma se observa que entre las 2 y las 4 horas se produce un aumento muy pronunciado (5 veces) en la incorporación de $^3\text{(H)}$ -uridina en el RNA de células infectadas que se puede atribuir al RNA viral mientras que la síntesis de RNA es mínima y permanece constante en las células controles tratadas con actinomicina D. El pico máximo de síntesis de RNA viral (a las 4 horas) precede en el tiempo al de formación de partículas virales (a las 8 horas). Posteriormente se trató de establecer de que manera MA afectaba al RNA viral, para ello se infectaron células controles y pretratadas siempre en presencia de actinomicina D.

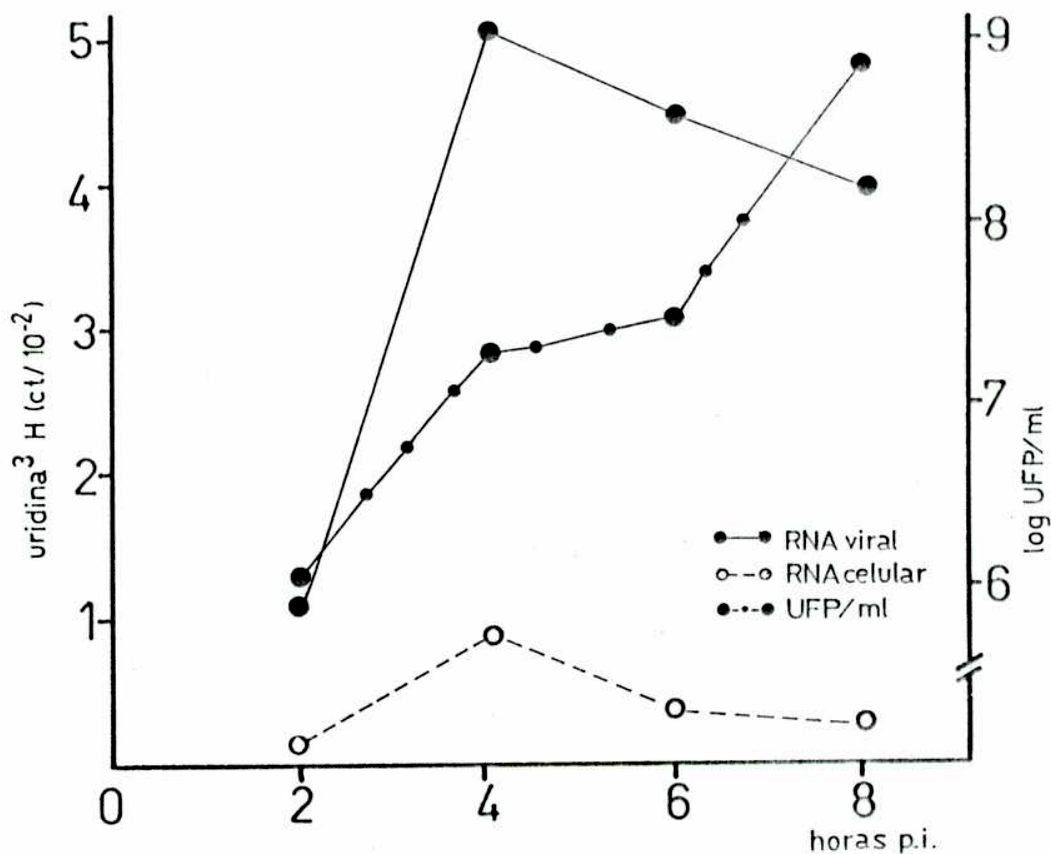
Los resultados se presentan en la Figura 9 donde se observa que entre las 2 y las 4 horas hay un aumento de 4 veces en la incorporación de marca en el RNA, mientras que este es despreciable en las células pretratadas con MA.

Concomitantemente se produce a las 8 horas p.i. una disminución del rendimiento viral del 93%, que no resulta tan espectacular si la comparamos con la inhibición que se produce en la síntesis del RNA.

4.7. Efecto de MA sobre la síntesis de proteínas virales.

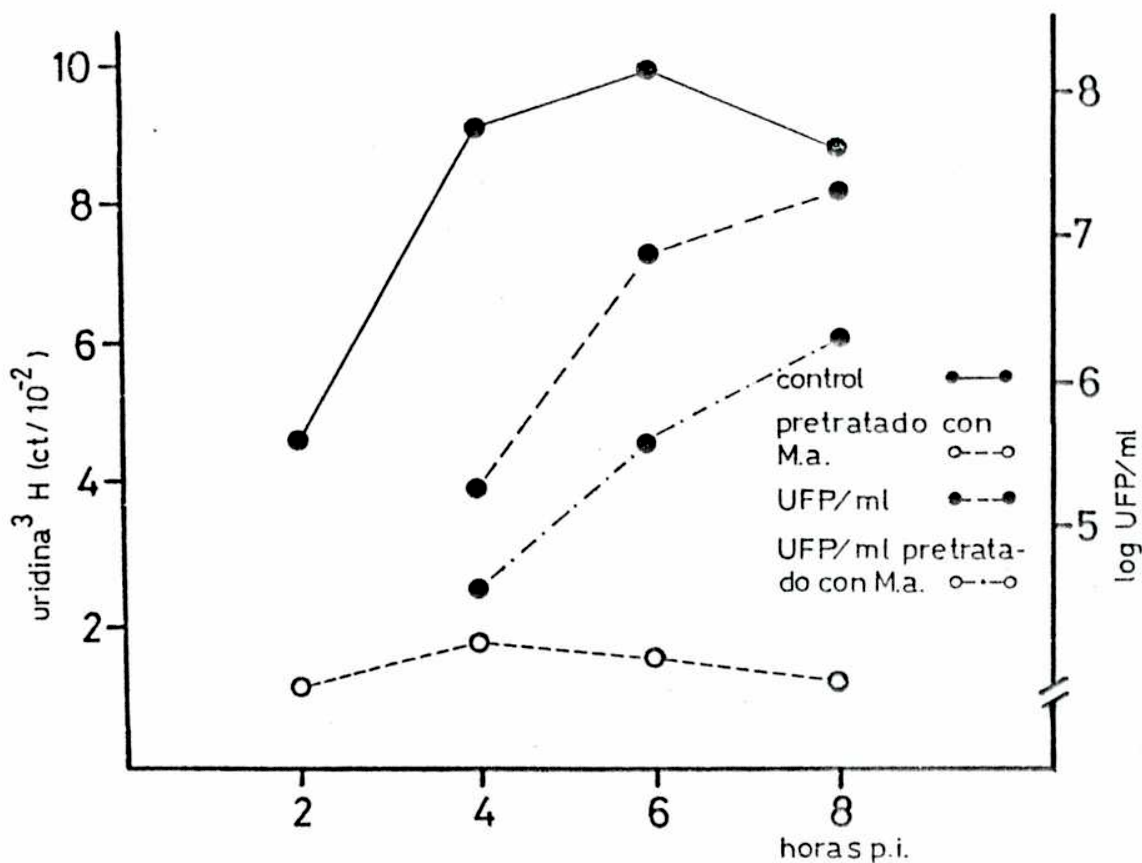
Al igual que en el caso anterior lo primero que se determinó fué el efecto de MA sobre la síntesis de proteínas celulares midiendo la incorporación de $^3\text{(H)}$ -leucina en células tratadas y controles. Los resultados obtenidos se encuentran en el

Figura 8: Cinética de incorporación de $^3\text{(H)}$ -uridina en el RNA de células controles e infectadas con virus Sindbis.



Células BHK-21 crecidas en viales de 5 ml controles o infectadas con virus Sindbis con una m.i. = 10 se marcaron a las 2, 4, 6 y 8 horas p.i. con 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{(H)}$ -uridina por 2 horas en presencia de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de actinomicina D. La incorporación se midió y se expresó en cpm/viral. Simultáneamente a los tiempos indicados se determinó la infectividad viral.

Figura 9: Efecto de MA sobre la síntesis del RNA viral.



Células BHK-21 crecidas en viales de 5 ml fueron pretratadas con MA o MM durante 2 horas. Luego se infectaron con virus Sindbis con una m.i.=10. A las 2, 4, 6, y 8 horas p.i. los cultivos se marcaron con 10 uCi/ml de ³(H)-uridina por 2 horas en presencia de 2,5 ug/ml de actinomicina D. La incorporación se midió y se expresó en cpm/vial. Simultáneamente a los tiempos indicados se determinó la infectividad en los cultivos tratados y controles.

Cuadro 36 y coinciden con los obtenidos para el RNA ya que no se observan diferencias en presencia de actinomicina D o después de una incubación más prolongada (8 horas).

Posteriormente se determinó la influencia de MA sobre la síntesis de proteínas en las células infectadas. Para ello se realizó una incorporación de ^{35}S -metionina y a las 7 horas los extractos celulares se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (ver Materiales y Métodos sección 17.2).

En la Figura 10 se observa que en las células infectadas con Sindbis aparece en comparación con las células normales una banda nítida que corresponde a la proteína C de la cápside (PM 30K), una banda ancha y difusa que corresponde a PE_2 (precursor de la proteína de envoltura E_2) (PM60K) y E_1 (proteína de envoltura) (PM53K) que comigran bajo estas condiciones de corrida y una banda muy ténue en la región de E_2 (PM49K), mientras que en las células pretratadas con MA e infectadas con Sindbis no se observa ninguna banda correspondiente a proteínas virales. Resultados similares se obtuvieron cuando las células infectadas se inmunoprecipitaron con antisuero anti-Sindbis (ver Materiales y Métodos sección 17.1.d.) y se corrieron en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS. En ambos casos aparentemente la síntesis de proteínas celulares no se inhibe con la infección ni es afectada por la presencia de MA como se deduce del Cuadro 36.

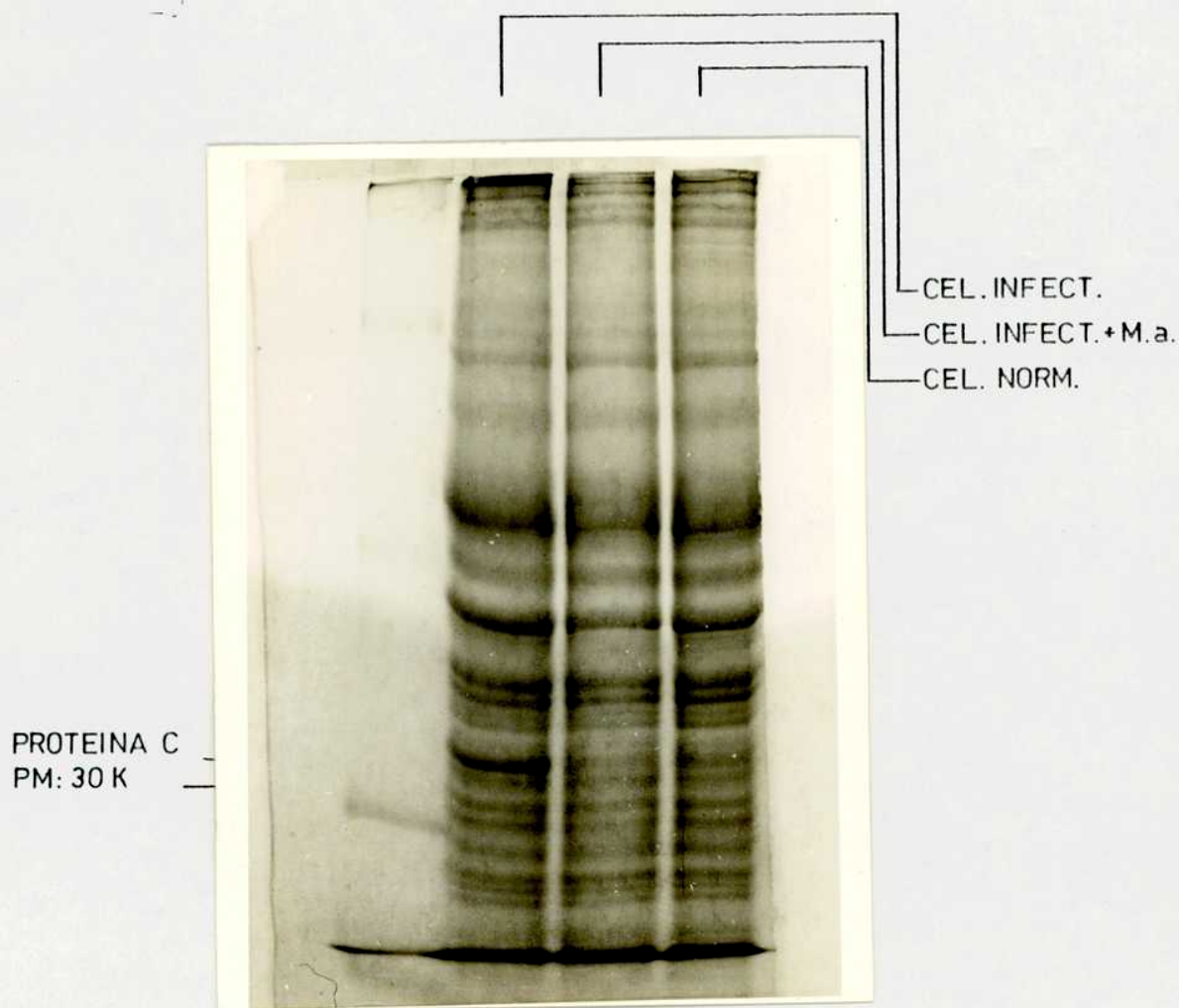
Cuadro 36: Efecto de MA sobre la síntesis de proteínas celulares.

Tiempo de incubación con MA (h)	Actinomicina D	Incorporación de leucina (^3H)
Experimento A*		
0	+	8369
2	+	11549
Experimento B**		
0	-	2763
8	-	2474

* Cultivos celulares fueron incubados con MA 2 h. luego fueron lavados, se agregó medio sin leucina y 1 h. más tarde se agregó Actinomicina D 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Después de 60 minutos, se marcaron 2 h. con 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{(H)}$ -leucina y la incorporación se midió como se describió en Materiales y Métodos.

** Monocapas celulares fueron incubadas con MA durante 8 horas, luego se lavaron con PBS y se agregó medio sin leucina conteniendo 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^3\text{(H)}$ -leucina por 2 horas. Los cultivos fueron procesados como en el Experimento A.

Figura 10: Efecto de MA sobre la síntesis de proteínas virales.



Electroforesis en gel de poliacrilamida de los polipéptidos de células BHK-21 marcadas con ^{35}S -metionina: infectadas con virus Sindbis (2da. calle), pretratadas 2 h. con MA e infectadas (3era. calle) y células controles (4ta. calle). La 1ra. calle corresponde a marcadores de peso molecular.

D I S C U S S I O N .

Las infecciones virales son difíciles de controlar debido a que los agentes infecciosos son totalmente dependientes de la célula huésped. Esta última característica ha contribuido a que el desarrollo de agentes antivirales adecuados para el tratamiento de las enfermedades de origen viral sea muy difícil.

Tal como se deduce de la lectura de la introducción de este trabajo de Tesis, solamente un número muy reducido de drogas se utilizan en clínica. Esto no es un impedimento para que continuamente se esten ensayando sustancias nuevas, muchas de las cuales posteriormente serán usadas unicamente para obtener mayor información sobre los distintos pasos de la replicación viral u otros pasos metabólicos ya que resultan muy tóxicas para la célula huésped. Como ha ocurrido frecuentemente, frente a este panorama poco alentador aparecía como una meta de investigación incierta abocarse al estudio de antivirales. Sin embargo el objetivo en sí, identificar una sustancia no tóxica para las células pero eficaz contra los virus, merecía todo esfuerzo. La posibilidad de concretar una búsqueda sistemática en plantas se pudo canalizar al producirse el ingreso de nuestro grupo a un programa conjunto con la cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la U.B.A. dirigida por el Dr. Ramón A. de Torres, en que en la misma muestra vegetal se estudiaba su potencial actividad antimicrobiana y/o antivirósica.

La selección de las especies no fué al azar, sino porque las mismas tenían como antecedente un uso en medicina

popular.

En general se utilizó para la búsqueda de actividad antiviral una técnica sistemática que comprendió dos fases:

- 1) Determinación de citotoxicidad.
- 2) Acción frente a un amplio espectro de virus con la concentración no citotóxica.

Durante el desarrollo de este trabajo se han analizado muestras de distintas especies de plantas superiores pertenecientes a las familias: Compositae, Euforbiaceae y Meliaceae y extractos del alga Coelastrum proboscideum var. dilatatum cuyo habitat son las aguas dulces. Los resultados obtenidos mostraron que si bien estos extractos del alga contenían una actividad antiviral de amplio espectro, sería necesario determinar la naturaleza del principio activo ya que aparentemente la concentración del mismo disminuye al envejecer el cultivo. Se conocen otros extractos de algas de aguas dulces como los de Scenedesmus quadricauda, Chlorella vulgaris y Anabaena variabilis capaces de inhibir a una serie de RNA virus (143), pero nada se conoce acerca de la naturaleza del producto antiviral.

Dada la posibilidad de obtener cultivos en masa resultaría de mucho interés poder aislar los principios activos y establecer si tienen características comunes con el de C. proboscideum.

En cuanto a la búsqueda de actividad antiviral en los extractos de plantas superiores, de los resultados presenta

dos en los cuadros 12, 13, 14, 15, 16 y 17 de la parte I se deduce que los más activos son los de la familia Meliaceae (M. azedarach, C. tubiflora y T. glabra), mientras que los extractos de B. crispa y B. notoserigila resultaron ser activos solamente sobre el virus V.S.V. De la observación de los patrones de replicación frente a los distintos extractos se puede deducir que el V.S.V., si bien es un virus fácil de trabajar, no siempre es buen indicador, ya que aparece como muy lábil. En cambio el virus aftoso (cepa O₁ Caseros) es muy resistente y escapa a cualquier acción antiviral. Dada la interesante actividad antiviral de los miembros de la familia Meliaceae, suspendimos el programa de búsqueda sistemática para dedicarnos al análisis de uno de los extractos.

Una búsqueda bibliográfica señaló, a esa altura de las investigaciones que existía sólo una publicación sobre el tema. La de Bhakuni D.S. y col.(27) que en un trabajo de búsqueda de actividad antiviral en plantas de la India encontraron que el extracto hidroalcohólico de M. azedarach(el árbol del paraíso es oriundo de la India), inhibía la multiplicación del virus NDV.

Puesto que el paraíso es un árbol que se encuentra frecuentemente en parques y calles de nuestra ciudad, se lo eligió por la posibilidad de fácil acceso, para estudiar la naturaleza del principio activo y su modo de acción.

Algunas características del extracto de MA tales como el amplio espectro antiviral, su capacidad para inducir un

estado refractario a la infección en distintos sistemas celulares (Cuadro 23) y el hecho de que no es virucida (Cuadro 21) son propiedades que recuerdan a las descritas para el interferón producido por células animales (121). Si bien el principio activo no ha sido aislado puro en este trabajo, los datos obtenidos (Cuadros 26, 27, 28, 29, 30 y 31) señalan que se trataría de uno o varios polipéptidos de peso molecular mayor que 5000 sin que se pueda descartar la presencia de hidratos de carbono ó lípidos como formando parte del mismo. Sin embargo los ensayos enzimáticos sugieren que el principio bioactivo de la molécula reside con seguridad en la integridad de la unión peptídica. De aquí resulta entonces otra semejanza con el interferón, aunque sabemos que en este último caso se trata de glicoproteínas (interferón α y β) y de proteínas cuyo peso molecular es mucho mayor: entre 15 y 38.000 D (121).

Aparentemente MA no penetraría a las células (7) sino que dispararía la síntesis de un mensajero celular puesto que su efecto se revierte parcialmente en presencia de actinomicina D (4). Por lo tanto es posible que este mensajero codifique para una proteína responsable de la resistencia a la infección viral. Cuando se trató de determinar las características de este estado antiviral inducido en las células vimos que el tiempo mínimo de pretratamiento con MA era de 2 horas (Figura 3) y su duración bastante prolongada ya que hasta las 24 horas después de lavado el extracto existía aún una inhibición del 60% en la replicación viral (Cuadro 25). Estos

resultados coinciden con los obtenidos con ciertos inductores de interferón (139). Todos estos datos tomados en conjunto llevaron a la hipótesis que MA podría ser un inductor de interferón. Sin embargo cuando se quiso determinar si existía el pasaje de una segunda sustancia antiviral al medio de cultivo tal como sucedía con el sistema interferón se encontró que ésto no ocurría (Cuadro 24), aunque descubrimos que los sobrenadantes de las células no tratadas inhibían la multiplicación viral. Esta inhibición no es marcada pero sí repetida.

Nuestros resultados concuerdan en este caso con los de Baron S. y col., que demuestran que diferentes tipos de cultivos celulares producen espontaneamente un inhibidor extracelular de amplio espectro (20). También están de acuerdo con los datos presentados por Babbar O. y col. (13),(12) que encontraron que extractos crudos de Melia azedarach, Pinus longifolia, Beberis asiática, Cleitanthus callinus y Cassia fistula poseían actividad antiviral semejante al interferón cuando se ensayaron frente a los virus Vaccinia y NDV.

Más recientemente, se descubrió que las plantas superiores pueden producir sustancias tipo interferón en respuesta a una infección viral, ya que éstas carecen de los mecanismos inmunes que poseen los animales superiores, pero no se sabe si éstas son análogas a la proteína antiviral que es inducida por el interferón en las células animales (38).

Debido a que la sustancia antiviral no era secretada al medio extracelular se pudo concluir de nuestros experi-

mentos que el efecto antiviral ocurre intracelularmente y que MA actuaría por un mecanismo diferente al del interferón, conclusión que se podía inferir del hecho biológico de que MA induce un estado refractario a la infección en células Vero que son no productoras de interferón.

Experimentos realizados recientemente en nuestro laboratorio demuestran fehacientemente que el extracto de Melia azedarach L no es inductor de interferón en ratones infectados con el virus Tacaribe ni en células tratadas in-vitro (Andrei, G.M. y col., comunicación personal). Se sabe que en las plantas existen muchos inhibidores de la infectividad de tipo protéico sin que medie infección viral ó inducción por algún otro agente biótico o abiótico (8), (139). Este es el caso de los inhibidores preformados al cual pertenecen las llamadas RIP'S (ribosome-inactivating proteins) (103), (18).

En nuestro caso, si bien no puede descartarse la presencia de virus o viroides latentes en las plantas de M. azedarach L utilizadas, es posible que nos encontremos frente a uno de estos inhibidores preformados, cuya función específica en la planta no se conoce, ya que extractos de diferentes partes de la planta macroscópicamente sanas, recolectadas en distintos parques de la ciudad de Buenos Aires, en épocas del año equivalentes poseen actividades antivirales semejantes (137), (136), (5).

Los ensayos de citotoxicidad realizados demuestran que el crecimiento celular no está afectado cuando el extracto se agrega a la monocapa celular ya formada o durante la

formación de la misma (ver Resultados sección 2.1); estos resultados concuerdan también con los realizados en nuestro laboratorio con extractos purificados de MA (5). La inocuidad de los extractos sobre las células sin infectar también se determinó estudiando la acción de MA sobre la síntesis de las macromoléculas celulares (Cuadros 35 y 36).

En base a estos resultados podemos concluir que la molécula activa de MA no puede ser considerada una RIP (103) ya que estas tienen en común un índice de toxicidad diferencial muy marcado contra células no infectadas e infectadas con virus, mientras que en nuestro caso el extracto no produce diferencias significativas.

Utilizamos el sistema virus Sindbis-células BHK-21, para tratar de determinar qué etapa del ciclo de replicación viral es afectada por el extracto de MA. Los resultados obtenidos sugieren que la adsorción viral no se afecta por la presencia de MA (Cuadro 34), en este caso podríamos postular que no se produce un bloqueo de receptores. En cuanto a la etapa de penetración se puede inferir que la cinética en células pretratadas y controles es prácticamente la misma (Figura 7) indicando que este paso de la replicación no es tampoco el blanco fundamental para la acción de MA. Sin embargo no pudimos explicar hasta el presente a que se debe la reducción en el número de centros infecciosos no neutralizables observada al comienzo de la infección en las células tratadas.

Como sabemos, el virus Sindbis no produce inhibición de la síntesis de las macromoléculas celulares durante los

primeros estadios de la infecci3n (110) por ello se requiere la presencia de actinomicina D para poder evidenciar el nivel de s3ntesis de RNA y prote3nas virales. Generalmente las c3lulas infectadas con alfavirus son pretratadas con actinomicina D y la droga permanece desde el comienzo hasta el final del ciclo infeccioso (110). En nuestro caso no se pudo trabajar en estas condiciones ya que como dijimos anteriormente la actinomicina D revierte parcialmente el estado antiviral inducido por MA (4) por ello la droga se agreg3 una vez que se ha establecido el estado refractario celular.

Si observamos la Figura 9, encontramos que se produce una inhibici3n clara y espec3fica de la s3ntesis del RNA viral lo que indica un efecto muy temprano del extracto sobre las funciones transcripcionales y replicativas del genoma del virus Sindbis.

En la Figura 10 tambi3n se observa que MA produce una inhibici3n de la s3ntesis de prote3nas virales, mientras que el perfil de los polip3ptidos celulares permanece inalterado.

En los alfavirus a las 2 horas p.i. ya se pueden detectar prote3nas virales (111) por lo tanto es posible que este extracto produzca una inhibici3n selectiva sobre la s3ntesis de las macromol3culas tempranas, pero es imposible asegurar si MA act3a como inhibidor transcripcional o traduccional. A las 4 horas p.i. practicamente todo el RNA viral ya est3 sintetizado (Figura 8) pero observamos que cuando agregamos el extracto a este tiempo se produce todav3a una inhibici3n de la producci3n viral del 85-90% (Figura 6). Podemos decir en-

tonces que la síntesis de proteínas virales es posiblemente el blanco principal de MA, pero no se puede descartar que opere un mecanismo de acción más complejo.

Todos los ensayos comentados hasta el presente, se han realizado in-vitro. Con el objeto de determinar si la actividad del extracto se conserva in-vivo, en nuestro laboratorio, se estudió la acción de extractos parcialmente purificados sobre la encefalitis letal que produce el virus Tacaribe en ratones neonatos. Se observó que MA ejercía un efecto protector que oscilaba entre el 66 y 100% dependiendo de la dosis (6). El principio activo de Melia azedarach L, aparentemente cumple con los requisitos de un buen antiviral ya que: no es virucida, no es tóxico para la célula huésped y actúa sobre un paso específico de la replicación, siendo activo a bajas concentraciones.

Aunque negado por muchos, parece que nos encontramos frente a una sustancia de origen vegetal con propiedades muy semejantes al interferón. La presencia de esta sustancia en hojas, raíces y tallos de árboles de Melia azedarach L oriundos de distintas zonas de Buenos Aires (Palermo, San Isidro), del Paraguay y también de la provincia de Misiones nos indica que probablemente no se trata de una respuesta a una agresión sino que es constitutiva de la planta.

En este momento se están llevando a cabo experimentos tendientes a purificar el principio activo (Andrei, G.M.).

Una vez que se logre la purificación de MA el paso siguiente será realizar formulaciones farmacéuticas con el mis

mo a las concentraciones no tóxicas en pomadas o cremas para tratamientos tópicos o su inclusión en liposomas como vehículo portador ya que sustancias de este tipo (peptídicas) no pueden administrarse oralmente a pacientes porque estas son degradadas por los jugos digestivos del huésped. En la actualidad se usa esta última técnica para administrar insulina oralmente, sin pérdida de su actividad biológica (96).

Como se dijo anteriormente el extracto de MA protege a ratones de la infección con virus Tacaribe, pero es necesario probar varios modelos para asegurar que MA no tenga otros efectos in-vivo, ya que el último paso en la búsqueda de un antiviral efectivo es que sea terapéuticamente útil para el tratamiento en animales y el hombre.

Existe una abundante literatura sobre las virtudes medicinales de las plantas y en la mayoría de las publicaciones Melia azedarach figura por sus propiedades antiparasitarias, antipiréticas y laxantes.

En esta Tesis le hemos otorgado base científica a la tradición oral y escrita sobre las virtudes de este árbol no autóctono pero arraigado en nuestro país.



B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA.

1. Accorinti, J. "Cultivo unialgal y masivo de Scenedesmus obliquus. Técnicas de obtención". Comun. Museo Arg. Cs. Nat. Bs. As. Cs. Bot. 1, 21-29 (1960).
2. Agarwal, J.S. and Rastogi, R.P. "Chemical constituents of Mappia foetida Miers". Indian J. Chem. 11, 969-972 (1973).
3. Anderson, L., Lidgren, G. and Bohlen, L. "Studies of swedish marine organism: 1-screening of biological activity". Acta Pharm. Suecia 20, 401-415 (1983).
4. Andrei, G.M., Coto, C.E. y de Torres, R.A. "Modo de acción del factor antiviral presente en extractos de Melia azedarach L". 8va. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Virología. Buenos Aires. 4-5 octubre (1984). Libro de res. pag. 11.
5. Andrei, G.M., Coto, C.E. and de Torres, R.A. "Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extractos crudos y semi-purificados de hojas verdes de Melia azedarach L". Rev. Arg. Microbiol. 17, 187-194 (1986).
6. Andrei, G.M., Lampuri, J.S., Coto, C.E. and de Torres, R. A. "An antiviral factor from Melia azedarach L prevents Tacaribe virus encephalitis in mice". Experientia 42, 843-845 (1986).
7. Andrei, G.M., Mersich, S.E., Damonte, E.B., Coto, C.E. y de Torres, R.A. "Interacción del factor antiviral de Melia azeda-

- lach L con la célula huésped". II Congreso Argentino de Virología. Córdoba 20-24 de octubre (1986) Libro de res. pag.P-66.
8. Antignus, Y., Sela, I., Harpaz, I. "Further studies on the biology of an antiviral factor from virus infected plants and its association with the N-gene of Nicotiana species". J. Gen. Virol. 35, 107-116 (1977).
 9. Apablaza, G.E., Bernier, C.C. "Inhibition of tobacco mosaic virus infection by plant extracts". Canad. J. Bot. 50, 1473-1478 (1972).
 10. Aron, G. M. and Irvin, J.D. "Inhibition of herpes simplex virus multiplication by the pokeweed antiviral protein". Antimicrob. Agents Chemother. 17, 1032-1033 (1980).
 11. Awasthi, L.P. "The purification and nature of an antiviral protein from Cuscuta reflexa plants". Arch. Virol. 70, 215-223 (1981).
 12. Babbar, O.P., Bajpai, S.K., Chowdhury, B.L. y Khan, S. "Occurrence of Interferon-like antiviral and antitumor factor (s) in extracts of some indigenous plants". Indian. J. Exp. Biol. 17: 451-454 (1979).
 13. Babbar, O.P., Chowdhury, B.L., Singh, M.P., Khan, S.K. and Bajpai, S. "Nature of antiviral activity detected in some plant extracts screened in cell cultures infected with Vaccinia and Ranikhet disease viruses". Indian. J. Exp. Biol. 8, 304-311 (1970).

14. Baglioni, C., Benveniste, S., Maroney, P.A., Minks, M.A., Nilsen, T.W. and West, D.K. "Interferon induced enzymes activation and role in the antiviral state". Ann. N.Y. Acad. Sci. 350, 497-509 (1980).
15. Ball, C.R., Van der Berg, H.W. and Poynter, R.W. "The measurement of radioactive precursor incorporation into small monolayer cultures". Methods in Cell Biology Vol XIII Chapter 18, 349-360. Ed. by D.M. Prescott Ac. Press N.Y. 1973.
16. Barbieri, L., Aron, G.M., Irvin, J.D. and Stirpe, F. "Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from seeds of Phytolacca americana". Biochem. J. 203, 55-59 (1982).
17. Barbieri, L., Lorenzoni, E. and Stirpe, F. "Inhibition of protein synthesis in vitro by a lectin from Momordica charantia and by other hemagglutinins". Biochem. J. 182, 633-635 (1979).
18. Barbieri, L. and Stirpe, F. "Ribosome-inactivating proteins from plants: Properties and possible uses". Cancer surveys 1, 489-520 (1982).
19. Barbieri, L., Zamboni, M., Lorenzoni, E., Montanaro, L., Sperti, S. and Stirpe, F. "Inhibition of protein synthesis in vitro by proteins from the seeds of Mormodica charantia (bitter pear melon)". Biochem. J. 186, 443-452 (1980).
20. Baron, S. and Mc Kerleic, M.L. "Broadly active inhibitor of viruses spontaneously produced by many cell types in culture". Infect. Immun. 32, 449- 453, (1981).

21. Bauer, D.J., St. Vicent, L., Kempec, H. and Downie, A.W. "Prophylaxis of small pox with methisazone". Am. J. Epidemiol. 90, 130-145 (1969).
22. Bawden, F.C. "Inhibitors of plant viruses" Advances virus Res. 2, 32-57 (1954).
23. Bawden, F.C., and Freeman, G.G. "The nature and behaviour of inhibitors of plant viruses produced by Trichothecium rosaceum Link". J. Gen. Microbiol. 7, 154-168 (1952).
24. Bawden, F.C. and Pirie, N.W. "A virus-inactivating system from tobacco leaves". J. Gen. Microbiol. 16, 696-710 (1956).
25. Becker, Y. and Olshevsky, U. "Inhibition of herpes simplex virus replication by camptothecin". Isr: J. Med. Sci. 9, 1578-1581 (1973).
26. Bedows, E. and Hatfield, G.M. "An investigation of the antiviral activity of Podophylum peltatum". J. of Nat. Prod. 45, 725-729 (1982).
27. Bhakuni, D.S., Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N. and Mehrotra, B.N. "Screening of Indian plants for biological activity: Parte II". Indian J. of Exp. Biol. 7, 250-262 (1969).
28. Bonner, W.M. and Laskey, R.A. "A film detection method for tritium labeled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels" Eur. J. Biochem. 46, 83-88 (1974).

29. Bozarth, R.F. and Ross, A.F. "Systemic resistance induced by localized virus infections: Extent of changes in uninfected plant parts". *Virology* 24, 446-455 (1964).
30. Bradford, M.M. "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding". *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).
31. Caccamese, S., Azzolina, R., Furnari, G., Cormaci, M. and Grasso, S. "Antimicrobial and antiviral activities of extracts from mediterranean algae". *Bot. Mar.* 23, 285-288 (1980).
32. Carrasco, L. "Membrane leakiness after viral infection and a new approach to the development of antiviral agents". *Nature*: 272, 694-698 (1978).
33. Carrasco, L., Fresno, M. and Vázquez, D. "Narciclasine: an antitumor alkaloid which blocks peptide bond formation by eucariotic ribosomes". *FEBS Lett.* 52, 236-239 (1975).
34. Carson, R. S., Frisch, A.W. "The inactivation of Influenza viruses by tannic acid and related compounds". *J. Bact.* 66, 572-575 (1953).
35. Cohen, R.A., Kucera, L.S. and Herrmann, E.C. "Antiviral activity of Melia officinalis (Lemon Balm) extracts". *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 117, 431-434 (1964).

36. Cohen, A., Togo, Y., Khakoo, R., Waldman, R. and Sigel, M. "Evaluation of the prophylactic capacity of rivabirin and amantadine hydrochloride and placebo in induced human influenza type A". J. Infect. Dis. 133 (Suppl.) 114-120 (1976).
37. Coleman, W.H. and Roberts, W.K. "Inhibitors of animal cell-free protein synthesis from grains". Biochim. Biophys. Acta 696, 239-244 (1982).
38. Chessin, M. "Is there a plant interferon? Bot. Rev. 49, 1-28 (1983).
39. Damonte, E.B. y Coto, C.E. "Análisis de los factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con los virus Junín y Tacaribe". Rev. Asoc. Arg. Microbiol. 6, 15-22 (1976).
40. Davydova, N.V., Pospelova, V.V., Telitchenko, M.M. "The effect of Chlorella vulgaris and Scenedesmus obliquus on the viability of bacteriophages to *Salmonella typhimurium*". Bull. Eksp. Biol. Med. 11, 84-87 (1962).
41. De Clecq, E. "New trends in antiviral chemotherapy". Arch. Int. Physiol. Biochim. 87, 353-395 (1979).
42. De Clecq, E. "Specific targets for antiviral drugs". Biochem. J. 205, 1-13 (1982).

43. Deig, E.F., Ehresmann, D.W., Hatch, M.T. and Riedlinger, D.J. "Inhibition of herpesvirus replication by marine algae extract". Antimicrob. Agents Chemother. 6, 524-525. (1974).
44. Dhar, M.L., Dhar, M.M., Dhawan, B.N., Merrotra, B.N. and Ray, C. "Screening of Indian plants for biological activity: Part I". Indian. J. Exp. Biol., 6, 232-247(1968).
45. Duggar, B.M. and Armstrong, J.K. "The effect of treating the virus of tobacco mosaic with the juice of various plants". Ann. Missouri. Bot. Garden. 12: 359-366 (1925).
46. Ehresmann, D.W., Deig, E.F., Hatch, M.T., Di Salvo, L.H. and Vedros, N.A. "Antiviral substances from California marine algae" J. Phycol. 13, 37-40 (1977).
47. Fantes, K.H. and O'Neill, G.F. "Some similarities between a virus inhibitor of plant origin and chick interferon". Nature 203, 1048-1050 (1964).
48. Fiddian, A.P., Yeo, S.M., Stubbings, R. and Dean, D. "Successful treatment of herpes labialis with topical acyclovir". Br. Med. J., i, 1699-1701 (1983).
49. Furusawa, E., Furusawa, S., Kroposki, S. and Cutting, W. "Activity of Sambucus sieboldiana on Columbia SK and LCM virus infection in mice". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 1196-1199 (1968).

50. Furusawa, E. and Windsor, C. "Antiviral activity of higher plants on Lymphocytic Choriomeningitis Infection in-vitro and in-vivo". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 280-282(1966).
51. Fyfe, J.A., Keller, P.M., Furman, P.A., Miller, R.L., Elion, G.B. "Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound 9-(2-hydroxy-etoxyethyl)-guanine". J. Biol. Chem. 253, 8721-8725 (1978).
52. Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Lorenzoni, E., Montaro, L., Spert, S., Bonetti, E. and Stirpe, F. "Modeccin, the toxin of Adenia digitata. Purification toxicity and inhibition of protein synthesis in-vitro". Biochem J. 174, 491-496 (1978).
53. Gerber, P., Dutcher, J.D., Adams, E.V. and Scherman, J.H. "Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B or mumps virus". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 99, 590-593 (1958).
54. Gessner, S.L. and Irvin, J.D. "Inhibition of elongation factor 2-dependent translocation by the pokeweed antiviral protein and ricin". J. Biol. Chem. 225, 3251-3253 (1980).
55. Gianinazzi, S., Kassanis, B. "Virus resistance induced in plants by polyacrylic acid". J. Gen. Virol. 23, 1-9 (1974).
56. Glendon, J. and Kassanis, B. "The importance of the host species in determining the action of virus inhibitors". Ann. Appl. Biol. 41, 183-188 (1954).

57. Goulet, N.R., Cochran, K.W. and Brown, G.C. "Differential and specific inhibition of ECHO viruses by plant extracts". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 103, 96-100 (1960).
58. Grasso, S. "Investigations on the action mechanism of a virus inhibitor from Phytolacca americana". Revista Patol. Veget. 13, 77-84 (1977).
59. Grasso, S. and Shepherd, R. J. "Isolation and partial characterization of virus inhibitors from plant species taxonomically related to Phytolacca". Phytopathology 68, 199-205 (1978).
60. Green, R.H. "Inhibition of multiplication of Influenza virus by extracts of Tea". Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 71, 84-85 (1949).
61. Guerrero, L.D. de, Weissenbacher, M.C. y Parodi, A.S. "Inmunización contra la FHA con una cepa atenuada del virus Junín I. Estudio de una cepa modificada del virus Junín. Inmunización de cobayos". Medicina (Bs.As.) 29, 1-5, (1969).
62. Hall, C.B., Walsh, E.E., Hruska, J.F., Betts, R.F. and Hall, W.J. "Ribavirin treatment of experimental respiratory syncytial viral infection: a controlled double-blind study in young adults". J. A. M. A. 249, 2666-2670 (1983).
63. Herrmann, E.C. Jr. "The detection, assay and evaluation of antiviral drugs". Prog. Med. Virol. 3, 158-162 (1961).

64. Huffman, J.H., Sidwell, R.W., Khare, G.P., Witkocski, J. T., Allen, J.B. and Robins, R.K. "In-vitro effect of 1- β -ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole ICN 1229) on deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid viruses". *Antimicrob. Agents Chemother.* 3, 235-241 (1973).
65. Ieven, M. Van den Berghe, D.A. and Vlietinck, A.J. "Plant antiviral agents. IV. Influence of lycorine on growth pattern of three animal viruses". *Planta Med.* 49, 109-114 (1983).
66. Ieven, M. Vlietinck, A.J., Van den Berghe, D.A., Totte, J., Domisse, R., Esmans, E. and Aldenveireldt, A. "Plant antiviral agents. III Isolation of alkaloids from clivia miniata Regel". *J. Nat. Prod.* 45, 564-573 (1982).
67. Indulen, M.K. and Kalninya, V.A. "Studies on the antiviral effect and the mode of action of the antiinfluenza compound rimantadine". In: *Developments in Antiviral Therapy*, edited by L.H. Collier and J. Oxford, 107-118, Academic Press, London.
68. Irvin, J.D. "Pokeweed antiviral protein". *Pharmac. Ther.* 21, 371-387 (1983).
69. Irvin, J.D., Kelly, T. and Robertus, J.D. "Purification and properties of a second antiviral protein from Phytolacca americana which inactivates eukaryotic ribosomes". *Arch. Biochem. Biophys.* 200, 418-425 (1980).

70. Isaacs, A. and Hitchcock, G. "Progress in research on interferon" *New Sci.* 7, 1336-1337 (1960).
71. Jimenez, A., Santos, A., Alonso, G. and Vázquez, D. "Inhibitors of protein synthesis in eukaryotic cells. Comparative effects of some Amaryllidaceae alkaloids". *Biochem. Biophys. Acta* 425, 342-346 (1976).
72. Kassanis, B., White, R.F. "Inhibition of acquired resistance to tobacco mosaic virus by Actinomycin D". *J. Gen. Virol.* 25, 323-324 (1974).
73. Kathan, R.H. "Kelp extracts as antiviral substances". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 130, 390-397 (1965).
74. Kaufman, H.E., Martola, E. and Dohlman, L. "Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in the treatment of herpes simplex keratitis". *Arch. Ophthalmol.* 68, 235-239 (1962).
75. Kelling, C.L., Schipper, I.A., Schermeister, P. and Vacik, J.P. "Effects of crude extracts of various plants on infectious bovine Rhinotracheitis virus-plaque production". *Am. J. Vet. Res.* 37, 215-218 (1976).
76. Knight, V., Wilson, S.Z., Quarles, J.M., Greggs, S.E., Mc Clung, H.W., Waters, B.H., Cameron, R.W., Zerwas, J.M. and Couch, R.B. "Ribavirin small-particle aerosol treatment of influenza". *Lancet*, ii, 945-949 (1981).

77. Krown, S.E., Real, F.X., Cunningham-Rundles, S., Myskowski, P.L., Koziner, B., Fein, S., Mittelman, A., Oettgen, H.F. and Satai, B. "Preliminary observations on the effect of recombinant leukocyte A in homosexual men with Kaposi's Sarcoma". *N. Engl. J. Med.* 308, 1071-1076 (1983).
78. Laemmli, U.K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄". *Nature* 227, 680-685 (1970).
79. Loebenstein, G. "Further evidence on systemic resistance induced by localized necrotic virus infections in plants". *Phytopathology* 53, 306-308 (1963).
80. Loebenstein, G. "Localization and induced resistance in virus infected plants". *Ann. Rev. Phytopathol.* 10, 177-206 (1972).
81. Loebenstein, G. and Ross, A.F. "An extractable agent, induced in uninfected tissues by localized virus infections, that interferes with infection by tobacco mosaic virus". *Virology* 20, 507-517 (1963).
82. Magnussen, C.R., Douglas, R.G. Jr., Betts, R.F., Roth, F.K. and Meagher, M.P. "Double-blind evaluation of oral ribavirin (virazole) in experimental influenza A virus infection in volunteers". *Antimicrob. Agents Chemother.* 12, 498-502 (1977).

83. Markkanen, T., Mäkinen, M.L., Nikoskelainen, J., Ruohonen, J., Nieminen, K., Jokinen, P., Raunio, R. and Hirvonen, T. "Antiherpetic agent from Juniper tree (Juniperus communis) its purification, identification and testing in primary human amnion cell cultures" *Drugs Exptl. Clin. Res.* 7, 691-697 (1981).
84. Marsden, H.S., Crombie, I.K. and Subak-Sharpe, J.H. "Control of protein synthesis in Herpes virus-infected cells. Analysis of the polypeptides induced by wild type and sixteen ts mutants of HSV strain 17". *J. Gen. Virol.* 31, 347-371 (1976).
85. May G., Willuhn, G. "Antivirale Wirkung wäBeriger Pflanzenextrakte in Gewebekulturen". *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 28, 1-7 (1978).
86. Mc Keen, C.D. "The inhibitory activity of extracts of Capsicum frutescens on plant virus infections". *Canad. J. Bot.* 34, 891-903 (1956).
87. Mersich, S.E. "Estrategia del genoma del virus Junín". Tesis doctoral, (1980).
88. Mindel, A., Willer, L.V.D., Fahesty, A., Sutherland, S., Hindley, D. and Fiddian, A. P. "Prophylactic oral acyclovir in recurrent genital herpes". *Lancet*, ii, 57-59 (1984).
89. Moraes, W.B.C., Martins, E.M., Conti, E. and Oliveira, A. R. "The inhibitory activity of extracts of Albutilon striatum leaves on plant virus infection". *Phytopathol. Z.* 81, 145-152 (1974).

90. Moss, B., Chakrabarti, S., Cheng, K.C. "Use of Vaccinia virus as a vector for the expression of foreign genes". V International Conference on Comparative Virology. Alberta-Canadá. 4-9 mayo 1986. Libro de res. 20.
91. Nilsen, A.E., Aasen, T., Halsos, A.M., Kinge, B.R., Tjotta, E.A.L., Wikstrom, R. and Fiddian, A.P. "Efficacy of oral acyclovir in the treatment of initial and recurrent genital herpes". Lancet, ii, 571-573 (1982).
92. Nomoto, A., Kohara, M., Abe, S., Kuge, S., Semler, B.L., Komatsu, T., Arita, M. and Itoh, H. "The development of a new poliovirus vaccine based on molecular cloning". V International Conference on Comparative Virology. Alberta-Canadá. 4-9 mayo 1986. Libro de res. 23.
93. Obrig, T.G., Irvin, J.D. and Hardesty, B. "The effect of an antiviral peptide on the ribosomal reactions of the peptide elongations enzymes EF-I and EF-II. Arch. Biochem. Biophys. 155, 278-289 (1973).
94. Olsnes, S., Fernández-Puentes, C., Carrasco, L. and Vázquez, D. "Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-Chain". Eur. J. Biochem. 60, 281-288 (1975).
95. Owens, R.A., Bruening, G. and Shepherd, R. J. "A possible mechanism for the inhibition of plant viruses by a peptide from Phytolacca americana". Virology 56, 390-393 (1973).

96. Patel, H.M. and Ryman, B.E. "Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes". FEBS Lett. 62, 60-63 (1976).
97. Pazin, G.J., Ho, M., Haverkos, H.W., Armstrong, J.A., Breining, M.C., Wechsler H.L., Arvin, A., Merigan, T. C. and Cantell, K. "Effects of interferon-alpha on human warts". J. Interferon Res. 2, 235-243 (1982).
98. Popovick, M., Sargadharan, M.G., Read, E. and Gallo, R.C. "Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS". Science 224, 497-500, 1984.
99. Ragetli, H.W.J. "Behaviour and nature of a virus inhibitor occurring in Dianthus caryophyllus L.". Tidschr. Plantezukten 63, 245-344 (1957).
100. Ragetli, H.W.J. and Weintraub, M. "Purification and characteristics of a virus inhibitor from Dianthus caryophyllus L. II Characterization and mode of action" Virology 18, 241-248 (1982).
101. Reed, L.J. and Muench, H.A. "A simple method of estimating fifty per cent end points". Ann. J. Hyg. 27, 493-497 (1938).
102. Richards, J.T., Kern, E.R., Glasgow, L.A., Overall, J.C., Deig, E.F. and Hatch, M.T. "Antiviral activity of extracts from marine algae". Antimicrob. Agents Chemother. 14, 24-30 (1978).

103. Roberts, W.K. and Selennikoff, C.P. "Plant proteins that inactivate foreign ribosomes". *Biosci. Rep.* 6, 19-29 (1986).
104. Roberts, W.K. and Stewart, T.S. "Purification and properties of a translational inhibitor from wheat germ". *Biochemistry* 18, 2615-2621 (1979).
105. Ross, A.F. "Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts". *Virology* 14, 329-339 (1961).
106. Ross, A.F. "Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants". *Virology* 14, 340-358 (1961).
107. Sabin, A.B. "Amantadine and influenza: Evaluation of conflicting reports". *J. Infect. Dis.*, 138, 557-566 (1978).
108. Sadovskaya, S.P., Telitchenko, M.M. "The effect of Chlorella vulgaris and Scenedesmus obliquus on the viability of *Escherichia coli* bacteriophages". *Bull. Eksp. Biol. Med.* 61, 71-74 (1965).
109. Schabel, F.M. Jr. "Purine and pyrimidine nucleosides as antiviral agents: Recent developments". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 173, 215-220 (1970).
110. Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Edwards, J. and Brown, D.T. "Sindbis virus maturation in cultured mosquito cells is sensitive to Actinomycin D". *Virology*, 110, 292-301 (1981).

111. Schlesinger, M.J. "Replication of Togaviruses". In: Virology (Fields, B.N. ed.) pp 1021-1032. Raven Press, New York (1985).
112. Scott, G.M., Secher, D.S., Flowers, D., Bate, J., Cantell, K. and Tyrell, D.A. "Toxicity of interferon". Br. J. Med. 282, 1345-1348 (1981).
113. Sela, I. and Appelbaum, S.W. "Occurrence of antiviral factor in virus-infected plants". Virology, 17, 543-548 (1962).
114. Sela, I., Harpaz, I. and Berk, Y. "Identification of the active component of an antiviral factor isolated from virus-infected plants". Virology 28, 80-82 (1966).
115. Sidwell, R.W., Allen, L.B., Khare, G.P., Huffman, J.H., Witkowski, J.T., Simon, L.N. and Robins, R.K. "Effect of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole ICN 1229) on herpes and vaccinia keratitis and encephalitis in laboratory animals". Antimicrob. Agents Chemother. 3, 242-246 (1973).
116. Sidwell, R.W., Huffman, J.H., Khare, G.P., Allen, L.B., Witkowski, J.T. and Robins, R.K. "Broad-spectrum antiviral activity of virazole: 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole 3-carboxamide". Science 177, 705-706 (1972).

117. Singh, R., Wood, F.A. and Hodgson, W.A. "The nature of virus inhibition by polysaccharide from *Phytophthora infestans*". *Phytopathology*, 60, 1566-1569 (1970).
118. Smith, C.B., Charette, R.P., Fox, J.P., Cooney, M.K. and Hall, C.E. "Lack of effect of oral ribavirin in naturally occurring influenza A virus (H₁N₁) infection". *J. Infect. Dis.* 141, 548-554 (1980).
119. Smookler, M.M. "Properties of inhibitors of plant virus infection occurring in the leaves of species of *Chenopdiales*". *Ann. Appl. Biol.* 69, 157-168 (1971).
120. Stevens, W.A., Spurdon, C., Onyon, L.J. and Stirpe, F. "Effect of inhibitors of protein synthesis from plants on tobacco mosaic virus infection". *Experientia* 37, 257-259 (1981).
121. Stewart, W.E. "The Interferon system. Springer-Verlag, New York (1979).
122. Stiehm, E.R., Kronenberg, L.H., Rosenblatt, H.M., Bryson, Y. and Merigan, T.C. "Interferon: Immunobiology and clinical significance". *Ann. Intern. Med.* 96, 80-93 (1982).
123. Stirpe, F., Olsnes, S. and Pihl, A. "Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, non toxic to intact cells. Isolation, characterization and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A". *J. Biol. Chem.* 255, 6947-6953 (1980).

124. Stirpè, F., Williams, D.G., Onyon, L.J., Legg, R.F. and Stevens, W.A. "Dianthins, ribosome-damaging proteins with anti-viral properties from Dianthus caryophyllus L (carnation)". *Biochem. J.* 195, 399-405 (1981).
125. Strauss, E.G. "Mutants fo Sindbis virus". III Host polypeptides present in purified H.R and t.s 103 virus particles". *J. Virol.* 28, 466-474 (1978).
126. Strauss, E.G. and Strauss, J.H. "Replication strategies of the single stranded RNA viruses of eukaryotes". *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 105, 1-98 (1983).
127. Strauss, J.H. Jr., Burge, B.W. and Darnel, J.E. Jr. "Sindbis virus infection of chick and hamster cells synthesis of virus-specific proteins". *Virology* 37, 367-376 (1969).
128. Suganda, A.G., Amoros, M. et Giva, L. "Effects inhibiteurs de quelques extraits bruts et semipurifiés de plantes indigenes françaises sur la multiplication de l'Herpes virus humain 1 et du poliovirus humain 2 en cultivate cellulaire". *J. of Nat. Prod.* 46, 626-632 (1983).
129. Tafur, S., Nelson, J.D., Delong, D.C. and Svoboda, G.H. "Antiviral components of Ophiorrhiza mungos. Isolation of Camptothecin and 10-methoxycamptathecine". *Lloydia* 39, 261-262 (1976).

130. Teltow, G.J., Irvin, J.D. and Aron, G.M. "Inhibition of herpes simplex virus DNA synthesis by pokeweed antiviral protein". *Antimicrob. Agents Chemother.* 23, 390-396(1983).
131. Tomlinson, J.A., Walker, V.M., Flewett, T.H. and Barday, G.H. "The inhibition of infection by cucumber mosaic virus and influenza virus by extracts from Phytolacca americana". *J. Gen. Virol.* 22, 225-232 (1974).
132. Ussery, M.A., Irvin, J.D. and Hardesty, B. "Inhibition of poliovirus replication by a plant antiviral peptide". *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 284, 431-440 (1977).
133. Van Den Berghe, D.A., Ieven, M., Mertens, F. and Vlietinck, A.J. "Screening of Higher Plants for biological activities" II Antiviral activity. *Lloydia.* 41, 463-471 (1978).
134. Verma, H.N., Awasthi, L.P. "Antiviral activity of Boerhaavia diffusa root extract and the physical properties of the virus inhibitor". *Canad. J. Bot.* 57, 926-932 (1979).
135. Verma, H.N., Awasthi, L.P. and Saxena, K.C. "Isolation of the virus inhibitor from the root extract of Boerhaavia diffusa inducing systemic resistance in plants". *Canad. J. Bot.* 57, 1214-1217 (1979).
136. Wachsman, M.B., Andrei, G.M., Daelli, M.G., Coto, C.E. y de Torres, R.A. "Actividad antiviral asociada a una fracción polipeptídica obtenida de extractos de Melia azedarach L". *Acta Farm. Bonaerense* 3, 27-31 (1984).

137. Wachsman, M.B., Martino, V., Gutkind, G.O., Coussio, J. D., Coto, C.E. and de Torres, R.A. "Antiviral activity of a Melia azedarach plant extract". *Fitoterapia* 53, 167-170 (1982).
138. Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.T. and Sim. G.A. "Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel, alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from Camptotheca acuminata." *J. Am. Chem. Soc.* 88, 3888-3892 (1966).
139. White, R.F. "Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco". *Virology* 99, 410-412 (1979).
140. Worms, G. and Nienhaus, F. "Charakterisierung und Wirkung eines virus-hemmenden Polysaccharids aus Kohlpflanzen". *Phytopathol. Z.* 82, 224-245 (1975).
141. Wyatt, S.D. and Shepherd, R. J. "Isolation and characterization of a virus inhibitor from Phytolacca americana". *Phytopathology* 59, 1787-1794 (1969).
142. Zaitlin, M. and Slegel, A. "A virus inhibitor from tobacco". *Phytopathology* 53, 224-227 (1963).
143. Zhukova, G.E., Novokhatski, A.S. and Telitchenko, M.M. "Inactivation of some RNA-contained viruses with green and blue-green algae". *Vestn. Mosk. Univ. Ser. G. Biol. Pochvoved.* 27, 108-110 (1972).

144. Ziegler, R.E. and Joklik, W.K. "Effect of interferon on multiplication of Avian Sarcoma virus B₇₇ in duck embryo fibroblasts". J. Interferon Res. 1, 521-538 (1981).
145. Zilberstein, A., Kimchi, A., Schmidt, A., and Revel, M. "Isolation of two-interferon induced translational inhibitors: a protein kinase and oligoisoadenylate synthetase". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4734-4738 (1978).