

**ACTIVIDAD ANTIVIRAL EN PRODUCTOS NATURALES: *MELIA AZEDARACH* L. EFECTO SOBRE LA MULTIPLICACIÓN DEL VIRUS JUNÍN, AGENTE DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA, Y ACCIÓN TERAPÉUTICA SOBRE LA QUERATITIS ESTROMAL DEL RATÓN CAUSADA POR HERPES SIMPLEX**

*Celia E. Coto* \*, *Laura E. Alché* \* y *Viviana Castilla*

Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pabellón II, 4° piso, (1428) Buenos Aires, Argentina. E-mail: virocoto@qb.fcen.uba.ar

\* Miembros de la Carrera del Investigador (CONICET).

**Resumen**

*Melia azedarach* L es un árbol oriundo de Asia de cultivo muy difundido en la Argentina cuyo nombre vulgar es paraíso. Apreciado por su sombra y madera, se lo considera una hierba ayurvédica por sus principios curativos y es fuente de compuestos insecticidas. En nuestro laboratorio hemos encontrado actividad antiviral contra virus ARN y ADN en extractos de hojas verdes. En este trabajo se describen los resultados con meliacina (MA), presente en los extractos, obtenida con distintos grados de pureza, sobre la multiplicación de virus patógenos para el hombre: Junín (VJ), agente de la fiebre hemorrágica argentina, en cultivos celulares y herpes simplex tipo-1 (HSV-1) en un modelo de queratitis murina. Cuando células Vero se tratan con MA antes de la infección el VJ no puede desnudarse y por lo tanto no ingresa a la célula. La causa de este efecto se debe a que MA basifica los endosomas y la fusión de membranas necesaria para el ingreso de la nucleocápside no tiene lugar. Si MA se agrega después de la infección el virus puede armarse pero no puede brotar por lo que la progenie queda retenida en la célula. La administración de MA antes o después de iniciada la infección ocular de ratones con HSV-1 cura la queratitis herpética estromal sin mostrar efectos tóxicos, con una efectiva disminución de los síntomas clínicos y de título viral. Aunque los mecanismos actuantes durante el pre y el post- tratamiento parecen ser de diferente naturaleza, los resultados señalan una posible aplicación de MA en la infección humana.

*Palabras clave:* *Melia azedarach* L, Virus Junín, Virus herpes simplex tipo-1, Antiviral vegetal, Meliáceas.

**Abstract**

*Melia azedarach* L, common name Chinaberry, is a deciduous tree native of tropical Asia widely distributed in Argentina appreciated by its wood and desirable shade. Some parts of the tree are used in ayurvedic medicine and it is also considered as a source

*Trabajo presentado con motivo de la entrega del premio "Alfredo Sordelli" en Microbiología, a la Dra. Celia E. Coto, el 10 de noviembre de 2000.*

of insecticidal compounds. Research performed in our laboratory demonstrated the presence of antiviral activity against RNA and DNA viruses in crude fresh green leaves extracts. In this report we described the results obtained with meliacine (MA), a purified fraction present in the crude extracts, which inhibited the replication of Junin virus (JV), the agent of Argentine hemorrhagic fever, in cell cultures. Administration of MA impeded the development of herpetic stromal keratitis produced by HSV-1 in a mice model. In Vero cells pretreated with MA, the multiplication of JV is inhibited because virus uncoating is blocked due to the effect of endosomal basification produced by MA. Once the virus entered the cell, the presence of MA interfered with virus budding without affecting the formation of virus particles. Pre and post-treatment of mice ocular infected with HSV-1 prevented the development of stromal herpetic keratitis, not only ameliorating the clinical signs but effectively reducing virus titers in the eyes. Although, the underlying mechanisms operating in both treatments could be of different nature, the important results obtained, without apparent toxicity for animals, deserve a future application in humans.

**Key words:** *Melia azedarach* L, Chinaberry, Antiviral activity, Junin virus, Herpes simplex virus.

## Introducción

Los virus que producen enfermedad en el hombre lo han acompañado a través de los siglos en su vida nómada o sedentaria. Las mayores epidemias ocurren en los grandes conglomerados de las ciudades pero en la selva y en zonas despobladas hay virus endémicos en los reservorios animales a la espera de un huésped susceptible.

La estrategia más exitosa para combatir las enfermedades de origen viral es la vacunación preventiva. Sin embargo, no existen vacunas efectivas para todos los virus y muchas virosis de importancia sanitaria no pueden evitarse por vacunación.

Uno de los campos de investigación en activa expansión es la búsqueda de antivirales efectivos con baja toxicidad para el huésped. Se dispone, en la actualidad, de numerosos antivirales aprobados para su uso clínico para el tratamiento de unas pocas virosis. Estas drogas, aunque eficaces, dejan de serlo en los tratamientos prolongados debido a la alta variabilidad de los virus, siendo ésta una de las razones principales que justifica la búsqueda de nuevos antivirales.

Son varias las estrategias que se aplican y comprenden, desde el diseño racional, hasta el ensayo sistemático de medicamentos conocidos por su acción en afecciones no virales. Una tercera vía muy transitada es la

investigación de nuevas estructuras moleculares provenientes de productos naturales.

Nuestro grupo de trabajo ha elegido esta última estrategia y durante veinte años hemos estudiado compuestos de plantas, hongos, bacterias y algas.

En este trabajo sólo se presentan resultados obtenidos con extractos purificados de hojas verdes del árbol *Melia azedarach* L sobre dos virus de importancia sanitaria: el virus Junín (VJ) agente causal de la fiebre hemorrágica argentina (FHA) y el virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) que produce, entre otras patologías, queratitis, que puede derivar en ceguera si se reactiva frecuentemente.

La selección de *M. azedarach* para realizar las investigaciones que se describen aquí no fue arbitraria, sino que surgió como resultado de un muestreo de extractos de plantas con tradición de actividad farmacológica en medicina popular [35].

*Melia azedarach* L es el nombre científico latino de un árbol muy abundante en nuestro territorio oriundo de Asia. Su denominación es una combinación de *Melia*, en griego, (porque sus hojas se parecen a las de una planta de ese nombre que se cultiva en Grecia) y *azedarach* que es el nombre persa del árbol. En nuestro país se conoce vulgarmente como paraíso, sin embargo, el nombre verdadero de este árbol en español es Cina-

momo. Pertenece a la familia *Meliaceae*, orden Sapindales, subclase Rosidae, clase Magnoliatae.

El cinamomo es un árbol caducifolio de unos 10-12 m de altura con porte en parasol de tronco delgado de corteza oscura y fisurada y copa densa que a veces toma la forma de sombrilla. Sus hojas son alternas, normalmente bipinnadas, de hasta 60 cm de longitud, con pinnas de 5-7 folíolos peciolados, ovales, ligeramente dentados, de 2-5 cm de longitud, de color verde oscuro en el haz y más claros en el envés. Sus flores aparecen en panículas axilares, son colgantes, muy numerosas y fragantes, de color blanco y violeta, con los estambres reunidos en un tubo central. Sus frutos son drupáceos, globosos, de 1 cm de diámetro, de color amarillo-naranja al principio, dispuestos en racimos muy ornamentales que permanecen en el árbol todo el invierno.

En la Argentina el cultivo de este árbol es muy extendido ya que crece rápidamente resultando muy resistente a los insectos plagas y aunque es una planta invasora es muy apreciada por su madera y su proverbial sombra. A diferencia de otras meliáceas nativas se lo encuentra fácilmente en parques, paseos y veredas de la Ciudad de Buenos Aires y también en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba y otras regiones de clima subtropical.

*Melia azedarach* es pariente cercano de la *Azadirachta indica*, árbol conocido como "Neem" y que es la fuente de numerosos productos utilizados en la medicina tradicional de la India denominada ayurveda. Esta medicina natural es un sistema holístico para curar que evolucionó entre los sabios Brahmanes de la antigua India hace 3000-5000 años y que aún está vigente. Al "Neem" se le atribuye un amplio espectro de propiedades terapéuticas y constituye un árbol venerado en la India. También para *Melia azedarach* se han descrito una variedad de acciones tales como: emético, antipirético, antihelmíntico, emenagogo, antiinflamatorio, desobstruyente, astringente, antiparasitario, antiviral y tónico amargo.

Las partes de la planta que se utilizan son: la corteza del tronco y raíces, las ho-

jas, las flores, los frutos y el aceite de las semillas. La corteza de la raíz se muele hasta obtener un polvo que sirve de medicamento [23] y la corteza del tronco se hierve a ebullición para extraer los principios activos que se administran como un té con propiedades antihelmínticas [25]. Dentro de la medicina India estas preparaciones están indicadas contra la fiebre, la dispepsia, vermes intestinales, la escrófula, lepra [22], cefaleas de origen nervioso y en forma externa se recomienda para cicatrizar heridas, forúnculos, piojos capilares y erupciones pustulares. El polen del Cinamomo causa enfermedad respiratoria de tipo alérgica [9] y los frutos tienen componentes tóxicos que ingeridos en cantidad pueden producir la muerte de niños que los coman accidentalmente o de animales como cerdos y caballos que se alimenten con ellos [41].

Fuera del ámbito de la medicina natural se sabe que diferentes partes de la planta poseen actividad antimicrobiana [24], insecticida [28], [17], [11], antimalárica [26] y antiviral.

Se puede decir que todas las evidencias científicas que prueban la existencia de actividad antiviral en extractos crudos y purificados de las hojas de este árbol provienen de nuestro laboratorio.

En 1982 reportamos que extractos hidroalcolícos de *M. azedarach* mostraban actividad antiviral frente a un amplio espectro de virus ADN y ARN, tanto si se agregaba el extracto después de la adsorción del virus y permanecía hasta su cosecha o desencadenando en las células un estado refractario a la infección por pretratamiento [35]. Posteriormente se demostró que extractos acuosos de hojas también poseían actividad antiviral de amplio espectro exhibiendo baja citotoxicidad, para una serie de líneas celulares de uso rutinario como Vero, L929, MDCK, BHK-21 y otras [5]. Se probó luego que la recolección de las hojas se puede realizar de noviembre a mayo sin que se observen variaciones en los niveles de la concentración activa de los extractos [20]. La cosecha y almacenamiento de hojas permitió entonces diseñar un método de purificación destinado a caracterizar él o los principios activos. Una fracción, con actividad antiviral, parcialmente purificada a partir de

extractos crudos la denominamos meliacina (MA) [6]. En trabajos posteriores se realizaron algunas modificaciones en el proceso de purificación [34], [1] que condujeron a la estandarización de la obtención de MA con distinto grado de pureza, lo que denominamos fracción sílica (MAS) o MAS cromatografiada en TLC que da lugar a dos compuestos (banda 1 y banda 2) de diferente RF pero ambos con actividad antiviral. Por razones de obtención de masa hemos continuado trabajando con la denominada banda 2 (MAB), la que sometida a nuevos procedimientos de purificación ha permitido el aislamiento y caracterización del principio activo antiviral. Se trata de un limonoide que pertenece a la familia de las meliacarpinas y es, de acuerdo al análisis de su espectro en el RMN, el compuesto  $1\alpha$ -cinamoil- $3\alpha$ ,11-dihidroxi meliacarpina que resultó ser antiviral frente a la multiplicación en cultivos celulares de los virus de estomatitis vesicular (VSV) y herpes simplex tipo 1 (HSV-1) [4].

Debido a las dificultades de obtención de material puro en cantidad, los resultados que se presentan en el presente trabajo se obtuvieron con MA. Nuestro interés en este compuesto radica en sus llamativas propiedades como antiviral de amplio espectro in-vitro y como droga de uso potencial in-vivo. Como se trata de una investigación que abarca varios años de labor de investigación, del conjunto de nuestro extenso trabajo hemos seleccionado para esta presentación resultados que permiten deducir el modo de acción de MA como antiviral en cultivos celulares y su aplicación en un modelo animal. Algunos datos que se presentan aquí han sido publicados separadamente y pueden ser consultados en la bibliografía que se cita al final de esta revisión.

## Materiales y métodos

**Células:** Se emplearon células Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) y células BHK-21 (hamster bebé) que se cultivaron en monocapas con medio mínimo esencial de Eagle (MEM, Gibco) en solución salina de Earle, suplementado con 5% de suero de ternera inactivado (MEM 5%) y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. Las monocapas

fueron mantenidas en MEM suplementado con 1,5% de suero bovino inactivado (MEM 1,5%).

**Virus:** Se trabajó con el virus Junín (VJ), cepa IV<sub>4454</sub> y HSV-1, cepa KOS. Estos virus fueron propagados y titulados por unidades formadoras de placas (UFP) en células Vero de acuerdo a protocolos estándar. Los stocks de virus utilizados tenían títulos de: VJ (IV<sub>4454</sub>)  $4 \times 10^6$  UFP/ml y HSV-1 (KOS)  $5 \times 10^7$  UFP/ml.

**Animales:** Se utilizaron ratones Balb/c machos y hembras de 6-8 semanas de edad que fueron comprados en el I.N.T.A de Castelar (Buenos Aires). Los ratones fueron tratados de acuerdo con el protocolo de cuidado de animales, recomendado por el Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos y de la "Association for Research in Vision and Ophthalmology" de Estados Unidos.

**Material vegetal:** Se usaron hojas verdes de *Melia azedarach* L recolectadas en la zona de Palermo y Núñez de la ciudad de Buenos Aires, entre los meses de diciembre y marzo. Una muestra de hojas se depositó para su identificación en el Laboratorio de Botánica, Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A., y se identificó como *Argentina* BAFC1432.

**Obtención de MA:** La preparación de rutina de los extractos purificados de MA se realizó de la siguiente manera: las hojas verdes recién cosechadas o guardadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  se lavaron con agua destilada y luego se trituraron en buffer fosfato de potasio 10 mM, pH 7,2, conteniendo 0,35 M de KCl (1g de hojas por ml). La preparación cruda se filtró a través de una gasa y luego se clarificó por centrifugación a  $10.000 \times g$  durante 45 min. El sobrenadante liofilizado se extrajo con acetato de etilo y la fase orgánica se cromatografió por absorción con sílica gel 230-400 mesh (Merck, Darmstadt, Alemania), eluyendo con cloroformo y cloroformo-metanol. Las fracciones eluidas con cloroformo:metanol 95:5 contienen la actividad antiviral frente a VSV, vi-

rus utilizado como indicador. Las fracciones activas se mezclaron, evaporaron y solubilizaron en PBS a una concentración de 1 mg/ml para los experimentos realizados in-vivo (MAS). Para los estudios de mecanismo de acción se realizó un paso adicional de purificación que consistió en una cromatografía en capa delgada (TLC) del material proveniente del eluido de la columna de sílica concentrado. Una de las dos bandas activas, banda 1 (MAB1), se usó como fuente de antiviral.

*Ensayo de citotoxicidad:* Monocapas de células Vero y BHK-21 se trataron con diferentes concentraciones de MAB1 (entre 0,20 µg/ml y 50 µg/ml) y al cabo de 24 hs de incubación a 37°C se realizó un recuento de células viables por el método de exclusión de azul Tripán. Ninguna de las concentraciones de MAB1 ensayadas tuvo efecto citotóxico ya que el número de células no varió significativamente respecto del control sin tratar aún para la mayor concentración de MAB1 usada (50 µg/ml).

*Ensayo de actividad antiviral:* Monocapas de células Vero y BHK-21 crecidas en microplaca de 24 pocillos se infectaron con VJ utilizando una multiplicidad de infección (m.i.) de 1 UFP/célula y luego de 1 h de adsorción los cultivos se trataron con distintas concentraciones de MAB1 durante 24 hs (post-tratamiento). Los sobrenadantes se cosecharon a las 24 hs post-infección (p.i.) y el virus extracelular se cuantificó por el método de formación de placas (UFP) en monocapas de células Vero. La actividad antiviral de MAB1 para ambos tratamientos se expresó como la concentración efectiva que redujo en un 50% el rendimiento viral respecto al control de virus sin tratar ( $CE_{50}$ ).

*Pretratamiento de las células con MAB1:* Se entiende por pretratamiento la incubación de monocapas de células Vero con concentraciones de MAB1 no citotóxicas por un período de 2 hs a 37°C (el estado antiviral no se establece a 4°C) y luego se lavan las monocapas y se agrega medio MEM sin antiviral. Las células quedan completamente refractarias a la infección por un período de

12 horas [6].

*Ensayo de penetración:* Células Vero preincubadas 2 hs a 37°C con MEM 1,5% conteniendo o no 50 µg/ml de MAB1 se infectaron con VJ (m.i. = 5). La adsorción se realizó durante 45 min a 4°C y luego de descartar el inóculo se realizaron dos lavados con PBS para remover el virus no adsorbido. Posteriormente, las células se incubaron con MEM 1,5% a 37°C durante distintos tiempos (0, 45, 60, 90 o 120 min). Al cabo de dichos tiempos se agregó antisuero anti-VJ hecho en conejo (dilución final 1/100) y las células se mantuvieron por 30 min a 37°C. Luego, los sobrenadantes se descartaron, las células se disgregaron con tripsina y se centrifugaron durante 10 min a 2000 x g. El precipitado se lavó y resuspendió en MEM 1,5% y el virus internalizado se cuantificó mediante un ensayo de centros infecciosos en células Vero. Para determinar la acción de MAB1 por post-tratamiento, el ensayo de penetración se realizó en forma similar al descrito con el agregado de MAB1 (50 µg/ml) luego del período de adsorción.

*Cuantificación de la infectividad asociada a células durante la penetración viral:* Células Vero pretratadas o no con 50 µg/ml de MAB1 se infectaron con VJ (m.i. = 5). Luego de 45 min de adsorción a 4°C las células se incubaron a 37°C en MEM 1,5% y parte de los cultivos sin tratar en MEM 1,5% conteniendo 15 mM de cloruro de amonio. A distintos tiempos post-adsorción, el virus no internalizado se inactivó con proteinasa K (0,5 mg/ml) como se describió previamente [14]. Finalmente, las células se resuspendieron en MEM 1,5%, se rompieron por congelado y descongelado y la infectividad asociada a células se determinó por el método de UFP.

*Ensayo de formación de sincicios:* Monocapas de células Vero crecidas en cubreobjetos e infectadas con VJ (m.i.= 1) se trataron con MAB1 (50 µg/ml) a diferentes tiempos p.i. A las 24 hs p.i. las células se lavaron e incubaron en MEM pH 5,0 conteniendo 0,2% de seroalbúmina bovina (Sigma) y 10 mM de Hepes. Al cabo de 2 hs los cultivos se incubaron en MEM 1,5% durante 15 hs a 37°C. Fi-

nalmente, las células se fijaron con metanol, se tiñeron con Giemsa (0,4%) y se observaron al microscopio para detectar la presencia de células multinucleadas [14]. El porcentaje de células fusionadas se calculó a partir del recuento de 20 campos seleccionados al azar con la siguiente fórmula: (número promedio de núcleos en policariocitos / número promedio de núcleos totales por campo) X 100.

#### *Inmunofluorescencia indirecta (IFI):*

Monocapas de células Vero crecidas en cubreobjetos se infectaron con VJ (m.i. = 1) y a distintos tiempos p.i. se agregó MAB1 (25 µg/ml). A las 24 hs p.i. los sobrenadantes se descartaron y las células se lavaron con PBS. Luego, las monocapas se fijaron con metanol (15 min a -20°C) o con 4% de paraformaldehído (15 min a temperatura ambiente) para la IFI citoplasmática o de membrana respectivamente. Las células fijadas se incubaron en primer lugar con el anticuerpo monoclonal anti-G1,GB03-BE08 [30], y posteriormente con un antisuero hecho en cabra anti-Ig de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma). Los porcentajes de células fluorescentes se calcularon a partir del recuento de 20 campos seleccionados al azar.

*Infección ocular de los ratones:* Los ratones se anestesiaron por vía intraperitoneal con 2 mg de ketamina (Ketalar, Parke-Davis, Morris Plains, NJ, USA) y xylacina (Rompun, Mobay, Shantee, KA). La córnea derecha de cada ratón se raspó 8 veces siguiendo un patrón de entrecruzamiento con una aguja de calibre 27 y se instiló una suspensión conteniendo  $2,5 \times 10^4$  UFP de virus HSV-1 (vol = 5 µl). MAS se administró tres veces por día aplicando diferentes esquemas. Los ratones controles recibieron PBS en lugar de MAS. La severidad de la queratitis herpética se determinó usando un microscopio binocular y tabulando la severidad.

*Evaluación clínica:* Los ratones fueron evaluados clínicamente desde el día 2 p.i. hasta los 16 días, tiempo en que se dio por terminado el experimento. Se aplicó un sistema de puntaje basado en la densidad de los infiltrados inflamatorios, neovascularización

y la presencia de **úlceras superficiales o profundas**. Sin lesión: **0**, presencia de escasas células inflamatorias en el limbo y escasos infiltrados celulares en el estroma: **1**; moderados infiltrados inflamatorios difusos: **2**; neovascularización pronunciada, edema, erosión epitelial o focal, ulceración superficial: **3**; importantes infiltrados difusos, intensa neovascularización, extensa ulceración, necrosis estromal o perforación de la córnea: **4**. [31].

*Aislamiento de virus y determinación de los títulos virales:* A distintos tiempos después de la inoculación, se sacrificaron grupos de cuatro ratones y se extirparon los ojos que se mantuvieron a -70°C hasta su procesamiento. Una vez descongelados, se homogeneizaron en un Potter manual usando MEM 5%. Los homogeneizados al 10% se centrifugaron a 10.000 x g por 30 min a 4°C. Se cosecharon los sobrenadantes que fueron titulados por UFP. El título viral se expresó en UFP/gr de tejido.

## Resultados

### • 1. Mecanismo de acción de MAB1 sobre el ciclo de multiplicación de VJ in-vitro

En las primeras experiencias con extractos crudos de *Melia azedarach* se había demostrado que el virus Junín era inhibido tanto por pretratamiento de las células como por post-tratamiento [35]. Posteriormente, una vez que se dispuso de material purificado, se trató de averiguar cuál era el paso de replicación viral afectado.

#### 1.1. Acción virucida

A fin de descartar un posible efecto directo de MAB1 sobre las partículas virales, se midió la infectividad residual de suspensiones virales pre-incubadas 2 hs a 37°C en presencia de concentraciones crecientes de MAB1 (0 a 50 µg/ml). No se encontraron diferencias significativas en el título viral respecto al control preincubado con medio sin MAB1. Tanto la ausencia de citotoxicidad como de una acción directa sobre las partículas virales indican que MAB1 no se comporta como un agente virucida sino como un compuesto antiviral.

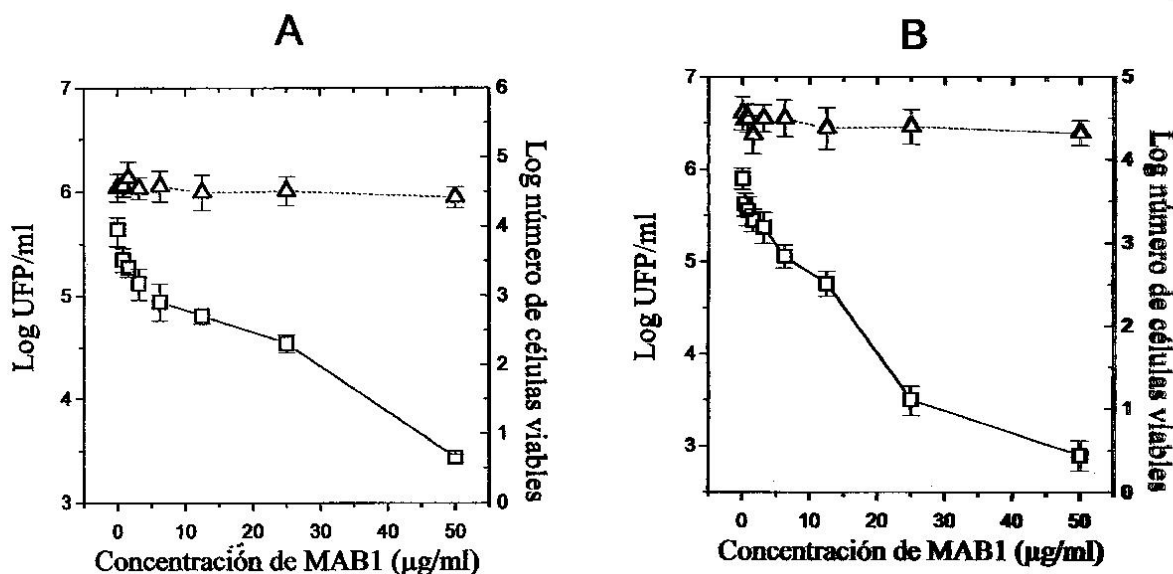


Fig. 1. Inhibición de la multiplicación de VJ en células Vero y BHK-21 en función de la dosis de MAB1. Monocapas de células Vero (A) o BHK-21 (B) se incubaron a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de MAB1 y al cabo de 24 h se determinó el número de células viables por el método de exclusión con azul Tripán (A). Otra serie de cultivos infectados con VJ (m.i.=1 UFP/célula) se incubaron con MEM 1,5% conteniendo diferentes concentraciones de MAB1 (□). A las 24 h p.i. se tituló el virus liberado al sobrenadante por el método de UFP. Los resultados corresponden al promedio de tres determinaciones ± el desvío estándar.

### 1.2. Efecto antiviral

Para investigar el efecto de MAB1 sobre la producción viral, monocapas de células Vero o BHK-21 se infectaron con VJ y al cabo de 1 h de adsorción los cultivos se incubaron con diferentes concentraciones de MAB1. A las 24 hs p.i. se cuantificó el rendimiento viral. En los dos sistemas celulares, MAB1 causó una inhibición de la producción vírica dependiente de la dosis (Figura 1 A y B). La CE<sub>50</sub> (concentración efectiva de droga que reduce en un 50% el título viral) fue de 0,94 µg/ml y 0,54 µg/ml para células Vero y BHK-21, respectivamente.

El efecto inhibitorio de MAB1 se corroboró analizando la expresión de antígeno viral en células Vero infectadas con VJ y tratadas con MAB1 durante 24 hs utilizando un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. La presencia de MAB1 (25 µg/ml) produjo una inhibición del 98,5 % en el número de células que expresaban antígeno viral respecto a los

cultivos sin tratar (no se muestran los datos). En los cultivos control, el porcentaje de células fluorescentes para la m.i. utilizada fue de un 50% mientras que en los cultivos tratados sólo un 0,75% del total de células examinadas presentaron fluorescencia, indicando que MAB1 interfiere con la expresión de proteínas virales.

### 1.3. Efecto de MAB1 en diferentes etapas de la infección viral

Con el objeto de ubicar temporalmente el paso de la replicación viral afectado por MAB1, células Vero o BHK-21 infectadas con VJ se incubaron en MEM 1,5% (control) o MEM 1,5% conteniendo 25 µg/ml de MAB1 agregada en diferentes periodos a lo largo de la infección. En todos los casos, a las 24 hs p.i. se determinó el título de virus extracelular. Los resultados indican que la presencia de MAB1 durante las primeras 4 hs. post-adsorción inhibe la multiplicación viral en un

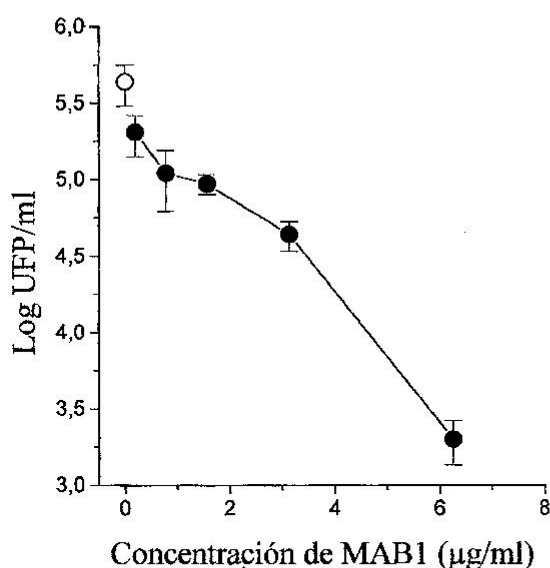


Fig. 2. Efecto del pretratamiento de células Vero con MAB1 sobre el rendimiento viral. Células Vero se incubaron durante 2 h a 37°C con diferentes concentraciones de MAB1 (●). Luego los cultivos se lavaron e infectaron con VJ (m.i.=1 UFP/célula). A las 24 h p.i. se determinó el título de virus extracelular por el método de UFP. (○) células infectadas sin tratar con MAB1. Los resultados corresponden al promedio de tres determinaciones ± el desvío estándar.

97,97 %. Cuando MAB1 se agregó a partir de las 5 hs p.i., también se observó una inhibición del mismo orden y en forma independiente del sistema celular ensayado. La reducción en el rendimiento viral observada cuando MAB1 estuvo presente sólo al principio de la infección sugiere que MAB1 estaría afectando una etapa temprana del ciclo de multiplicación viral. Sin embargo, no se puede descartar una acción de MAB1 sobre eventos posteriores de la infección de acuerdo a los bajos títulos de virus extracelular obtenidos cuando MAB1 se agregó a las 5 hs p.i. Con el fin de poder distinguir entre los efectos inhibitorios tempranos y tardíos se decidió examinar el efecto del pre y post-tratamiento con MAB1 sobre distintos eventos de la infección viral.

#### 1.4. Inhibición de la multiplicación del VJ en

##### *células Vero pretratadas con MAB1*

En cultivos pretratados con diferentes concentraciones de MAB1 y posteriormente infectados con VJ se cuantificó la producción de virus extracelular a las 24 hs p.i. Como se observa en la Figura 2 el pretratamiento con MAB1 produjo una inhibición del rendimiento viral dependiente de la dosis. A bajas concentraciones de MAB1, se estableció un bloqueo de la replicación del virus observándose una caída del título viral de más de dos logaritmos para una concentración de MAB1 de 6,25 µg/ml siendo la  $CE_{50}$  de 0,127 µg/ml, menor a la obtenida cuando MAB1 era agregada luego de la adsorción (Figura 1A). Estos resultados estarían indicando que el efecto de MAB1 no es directo sobre el virus sino que la célula huésped en estado refractario no es capaz de permitir que se complete el ciclo de replicación.

##### 1.4.1. Efecto del pretratamiento con MAB1 sobre las etapas tempranas del ciclo de multiplicación viral

Nos preguntamos, entonces, a qué nivel se producía el bloqueo, por lo cual se decidió analizar en detalle el efecto de MAB1 sobre las primeras etapas de la infección: adsorción, penetración y desnudamiento.

La adsorción viral no fue afectada por el pretratamiento con diferentes concentraciones de MAB1 dado que los títulos de virus adsorbido (asociado a células) en células tratadas y sin tratar no presentaron diferencias significativas. Lo mismo ocurrió comparando los títulos de virus remanentes en el inóculo, por lo que se descartó la adsorción viral como blanco de la acción de MAB1.

A fin de determinar si MAB1 tenía algún efecto sobre la penetración viral, se cuantificó el número de centros infecciosos no neutralizables por suero policlonal anti-VJ en cultivos de células Vero pretratados o no con MAB1, adsorbidos con VJ a 4°C y luego incubados a 37°C durante diferentes tiempos para permitir la internalización viral. El análisis de la cinética de penetración en los cultivos sin MAB1 mostró que a los 45 min. post-adsorción la internalización fue casi completa (Figura 3). En los cultivos pretratados con MAB1, se observó una reducción significati-



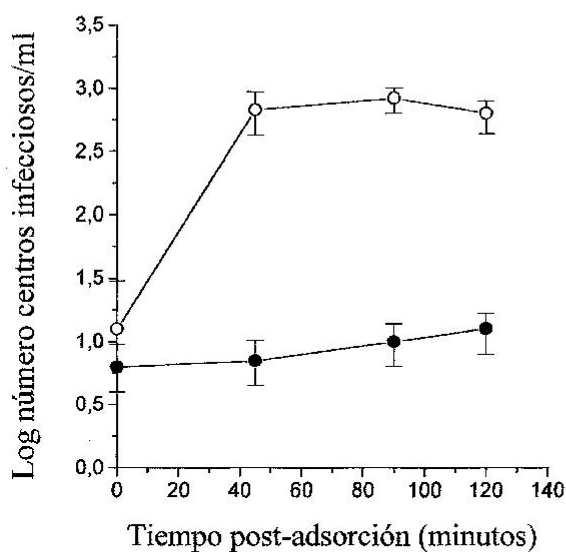


Fig. 3. Acción del pretratamiento con MAB1 sobre la penetración viral. Cultivos de células Vero pretratadas (●) o no (○) con 50 µg/ml de MAB1 se infectaron con VJ y luego de 1 h de adsorción a 4°C los cultivos se incubaron a 37°C. A diferentes tiempos post-adsorción el virus internalizado se determinó mediante un ensayo de centros infecciosos. Los resultados corresponden al promedio de tres determinaciones ± el desvío estándar.

va de la internalización viral con un 90% de inhibición en el número de centros infecciosos luego de 120 min. de incubación a 37°C.

El VJ entra a las células Vero por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor [14]. Las bases débiles acidotrópicas, como el cloruro de amonio, que elevan el pH de las vesículas acídicas intracelulares, impiden los cambios inducidos por la acidez que son esenciales para la fusión de membranas y por lo tanto inhiben el desnudamiento de los virus con actividad de fusión pH-dependiente [27], [40]. Este tipo de agentes inhibe de forma indirecta la reacción de fusión sin afectar la adsorción viral o la endocitosis.

En consecuencia, las diferencias en la cinética de penetración observadas en los cultivos pretratados con MAB1 y los cultivos sin tratar podrían deberse o bien a una inhibición de la internalización de los viriones en vesículas endosomales o bien al bloqueo del

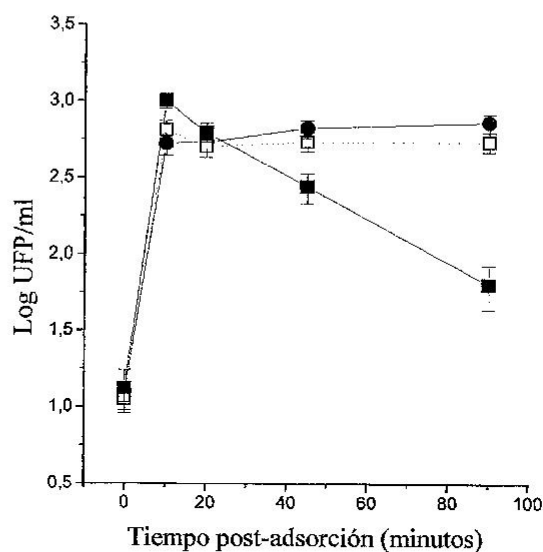


Fig. 4. Acción del pretratamiento con MAB1 sobre el desnudamiento viral. Cultivos de células Vero pretratados (●) o no (■) con 50 µg/ml de MAB1 se infectaron con VJ y luego de 1 h de adsorción a 4°C los cultivos se incubaron a 37°C. Algunos cultivos no tratados con MAB1 y adsorbidos a 4°C con VJ se incubaron a 37°C en presencia de cloruro de amonio 15 mM (□). A diferentes tiempos post-adsorción se cuantificó la infectividad asociada a células. Los resultados corresponden al promedio de tres determinaciones ± el desvío estándar.

desnudamiento viral. A fin de poder distinguir entre estas dos posibilidades, cultivos de células Vero pretratados o sin tratar, adsorbidos con VJ a 4°C, se incubaron a 37°C y, a distintos tiempos, el virus adsorbido y no internalizado se inactivó por tratamiento con proteinasa K y se determinó la infectividad asociada a células. En los cultivos control a partir de los 20 min. post-adsorción se detectó una disminución progresiva del título de virus internalizado, consecuencia de la pérdida de infectividad asociada al desnudamiento viral. Por el contrario, en los cultivos pretratados con MAB1 se observó una acumulación de partículas virales infecciosas (Figura 4). Un perfil similar al obtenido con MAB1 se encontró para otra serie de cultivos no tratados con MAB1 para los cuales la internalización se llevó a cabo en presencia de cloruro de

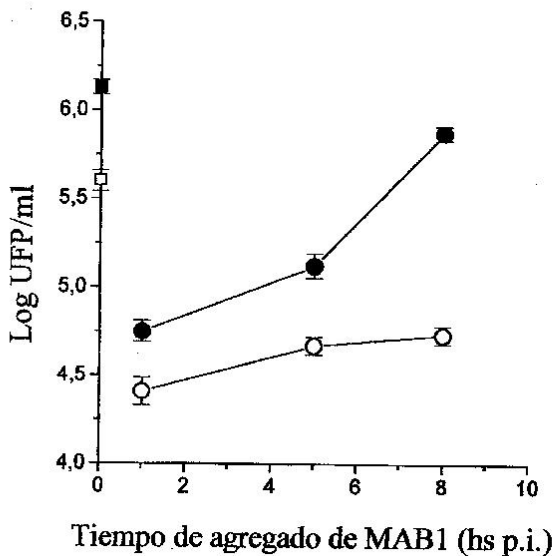


Fig. 5. Efecto del tiempo de adición de MAB1 sobre la producción de virus extracelular y virus asociado a células. Células Vero se infectaron con VJ (m.i.=1 UFP/célula) y a diferentes tiempos p.i. se agregó MAB1 (25µg/ml). A las 24 h p.i. se determinó la producción de virus extracelular a partir de los sobrenadantes de cultivos tratados (○) y sin tratar (□). Las células se rompieron por congelado y descongelado y se cuantificó la infectividad asociada a células en cultivos tratados (●) y sin tratar (■). Los resultados corresponden al promedio de tres determinaciones ± el desvío estándar.

amonio. El conjunto de estos resultados indica que en células pretratadas con MAB1 el virus no puede desnudarse.

### 1.5. Efecto del post-tratamiento con MAB1 sobre la infección con VJ

Dado que los eventos tardíos de la multiplicación viral (brotación y liberación de progenie) comprenden la fusión de membranas al igual que la penetración, y considerando que MAB1 inhibe la multiplicación viral cuando es agregada a las 5 hs p.i., se analizó la acción de MAB1 sobre eventos tardíos del ciclo viral.

#### 1.5.1. Efecto diferencial de MAB1 sobre la producción de virus extracelular y asociado a células

Se analizó la producción de virus extracelular y de virus asociado a células en función del tiempo de adición de MAB1. El agregado de 25 µg/ml de MAB1 a distintos tiempos luego de iniciada la infección produjo una marcada inhibición del rendimiento viral (superior al 90%) aún en aquellos cultivos incubados con MAB1 a partir de las 8 hs p.i. (Figura 5). Por el contrario, la infectividad asociada a las células aumentó en forma progresiva y en los cultivos en los cuales MAB1 fue agregada a las 8 hs p.i., el porcentaje de inhibición respecto a los cultivos sin tratar fue sólo de un 45,52%. Por lo tanto la producción de virus extracelular fue significativamente más sensible a la acción de MAB1, indicando que la adición tardía de este compuesto permite la formación de partículas virales infecciosas que permanecen asociadas a la célula.

#### 1.5.2. Efecto del tiempo de agregado de MAB1 sobre la formación de sincicios

Estudios previos demostraron que la capacidad del VJ de producir células multinucleadas podía ser inducida en condiciones de acidez [15]. A fin de estudiar la acción de MAB1 sobre la fusión celular, monocapas de células Vero infectadas con VJ se trataron con MAB1 a diferentes tiempos luego del comienzo de la infección. A las 24 hs p.i., se determinó el rendimiento viral a partir de los sobrenadantes y las células se incubaron en medio ácido a fin de inducir la fusión celular. Los porcentajes de inhibición de la producción de virus extracelular y de la formación de sincicios fueron similares cuando MAB1 se agregó a lo largo de las primeras 8 hs de la infección (Figura 6). Si bien el rendimiento viral no disminuyó en forma significativa en los cultivos tratados con MAB1 durante las últimas horas de la infección, la formación de sincicios resultó inhibida aún cuando MAB1 se agregó a las 20 hs p.i. El porcentaje de células fusionadas en los cultivos sin tratar fue del 72,5%, mientras que en los cultivos incubados con MAB1 a partir de las 16 hs p.i. y 20 hs p.i., los porcentajes de células fusionadas fueron del 13,05% y 19,35% respectivamente.

#### 1.5.3. Efecto del tiempo de adición de MAB1 sobre la expresión de la glicoproteína viral G1

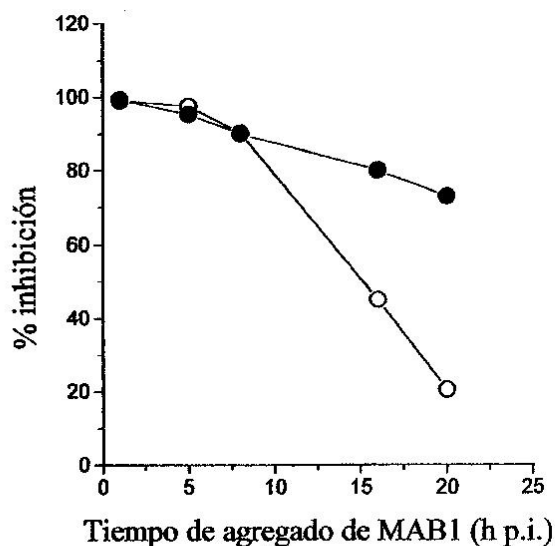


Fig. 6. Efecto del tiempo de agregado de MAB1 sobre la formación de sincicios. Células Vero se infectaron con VJ (m.i.=1 UFP/Célula) y a distintos tiempos p.i. se agregó MEM 1,5% conteniendo 50 µg/ml de MAB1. A las 24 h p.i. se cuantificó el rendimiento viral (○) y la producción de sincicios (●). Los valores presentados corresponden a los porcentajes de inhibición calculados respecto del control sin tratar.

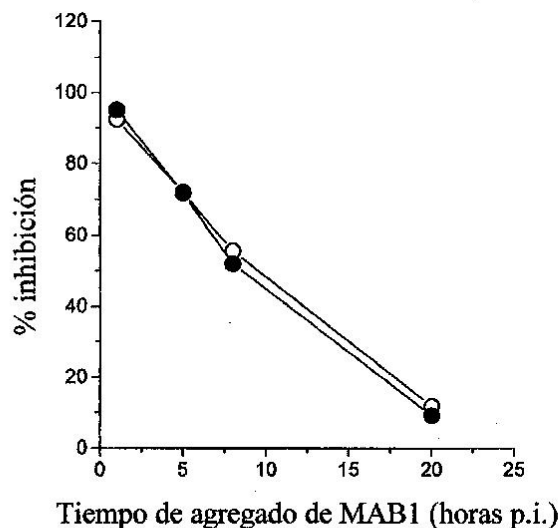


Fig. 7. Efecto del tiempo de agregado de MB1 sobre la expresión de la glicoproteína G1. Células Vero infectadas con VJ (m.i.=1 UFP/célula) se incubaron a diferentes tiempos p.i. con 50 µg/ml de MAB1. A las 24 h p.i. las células se fijaron y se cuantificó la expresión de G1 en el citoplasma (○) o en la membrana celular (●) mediante ensayos de IFI. Los valores representados corresponden a los porcentajes de inhibición calculados respecto del control sin tratar.

La ausencia de policariocitos en los cultivos tratados con MAB1 durante las últimas horas de la infección podría deberse a la falta de expresión de G1, principal glicoproteína del VJ en la superficie de las células infectadas.

Con el objeto de analizar la acción de MAB1 sobre la expresión y transporte a la membrana celular de las proteínas virales, se analizó el efecto del tiempo de adición de MAB1 sobre la expresión de G1. Para ello, células Vero infectadas con VJ se incubaron con MAB1 a partir de diferentes tiempos p.i. Al cabo de 24 hs se cuantificó el número de células que expresaban antígeno viral en el citoplasma o en la membrana celular mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta citoplasmática o de membrana, utilizando como primer anticuerpo un anticuerpo monoclonal anti-G1. Como se muestra en la Figura 7, en ambos ensayos se observó una disminu-

ción progresiva en los porcentajes de inhibición de la expresión de G1 en función del tiempo de adición de MAB1.

El número de células que expresan G1, tanto en citoplasma como en la membrana celular, fue significativamente menor respecto al control sin tratar en aquellos cultivos en los cuales MAB1 se agregó en las primeras horas de la infección. El agregado de MAB1 a las 8 hs p.i. redujo en un 50% el número de células fluorescentes en concordancia con la disminución de la infectividad asociada a células que se muestra en la Figura 5. Estos resultados confirman la acción de MAB1 sobre una etapa temprana de la replicación viral. Por otra parte, para todos los tiempos de adición de MAB1 analizados, la inhibición de la fluorescencia citoplasmática fue similar a la observada cuando se determinó la expresión de G1 en membrana, lo cual indica que MAB1 no afectaría el transporte de G1 a la

Cuadro I. Diferentes tratamientos de ratones infectados por vía ocular con HSV-1 con MAS administrada por la misma vía.

|                        | Día -1 | Día 0 | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 |
|------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Pre-tratamiento        | MAS    | HSV-1 | MAS   | MAS   | MAS   | ---   | ---   | ---   |
| Post-tratamiento MAS24 | ---    | HSV-1 | MAS   | MAS   | MAS   | ---   | ---   | ---   |
| Post-tratamiento MAS96 | ---    | HSV-1 | ---   | ---   | ---   | MAS   | MAS   | MAS   |

membrana celular. Asimismo estos experimentos permiten descartar que la reducción en la capacidad de producir sincicios cuando MAB1 es agregada a las 20 hs p.i. (Figura 6) se deba a una disminución significativa de la expresión de G1 en la superficie celular. Como se observa en la Figura 7, la adición de MAB1 a este tiempo p.i. produjo una escasa inhibición de la fluorescencia de membrana (8,5%).

#### 1.5.4. Efecto del post-tratamiento con MAB1 sobre la adsorción y penetración viral

Los resultados presentados en la Figura 3 demuestran que el pretratamiento de las células con MAB1 inhibe la penetración viral sin afectar la adsorción del virus a la célula huésped. Se decidió entonces analizar cuál era el efecto de la presencia de MAB1 durante estos dos eventos tempranos. De forma similar a lo observado en los cultivos pre-tratados, la infectividad remanente en el inóculo (título de virus no adsorbido) obtenido a partir de cultivos celulares infectados a 37°C con VJ en presencia de MAB1 durante 1 h, no presentaron diferencias significativas con los cultivos control, indicando que el proceso de adsorción no está afectado por MAB1 (datos no mostrados). Por otra parte, se analizó la cinética de penetración viral en cultivos adsorbidos con VJ a 4°C y posteriormente incubados a 37°C en presencia de 50 µg/ml de MAB1, determinando a distintos tiempos post-adsorción el número de centros infecciosos no neutralizables por suero policlonal anti-VJ, como medida de virus internalizado. La cinética de penetración de los cultivos tratados fue similar a la obtenida en los cultivos sin tratar (datos no mostrados). Si comparamos estos resultados con la marcada inhibi-

ción de la penetración observada en los cultivos pre-tratados con la misma concentración de MAB1, se puede concluir que la inhibición de la internalización viral requiere la presencia de MAB1 antes de iniciada la penetración. El conjunto de estos resultados indica que el post-tratamiento con MAB1 impide principalmente el egreso de progenie viral infecciosa al medio extracelular.

#### • 2. Acción antiviral de MAS sobre la queratitis herpética murina

La replicación del virus HSV-1 es inhibida cuando se pretratan células con MA cuando MA se agrega después de la infección [8]. Estudios posteriores demostraron que ni la adsorción ni la penetración de HSV-1 se ve afectada en células Vero tratadas con MAS [34]. En cambio, se observa que hay una inhibición significativa de los polipéptidos virales intracelulares involucrados en el empaquetamiento y ensamble de las partículas [34]. Estudios ultraestructurales mostraron que en las células tratadas con MAS se acumulan en el citoplasma una gran proporción de nucleocápsides virales sin envoltura y sólo una pequeña proporción de virus maduro se encuentra en las vesículas citoplasmáticas [3].

Con el objeto de establecer si MAS podía ejercer su efecto antiviral en un sistema de infección in-vivo se probó su acción sobre la evolución de la queratitis herpética (QH), ensayando distintos esquemas de tratamiento tópico en el ojo derecho de ratones infectados con HSV-1, como se muestra en el Cuadro I.

Se trabajó con cuatro grupos de 20 ratones Balb/c adultos cada uno, 3 de los cuales fueron sometidos a los esquemas de trata-

miento detallados en el cuadro, y el grupo restante fue mantenido como control de infección viral del experimento (ver Materiales y Métodos).

### 2.1. Signos clínicos de enfermedad ocular inducida por HSV-1

Los ratones presentaron sus primeras lesiones oculares a los 7 días de la infección con HSV-1 y la observación continuó hasta el día 16 p.i. El primer signo de enfermedad observado fue la blefaritis, que consiste en la inflamación de los párpados y producción de secreción. Los ratones comenzaron a presentar síntomas de opacificación corneal y vascularización a partir del día 7 p.i., con neovasos extendidos hasta la porción central -hecho patológico- ya que la córnea es avascular. El conjunto de estos signos clínicos sumados a la necrosis corneal conforman la queratitis estromal herpética, cuya evolución se detalla en la Figura 8 para el grupo control y cada esquema de tratamiento. En el día 7 p.i., el 63% de los animales infectados presentan signos de enfermedad, en tanto que los valores se reducen a 25, 12,5 y 5% para los 3 grupos de tratamiento (MAS96, MAS24 y pre-trat, respectivamente) (Figura 8A). La enfermedad progresa y a los 10 días p.i. se registra un 79% de ratones con QH mientras que los porcentajes correspondientes a los grupos de tratamiento permanecen prácticamente invariables. Al final del período de observación (día 16 p.i.), se alcanza el máximo porcentaje de animales infectados con signos de QH (90%), los cuales parecen mejorar en los grupos de tratamiento con MAS a las 24 y 96 h.p.i. dado que hay una leve disminución en el porcentaje de ratones enfermos (Figura 8A). Estos resultados indican que MAS no sólo inhibe el desarrollo de la QH sino que además actuaría sobre la recuperación de aquellos animales que inicialmente habían enfermado.

Las observaciones de los signos clínicos se correlacionan con observaciones histopatológicas (resultados no presentados). Las córneas de los animales que no recibieron ningún tipo de tratamiento presentaron engrosamientos y edemas. El epitelio mostró evidencias de necrosis e infiltrado de polimorfo-

nucleares, al igual que el estroma corneal. De la misma forma, la vascularización del estroma también se observó en los cortes de las córneas pertenecientes a los animales del grupo control. Por el contrario, el tratamiento con MAS eliminó completamente cualquier signo de daño histológico. Para los tres tipos de tratamientos, las córneas fueron histológicamente normales, sin evidencias de necrosis, inflamación ni vascularización.

### 2.2. Severidad de las lesiones provocadas por la QH

El registro del porcentaje de animales con QH se complementó con la observación de los diferentes grados de severidad de las lesiones. Si bien algunos de los animales tratados enfermaron, la severidad de la enfermedad no resultó la misma en todos los casos. Mientras que el grupo de animales infectados no tratados con MAS alcanzó una severidad de las lesiones de 2,6, los animales pre o post-tratados con cualquiera de los dos esquemas de tratamiento con MAS presentaron un rango de severidad de la QH que osciló entre 0,05 y 0,6 (Figura 8B).

### 2.3. Aislamiento de HSV-1 a partir de córneas

Paralelamente al registro de los parámetros de enfermedad, se sacrificaron tres animales de los grupos de pre-tratamiento con MAS, MAS24, MAS96 y control, en los días 1, 2 y 3 p.i., y se extirparon los ojos. Estos órganos fueron procesados según se describe en Materiales y Métodos para detectar infectividad viral mediante una titulación por formación de placas bajo metilcelulosa en células Vero. Consideramos que los animales provenientes del grupo MAS96 se comportaron de forma similar al control durante los primeros tres días, dado que en este período no recibieron ningún tipo de tratamiento. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 9.

Se observa que los animales que recibieron MAS por pretratamiento y los animales controles presentaron títulos virales similares ( $2$  y  $5 \times 10^4$  UFP/gr de ojo) en el día 1 p.i., en tanto que los animales que recibieron MAS por post-tratamiento (MAS24) presentaron títulos significativamente menores ( $< 10^2$  UFP/

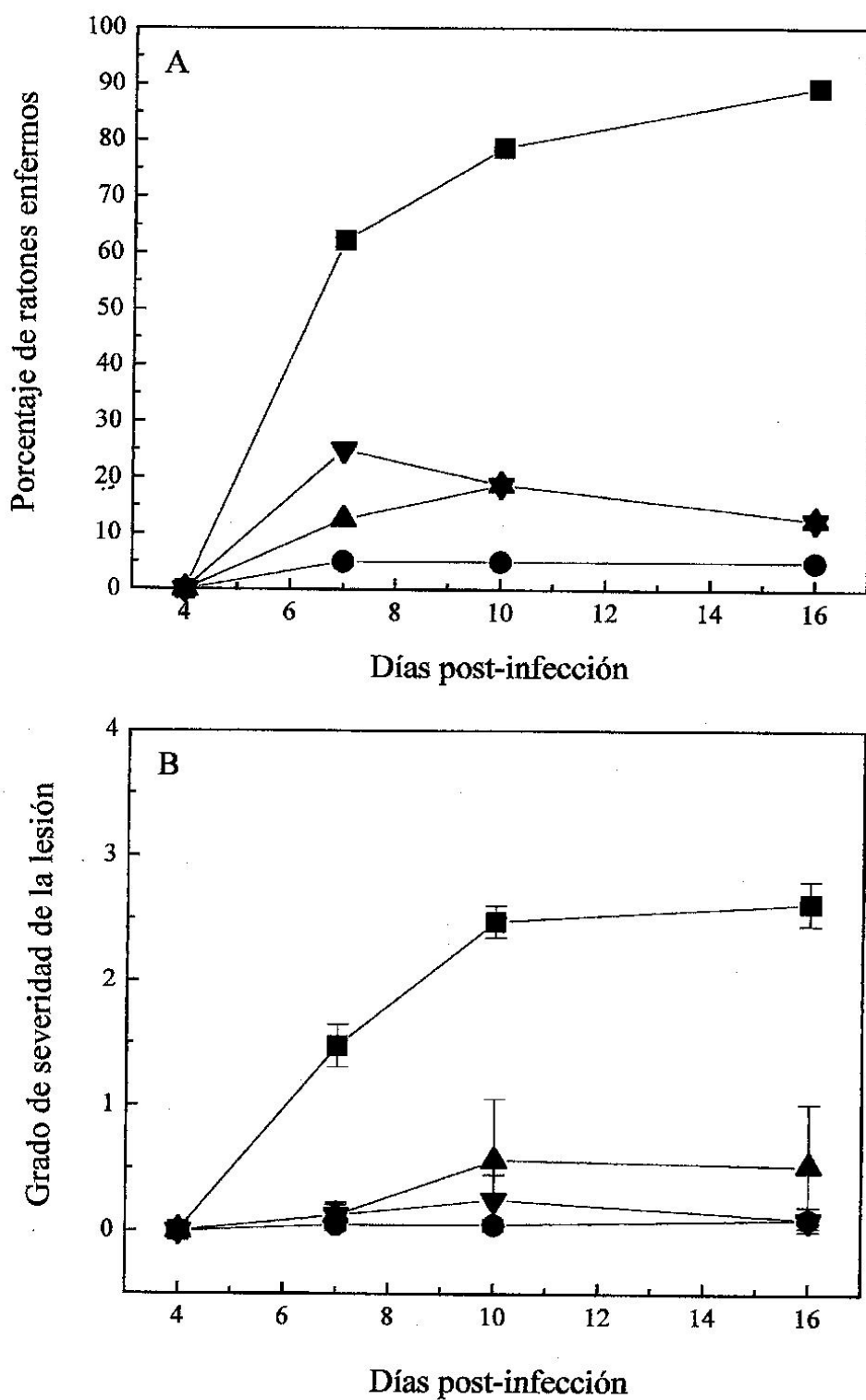


Fig. 8. Evolución de la enfermedad ocular inducida por HSV-1 en ratones tratados y no tratados con MAS. A: signos clínicos de queratitis herpética; B: severidad de la lesión ocular. Control de infección con HSV-1 (■); pretratamiento con MAS (●); MAS24 (▲); MAS96 (▼).

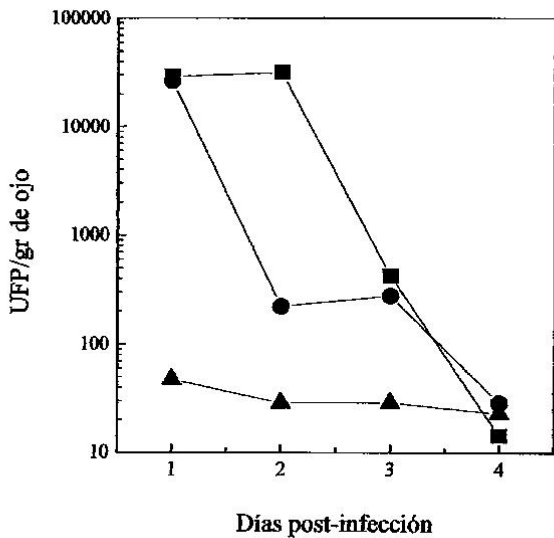


Fig. 9. Aislamiento de HSV-1 a partir de ojos de ratones tratados y no tratados con MAS. Control de infección con HSV-1 (■); pretratamiento con MAS (●); MAS24 (▲).

gr. de ojo) (*t*-Student,  $p = 0,001$ ). Sin embargo, en el día 2 p.i., las diferencias entre los grupos tratados y los animales controles se hicieron más pronunciadas, pudiéndose apreciar una disminución de más de 2-3 órdenes de magnitud en los títulos virales de los ojos de los animales tratados, resultando también en este caso una diferencia significativa utilizando el mismo estadístico. A partir del día 3 p.i., los títulos virales de los aislamientos correspondientes al grupo control comenzaron a decaer, y no se detectó infectividad viral en el día 4 p.i., tal como se describe en la bibliografía.

La disminución de los títulos virales observada en los grupos de animales pre y post-tratados con MAS en el momento de replicación viral máxima (día 2 p.i.) sugiere que MAS actuaría inhibiendo la multiplicación de HSV-1 en los ojos.

## Discusión

Numerosas familias de virus utilizan la vía endocítica para infectar la célula huésped como medio para internalizarse o como

vía para trasladarse al sitio de replicación. Dentro del endosoma el virus todavía se encuentra en el espacio extracelular y necesita fusionarse con la membrana del endosoma para ingresar al citoplasma. En la actualidad se conoce que además del proceso endocítico clásico, que comprende la denominada endocitosis mediada por receptor en la que participan las fosas recubiertas de clatrina, los virus utilizan otras vías como la macropinocitosis, vesículas no cubiertas de clatrina y otras formas de ingreso [33].

Los resultados que se presentan en este trabajo, utilizando como modelo de estudio una cepa de VJ aislada de un caso leve de fiebre hemorrágica argentina [12], indican que MA es un potente inhibidor de la multiplicación viral en cultivos celulares y que el bloqueo ocurre porque el desnudamiento de las partículas virales no tiene lugar.

Resultados similares se obtuvieron con el virus VSV en dos sistemas celulares, Vero y BHK21, en los que el ciclo de infección se bloquea porque el desnudamiento de la nucleocápside no tiene lugar [10]. Hay pruebas en apoyo de esta afirmación, cuando el virus se fuerza a ingresar a la célula por fusión de su envoltura con la membrana plasmática, evitando el camino endocítico, el efecto inhibitorio se revierte significativamente [10]. También se observó mediante la técnica de inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos contra la proteína M de VSV, que en las células tratadas con MA las partículas virales permanecen dentro de los endosomas.

Hemos demostrado que el tratamiento con MA provoca el incremento del pH de las vesículas ácidas intracelulares [37]. Este efecto es similar al que produce el tratamiento con cloruro de amonio o cloroquina. Sin embargo, la acción del cloruro de amonio es reversible, mientras que una vez que MA induce un estado antiviral, éste persiste al menos por 12 horas [6]. Llamativamente, se ha demostrado que la basificación de los endosomas persiste aproximadamente ese mismo tiempo [10], lo que sugiere una correlación directa entre ambos eventos. Así es de esperar que los virus que ingresan a la célula por endocitosis sean afectados por MA y esto es lo que hemos encontrado en los virus

testeados. Además de los nombrados, también podemos incluir al virus Sindbis [36] y al virus de la fiebre aftosa [37].

El análisis del efecto de MA agregada a tiempos tardíos de la infección reveló que a diferencia de la escasa inhibición tanto de la infectividad asociada a células como de la expresión de antígeno viral, la producción de virus extracelular resultó fuertemente inhibida lo cual indica que MA produce una acumulación de progenie viral en la célula impidiendo la liberación de partículas virales infecciosas al medio extracelular. Por otra parte, los ensayos de inmunofluorescencia específica, citoplasmática y de membrana, demostraron que MA no afecta el transporte de las glicoproteínas virales a la membrana celular. De lo expuesto, se puede inferir que MA no estaría afectando la morfogénesis de las partículas virales sino la brotación, aunque la reducción en la actividad fusogénica en presencia de MA podría estar indicando la expresión en la membrana de glicoproteínas virales con alteraciones en su procesamiento. Es interesante agregar que observaciones similares se realizaron con la infección de células Vero con HSV-1 en presencia de MA. El HSV-1 ingresa a las células por un mecanismo de fusión de membranas en las que intervienen sus numerosas glicoproteínas. En este caso, MA sólo impide la maduración y egreso de las partículas virales [3]. En ese sentido MA parecería funcionar como la brefeldina A que afecta la producción de HSV-1 [17], indicando que MA actúa sobre el sistema de Golgi.

En resumen: sobre el mecanismo de acción de MA como antiviral podemos señalar que impide el ingreso de los virus que usan la vía endocítica y el egreso de aquéllos, que por ser envueltos, necesitan un Golgi funcional. En consecuencia, para el virus Junín MA tiene más de un blanco de acción antiviral: el ingreso del virus parental y el egreso de la progenie.

No se conocen antivirales específicos para el tratamiento del virus Junín si bien se han ensayado en cultivos celulares compuestos de diferente naturaleza química capaces de inhibir la replicación del virus [7], [13], [38]. Los estudios en modelos animales [39] y en

humanos [21] se han realizado solamente con ribavirina, un antiviral de amplio espectro [32], sin demasiado éxito. Los datos aportados en este trabajo y los ya publicados indicarían que MA debe ser un compuesto apropiado para ensayar su acción en modelos animales. Al respecto hay que destacar que extractos crudos de *M. azedarach* impidieron el desarrollo de la encefalitis en ratones infectados con virus Tacaribe, un arenavirus estrechamente relacionado antigénicamente al virus Junín [18].

La oportunidad de probar la eficacia de MA en un modelo animal se facilitó por el gran número de experiencias realizadas en un modelo murino que remeda la queratitis herpética ocular en el hombre. Los resultados presentados en este trabajo y en los trabajos publicados por nosotros en revistas especializadas [1], [2], [29] muestran inequívocamente que MA inhibe el desarrollo de la QH cuando es aplicada antes y después de la infección corneal con HSV-1. Asimismo, se podría inferir que el modo de acción sería diferente en ambos tipos de tratamiento.

Dado que MA tiene un marcado efecto inmunomodulador sobre el sistema inmune de ratón [19], podemos concluir que, cuando MA es suministrada a las 96 h.p.i., la inhibición de la QH podría deberse a la acción inmunomoduladora de la MA, pues en ese momento ya no se detecta multiplicación viral en la córnea. Los resultados obtenidos con el tratamiento con MA a las 24 h.p.i. indican que ambas propiedades, antiviral e inmunomoduladora, serían necesarias para limitar el desarrollo de la QH.

### Agradecimientos

El aporte financiero del CONICET y de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires permitieron la realización de las presentes investigaciones.

Agradecemos la colaboración del técnico Sr. Guillermo Assad Ferek en la purificación del material vegetal.

### Referencias

[1] Alché L., Berra A., Veloso M.J. and Coto C.E.,



- J. Med. Virol.* 61, 474 (2000).
- [2] Alché L.E., Berra, A. and Coto C.E., *International Antiviral News* 9, 132 (2001).
- [3] Alché L.E., Barquero A.A., San Juan N.A. and Coto C.E., *Phytotherapy Research* 16, 1 (2002).
- [4] Alché L.E., Assad-Ferek G., Meo M., Coto C.E. and Maier M., (enviado a *Zeitschrift für Naturforschung* 2002).
- [5] Andrei G.M., Coto C.E. and de Torres R.A. *Rta. Arg. de Microbiol.* 17, 177 (1985).
- [6] Andrei G.M., Damonte E.B., de Torres R.A. and Coto C.E., *Antiviral Res.* 9, 221 (1988).
- [7] Andrei G.M. and De Clercq E., *Antiviral Research* 14, 287 (1990).
- [8] Andrei G.M., Couto A.S., Lederkremer R.M. and Coto C.E., *Antiviral. Chem. Chemother.* 5, 105 (1994).
- [9] Baena-Cagnani C.E. et al. *Allergo Immunopathol.* 15, 393 (1987).
- [10] Barquero A.A. Actividad antiviral presente en hojas de *Melia azedarach* L: modelo de acción contra el virus VSV. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, (2001).
- [11] Bohnenstengel F.I., Wray V., Witte L., Srivastava R.P., Proksch P. *Phytochemistry* 50, 977 (1999).
- [12] Candurra N.A., Damonte E.B., Coto C.E., *J. Med. Virol.* 27, 145 (1989).
- [13] Candurra N.A., Maskin L. and Damonte E.B., *Antiviral Research* 31, 149 (1996).
- [14] Castilla V., Mersich S.E., Candurra N.A., Damonte E.B., *Arch. Virol.* 136, 363 (1994).
- [15] Castilla V. and Mersich S.E., *Arch. Virol.* 141, 1307 (1996).
- [16] Castilla V., Barquero A.A., Mersich S.E. and Coto C.E., *Antimicrobial Agents* 10, 67 (1998).
- [17] Huang R.C., Okamura H., Iwagawa T., Tadera K. and Nakatani M. *Phytochemistry* 38, 593 (1995).
- [18] Coulombié F., Andrei G.M., Laguens R.P., de Torres R.A. and Coto C.E., *Phytotherapy Research* 6, 15, (1992).
- [19] Courrèges M.C., Benencia F., Coulombié F.C. and Coto C.E., *Phytomedicine* 5, 47 (1998).
- [20] Descalzo A. Propiedades de hongos del género *Alternaria* aislados a partir de hojas de *Melia azedarach* L. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Tesis de Doctorado de la Universidad de Buenos Aires (1991).
- [21] Enría D.A and Maiztegui J.I., *Antiviral Research* 23, 23 (1994).
- [22] Kataria H.C., *Oriental J. Chem* 10, 178 (1994).
- [23] Keys, J.D., *Chinese Herbs. Their Botany, Chemistry & Pharmacodynamics*, Charles Tuttle. Tokyo (1976).
- [24] Khan M.R., Kihara M., Omoloso A.D., *Fitoterapia* 72, 423 (2001).
- [25] Khory R.N. and Katrak N.N., *Materia Medica of India and their Therapeutics*. Neeraj Pub. House, Delhi (1981).
- [26] Mackinnon S., Durst T., Angerhofer C., Pezzuto J., Sánchez-Vindas P.E, Gbeassor M., *J. Nat. Prod.* 60, 336 (1997).
- [27] Marsh M. and Helenius A., *Adv. Virus Res.* 36, 107 (1989).
- [28] Mulla M.S. and Su T., *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 15, 133 (1999).
- [29] Pifarré M.P., Berra A., Coto C.E. and Alché L.E. *Experimental Eye Research* 75, 327 (2002).
- [30] Sánchez A., Pifat D.Y., Kenyon R.H., Peters C.J., Mc Cormick J.B., Hiley M.P., *J. Gen. Virol.* 70, 1125 (1989).
- [31] Sandstrom I.K., Foster C.S., Wills P.A., Knipe D., Caron L. and Greene M.I., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 40, 326 (1986).
- [32] Sidwell R.W. Rivabirin. In-vitro antiviral activity. In: *Rivabirin, a Broad Spectrum Antiviral Agent*, pp 23-42- R.A. Smith and W. Kirpatrick W. (Editores) New York. Academic Press (1980).
- [33] Siczarski S.B. and Whittaker G.R., *J. of General Virology* 83, 1535 (2002).
- [34] Villamil S.M., Alché L.E., Coto C.E., *Antiviral Chem. Chemother.* 6, 239 (1995).
- [35] Wachsmann M., Martino V., Gutkind G.O., Coussio J.D., Coto C.E. and de Torres R.A., *Fitoterapia* 53, 167 (1982).
- [36] Wachsmann M.B., Damonte E. B., Coto C.E. and de Torres R.A., *Antiviral Research.* 8, 1 (1987).
- [37] Wachsmann M.B., Castilla V. and Coto C.E., *Arch. Virol.* 143, 581 (1998).
- [38] Wachsmann M.B., López E.M.F., Ramírez J.A., Galagovsky L. and Coto C.E., *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 11: 71 (2000).
- [39] Weissenbacher M.C., Avila M.M., Calello M.A., Merani M.S., Mc Cormick J.B. and Rodríguez M., *Medical Microbiology and Immunology* 175, 183 (1986).
- [40] White J.M., *Ann. Rev. Physiol.* 52, 675 (1990).
- [41] Zakir-ur-Rahman, Ahmed S. et al. *Pakistan J. Pharm. Sciences* 4, 153 (1991).

Manuscrito recibido y aceptado en julio de 2002.