

Tesis de Posgrado

Actividad antiviral presente en hojas de *Melia azedarach* L.: modelo de acción contra el virus de la estomatitis vesicular

Barquero, Andrea A.

2001

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:

Barquero, Andrea A.. (2001). Actividad antiviral presente en hojas de *Melia azedarach* L.: modelo de acción contra el virus de la estomatitis vesicular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3369_Barquero.pdf

Cita tipo Chicago:

Barquero, Andrea A.. "Actividad antiviral presente en hojas de *Melia azedarach* L.: modelo de acción contra el virus de la estomatitis vesicular". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3369_Barquero.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 presente en hojas de
Melia azedarach L.: modelo de acción contra
el virus de la estomatitis vesicular.*

Autora: Lic. Andrea A. Barquero

Directora: Dra. Celia E. Coto

Trabajo de tesis presentado para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

*Laboratorio de Virología
Departamento de Química Biológica
FCEyN UBA*

2001

A JUANI
por darle sentido a mi vida

A MAMI Y A JORGE
por apoyarme en forma incondicional

A ALE

AGRADECIMIENTOS

A mi JEFA....Ud. más que nadie sabe lo que me cuesta llevar al papel las cosas que pasan por mi cabeza, me resulta aún peor tratar de escribir lo que siento en este momento en mi corazón. Estoy segura que todas las palabras serán pocas, y por más que me esfuerce me voy a quedar corta con todo lo que debo agradecerle, pero lo voy a intentar porque Ud. se lo merece:

Gracias Dra. Coto por estar ahí aquel día que vine al laboratorio en busca, ahora lo sé, de mi destino. Gracias por estar hoy, en el final de esta etapa, más cerca que nunca. Gracias por estar siempre que la necesité.

Gracias por enseñarme a querer a la ciencia y no creer que es un trabajo como cualquier otro. Gracias por formarme con la cuota justa de independencia y dependencia como para saber cuando podía volar y cuando tenía que aterrizar, aunque más de una vez hizo falta un pedrazo.

Gracias por pensar que valía la pena el esfuerzo de encaminar mi vocación por la ciencia. La facultad me dio las herramientas necesarias para convertirme en una investigadora pero sin Ud. no hubiese aprendido a utilizarlas, espero no haberla decepcionado. Una vez más.....Gracias!!!!.

A mis compañeros del Lab.:

A Laura: me encanta trabajar con vos, creo que hacemos un buen equipo y además de darte las gracias por tu incondicional presencia y predisposición me gustaría decirte gracias por darme ánimo, valor, confianza en mí misma y por enseñarme a seguir adelante con todo, lo bueno y lo malo, que nos toca vivir. Ahh! y gracias por tu paciencia a la hora de sentarnos a escribir.

A Luis: todos saben lo MARAVILLOSO ser humano que sos, así que no me voy a poner a enumerar las cualidades que te llevaron a ganarte ese título tan merecido. Lo que quiero decirte es lo siguiente: tu infinita capacidad de dar sin esperar nada a cambio y tu absoluta incapacidad de lastimar a alguien intencionalmente, no dejan de sorprenderme día a día. Espero nunca tener que extrañarte porque, por si no lo sabés, realmente ocupás un lugar muy especial en mi corazón. Así que una vez más ...gracias por ser como sos. En lo que respecta a la tesis en sí, gracias por tu colaboración en los experimentos de fosforilación, aunque en un par de ocasiones más que una colaboración fue un desastre!!!.

A Nelly: requeterrecontra Gracias!! por brindarte sin límite para ayudarme siempre que lo necesité, por tratar de solucionar aún lo que no estaba a tu alcance. Sos una máquina que no para de andar, por eso, gracias por contagiarme con tus energías cuando más de una vez intenté bajar los brazos. Te quiero mucho.

A Vivi: gracias por tu serenidad, por tu claridad para ver las cosas y resolver los problemas. Gracias por tus consejos dentro y fuera del Lab, gracias por escucharme.

A Isa: gracias por cuidarme y por preocuparte por mí, gracias por ese hombro que siempre está. Y por supuesto gracias por los kilos de hojas que hubo que procesar para poder realizar este trabajo.

A Josefina: cómo olvidar aquellos gloriosos días de becarias donde la consiga era ..repetir, repetir y repetir. Tanto repetimos que por fin llegamos. Gracias por alentarme siempre, gracias por tu optimismo que me hizo ver el vaso medio lleno cuando para mí estaba medio vacío.

A las Chichis: que fueron llegando al Lab. como yo, con ganas de trabajar y de aprender el duro oficio de hacer ciencia. Gracias por los momentos compartidos, por avisarme de las “goteras”, por renovarme el ánimo con una palabra de aliento o con un tequila, por escucharme. Cybele, Sandra, Poli, Paula, Erina, Vanesa, Nati, simplemente gracias por aguantarme y,aguante “el cristal violeta y vení vení”.

A los Muchachos: gracias por la cuota de humor. Para Carlos y Félix va este.....”y qué másssss hija, cuenta, cuenta”.

A la Dra. Damonte, Dra. Mersich, Mónica, Patricia y Guille: gracias por prestarme su atención y colaboración desde un primer momento.

A los que pasaron: Ceci, Sole, Fabián, Bessie, gracias por ser tan especiales.

A mis compañeros de área:

A Ernesto: gracias por ser tan querible y por hacerme sentir que más de una vez estuvo preocupado por mí.

Al resto de los integrantes de los lab. de Inmunoquímica y Genética Bacteriana por las horas imperdibles compartidas en el comedor y por los saludos cordiales.

A la Dra. Sivia Moreno: gracias por aceptar ser mi consejera de estudios, gracias por guiarme en la difícil tarea que nos resultó encarar los experimentos de fosforilación. Gracias por tan buena predisposición.

A mis compañeros de carrera:

A Paula, Javier y Carlos, si tuviese que volver a cursar (es un decir), definitivamente lo volvería a hacer con Uds.. Gracias por permanecer a mi lado, aún más allá de las distancias.

A mis compañeros en la vida:

mis abuelos Sista y Juan (ojalá Juani te hubiese podido conocer), a mis primas (María Laura, Sivana y Flor), a mis tíos, a mis amigos de fierro y a todos los que de alguna forma u otra me apoyaron para que yo pudiese cumplir mi sueño.

A TODOS... Gracias por estar a mi lado, los necesito mucho a todos y cada uno de Uds.

RESUMEN

Meliacina (MA), un principio antiviral presente en las hojas de la planta *Melia azedarach* L., es capaz de inhibir in-vitro la multiplicación de un amplio espectro de virus, algunos patógenos para el hombre como HSV-1 y el virus Junín (agente de la fiebre hemorrágica argentina), entre otros. El tratamiento con MA de células en cultivo antes de la infección (pretratamiento) también desencadena un estado antiviral que afecta la multiplicación de diferentes virus. En el presente trabajo de tesis los objetivos planteados fueron, caracterizar el establecimiento del estado refractario a la infección viral en células Vero y determinar el mecanismo de acción de MA sobre el virus de la estomatitis vesicular (VSV), elegido como modelo de estudio. Los resultados obtenidos al utilizar inhibidores de diferentes funciones o procesos celulares permiten concluir que para inducir el estado antiviral MA no requiere de los mecanismos de transcripción y traducción celulares activos; ni de la participación de la PKR ni de ninguna otra quinasa o fosfatasa de Ser/Thr, mientras que, tanto la actinomicina D como el vanadato y la tirfostina B46 potenciaron su establecimiento. Al estudiar el efecto de MA sobre distintos pasos del ciclo de multiplicación de VSV se logró identificar al desnudamiento y al transporte de la glicoproteína G como los blancos de acción del pre y del post-tratamiento, respectivamente. Considerando que, ambos procesos tienen lugar en compartimentos celulares ácidos (endosomas y sistema de Golgi) y que hay una correlación entre la acción antiviral y la basificación que MA provoca en los endosomas, se plantea la hipótesis de que la acción antiviral de MA es una consecuencia directa de su efecto sobre la ATPasa vacuolar responsable de la acidificación de dichas organelas.

Palabras clave: meliacina, VSV, *M. azedarach* L., antiviral, V-ATPasa.

SUMMARY

Meliacine (MA), an antiviral compound present in purified leaf extracts of *Melia azedarach* L., exhibits a broad range of virus inhibition in-vitro. Besides, the pretreatment of cells with MA induces an antiviral state refractory to viral infection. The objectives of the present thesis work was to characterize the antiviral state triggers in cells by MA and to reveal the stage of VSV virus replication in Vero cells, used as a model system, affected by the antiviral.

Using several inhibitors to characterize the induction of the antiviral state, we have found that transcription and translation protein processes are not necessary. The enzymatic activity of PKR, Ser/Thr kinases or phosphatases are not required for the establishment of the antiviral state. Whereas, actinomycin D, sodium vanadate and tyrphostin B46 used in combination with MA during pre-treatment significantly enhance the antiviral activity against VSV.

The antiviral effect of MA in Vero or BHK-21 cells pre or post-treated prevents virus uncoating and blocks the transport of VSV-G protein to the plasma membrane. It was found that MA raised the pH within the endosomes, this effect was in correlation with the antiviral state duration.

Taking into account that vacuolar type ATPase is responsible for maintaining the lower intraluminal pH in endosomes and Golgi complex we propose here that the inhibition of VSV uncoating and the block in the transport of G protein may be related to the effect of MA on the V-ATPase-mediated acidification

Key words: meliacine, VSV, *M. azedarach* L., antiviral, V-ATPase.

ABREVIATURAS

2-AP: 2-aminopurina

Act D: actinomicina D

CA: caliculina A

CC: control de células

CV: control de virus

CHX: cicloheximida

GEN: genisteína

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IFN: interferón

m.i.: multiplicidad de infección

MA: meliacina

Mab: anticuerpo monoclonal

OKA: ácido okadaico

PK: proteinasa K

QT: quimotripsina

Ser: serina

STA: estaurosporina

Thr: treonina

Tir B46: tirfostina B46

Tyr: tirosina

UFP: unidad formadora de placa

VAN: vanadato

V-ATPasa: ATPasa vacuolar

VSV: virus de la estomatitis vesicular

WGA: aglutinina de germen de trigo

INDICE

INTRODUCCION

1. ANTIVIRALES	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Los primeros antivirales	2
1.3. Ciclo de multiplicación viral	3
1.4. Mecanismo de acción de los antivirales de uso clínico en la actualidad	6
1.5. Mecanismo de acción de drogas en estudio	14
1.6. Problemas que enfrenta la terapia antiviral	15
1.7. Compuestos de origen natural con actividad antiviral	16
2. MELIACINA	19
2.1. Actividad antiviral in-vitro	19
2.2. Actividad antiviral in-vivo	21
2.3. Basificación de los endosomas	22
2.4. Actividad inmunomoduladora	23
2.5. Naturaleza del principio activo	24
3. VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR	26
3.1. Generalidades	26
3.2. Estructura del virión	26
3.3. Estructura del genoma	27
3.4. Ciclo de multiplicación	28
a) Adsorción	28
b) Penetración	28
c) Desnudamiento	29
d) Transcripción	31

e) Replicación	32
f) Ensamblaje y brotación	32
3.5. Procesamiento post-traducciona de las proteínas de VSV	33
a) Glicosilación	33
b) Fosforilación	34
 4. PARTICIPACION DEL SISTEMA VACUOLAR CENTRAL EN LA MULTIPLICACION DE LOS VIRUS.	 36
 OBJETIVOS	 36'
 MATERIALES Y METODOS	
 Células	 37
Obtención de meliacina	37
Virus	37
Ensayo de cuantificación viral por el método de placas	38
Drogas	38
Ensayo de citotoxicidad	38
Ensayo antiviral por el método de reducción en el número de placas o plaqueo directo	39
Inhibición del rendimiento viral	39
Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	39
Doble marcación	40
Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	40
Análisis de la síntesis de proteínas	41
Ensayo con naranja de acridina	41
Obtención y purificación de un stock de VSV marcado con ³⁵ S-metionina	41
Ensayo de adsorción a 0°C	42
Ensayo de adsorción a 37°C	42
Ensayo de internalización	43

Purificación de VSV	43
Obtención de extractos celulares	44
Ensayo de fosforilación in-vitro	44
Ensayo de fosforilación in-vivo	44
“Inmunoblotting” anti-P _{VSV}	45

RESULTADOS

PRIMERA PARTE

1. PRETRATAMIENTO	46
1.1. Caracterización del estado refractario a la infección viral inducido por MA.	46
1.1.a. Efecto de la concentración de MA.	46
1.1.b. Efecto de la temperatura y tiempo de tratamiento.	47
1.1.c. Hipótesis del receptor.	49
1.1.d. Efecto de la cicloheximida y la actinomicina D.	50
1.1.e. Efecto de distintos inhibidores de quinasas y fosfatasas.	50
Inhibidor de PKR.	50
Inhibidores de tirosinas quinasas y fosfatasas	52
Inhibidores de serina/treonina quinasas y fosfatasas.	55
1.1.f. Comparación con el sistema IFN.	56
1.2. Determinación de la etapa del ciclo de multiplicación de VSV afectada por el pretratamiento con MA.	59
1.2.a. Efecto del pretratamiento con MA sobre la síntesis de proteínas virales.	59
1.2.b. Efecto del pretratamiento con MA sobre las etapas tempranas del ciclo de VSV.	60
Adsorción a 0°C.	62
Adsorción a 37°C.	63
Efecto de MA sobre la internalización y degradación de VSV	64
Observaciones morfológicas.	66

1.2.c. Efecto del pretratamiento con MA sobre la capacidad fusogénica de VSV.	66
1.2.d. Relación entre la basificación de los endosomas versus la inhibición en células pretratadas con MA.	71
SEGUNDA PARTE	
2. POSTRATAMIENTO	75
2.1. Curva dosis-respuesta obtenida con el postratamiento con MA	75
2.2. Efecto del tiempo de agregado de MA.	76
2.3. Determinación de la etapa del ciclo de multiplicación de VSV afectada por el postratamiento con MA.	76
2.3.a. Efecto sobre la síntesis de proteínas virales	77
2.3.b. Efecto sobre la fosforilación de las proteínas de VSV	78
Ensayos de fosforilación in-vitro	78
Ensayos de fosforilación in-vivo	80
2.3.c. Distribución intracelular de las proteínas M y G en células tratadas con MA	82
2.3.d. Transporte a la membrana de la proteína G en células tratadas con MA	84
2.3.e. Co-localización intracelular de la proteína G en las células tratadas con MA	84
DISCUSION	88
BIBLIOGRAFIA	94

INTRODUCCIÓN

1. ANTIVIRALES.

1.1. Generalidades.

Hasta el presente, la terapia antiviral, no ha logrado avanzar al ritmo que lo ha hecho la quimioterapia antibacteriana desde el descubrimiento de la penicilina. Las razones por las cuales, el número de drogas antivirales autorizadas para usar en el tratamiento de las enfermedades de origen viral es tan acotado, son varias:

- 1) Los virus, como parásitos intracelulares obligados, invaden la célula huésped utilizando sus mecanismos bioquímicos para fabricar nuevo material genético y proteínas virales. De este modo, ofrecen menos características bioquímicas propias que puedan ser blanco de drogas que actúen selectivamente sin afectar el metabolismo celular, evitando así, efectos tóxicos no deseados.
- 2) Algunos de los virus de importancia sanitaria son difíciles o imposibles de cultivar en condiciones in-vitro (ej. virus de la hepatitis B o C y papiloma), incluso, en algunos casos no se dispone de modelos animales que reproduzcan la enfermedad humana (ej. sarampión y hepatitis C), dificultando la investigación y el desarrollo de compuestos seguros y eficaces.
- 3) Muchas de las infecciones causadas por virus son benignas, limitadas y de corta duración, para cuando el paciente desarrolla los síntomas, el virus ya no está multiplicando y ha sido eliminado del organismo. Además, no siempre la sintomatología indica con certeza de qué virus se trata y teniendo en cuenta las diferencias en el modo de replicación hay que identificar al virus para usar el antiviral apropiado. En consecuencia se requiere, por un lado, que el índice terapéutico (eficacia/toxicidad) sea extremadamente alto para que la terapia se justifique, y por el otro, se necesita de un diagnóstico virológico rápido para que el antiviral se administre en el momento indicado y la terapia resulte efectiva. Existen, sin embargo, excepciones a este principio como la encefalitis producida por herpesvirus, las infecciones causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), por el virus de la hepatitis C, las fiebres hemorrágicas virales en las que la gravedad de la situación podría justificar el uso de una droga sin un perfil ideal.
- 4) Se han desarrollado vacunas para la prevención de varias infecciones virales severas.
- 5) La quimioterapia antiviral resulta una investigación de alto riesgo para la industria farmacéutica.

Por las razones expuestas, el desarrollo de la terapia antiviral está dirigido principalmente a las infecciones que: 1) no son controlables por medio de vacunas, 2) afectan a un número elevado de personas, 3) pueden ser diagnosticadas rápidamente, 4) son relativamente severas y 5) requieren un largo período de tratamiento o profilaxis. En la actualidad, la mayoría de los esfuerzos están destinados a encontrar un tratamiento para las infecciones causadas por herpesvirus, HIV, hepatitis C, influenza y rinovirus.

1.2. Los primeros antivirales.

En la década del 50 se describió el primer compuesto con actividad antiviral in-vitro, la tiosemicarbazona (Harne y col.), un antibiótico que se usaba para el tratamiento de la tuberculosis. A comienzos de la década del 60, luego de los ensayos realizados en huevos embrionados y ratones que demostraron su acción inhibitoria contra el virus vaccinia, la tiosemicarbazona se administró en el hombre como profilaxis para la viruela, aunque sin beneficios reales. Los análogos de nucleósidos fueron en cambio, los protagonistas indiscutibles que marcaron el comienzo de la terapia antiviral.

En aquellos años, la síntesis de precursores de nucleótidos estaba en auge como estrategia para impedir la rápida proliferación de las células tumorales ya que se buscaban compuestos capaces de bloquear la replicación del ADN. El mismo razonamiento se podía aplicar a los virus cuyo material genético era ADN, como los herpesvirus, puesto que un agente que inhibiera la síntesis de ADN podría interferir con la multiplicación viral.

La iododeoxiuridina fue la primer droga antiviral aprobada en el año 1962 por la FDA (Food and Drug Administration de los Estados Unidos) para el tratamiento tópico de la queratitis herpética. Este compuesto fue muy importante porque, a pesar de sus limitaciones, demostró que era posible tratar con éxito una enfermedad de origen viral y además, centró la atención de los investigadores en los análogos de nucleósidos como potenciales agentes antivirales.

Diez años más tarde, en 1972, la FDA aprobó el uso de la vidarabina (Ara-A) para el tratamiento de la queratitis y encefalitis herpéticas. Fue el primer análogo de nucleósido utilizado sistémicamente, demostrando que un antiviral podía ser administrado por esta vía sin causar efectos secundarios serios en el paciente.

Pero sin lugar a dudas, fue el descubrimiento del aciclovir (ACV) en 1977 el que revolucionó la terapia antiviral. Potente inhibidor del virus herpes simplex (HSV), gracias a

sus dos propiedades, alta selectividad y baja toxicidad, se convirtió en el primer agente antiviral verdadero (De Clercq 1997a, Jones, Darby 1995).

1.3. Ciclo de multiplicación viral.

Antes de considerar los mecanismos de acción de algunos de los antivirales que actualmente se usan en la clínica, sería conveniente describir brevemente cómo multiplican los virus. Básicamente, el ciclo de multiplicación viral puede ser dividido en las siguientes etapas principales (ver figura 1):

- 1) La **adsorción** es el primer paso de la infección y consiste en la unión específica de una proteína de la superficie del virión, denominada antirreceptor, con un componente de la membrana celular, por lo general de naturaleza glicoproteica, llamado receptor. Esta etapa del ciclo es reversible, requiere la presencia de iones en el medio para reducir la repulsión electroestática, pero es independiente del gasto de energía.
- 2) La segunda etapa, la **penetración o internalización**, requiere gasto de energía y ocurre casi instantáneamente después de la adsorción. Dependiendo del tipo de virus, existen tres mecanismos por los cuales un virus puede entrar en la célula: 1) translocación de la partícula viral entera a través de la membrana plasmática; 2) endocitosis, que resulta en la acumulación de partículas virales dentro de vesículas citoplasmáticas; y 3) fusión a nivel de la membrana plasmática. Los virus pertenecientes a las familias *Paramyxoviridae* (virus Sendai), *Poxviridae* y *Herpesviridae* entran por este último mecanismo, mientras que la mayoría de los virus envueltos son internalizados por el mecanismo de endocitosis mediada por receptor. Para la entrada de los virus desnudos también existen dos posibilidades aunque los mecanismos están poco claros, en algunos casos la translocación se produciría a nivel de la membrana plasmática o alternativamente, las partículas virales son endocitadas.
- 3) El tercer paso en el ciclo replicativo de un virus es el **desnudamiento**. Se denomina así a los eventos que ocurren luego de la penetración y llevan a exponer el genoma viral para su posterior expresión y replicación. La forma en que el virus se desnuda depende del mecanismo utilizado para entrar a la célula huésped. En el caso de la entrada por translocación o fusión a nivel de la membrana plasmática el desnudamiento se produce simultáneamente con la penetración. Para los virus envueltos que entran por endocitosis, el desnudamiento se produce en las vesículas endocíticas, que maduran rápidamente a

endosomas y la acidificación de los mismos, por la acción de la bomba protónica H⁺-ATPasa vacuolar, dispara un cambio conformacional en las glicoproteínas virales que median la fusión entre la envoltura viral y la membrana endosomal. Para los virus sin envoltura que entran por endocitosis, no se ha establecido con precisión como se produce el desnudamiento, en algunos casos se postula la formación de un poro en la membrana endosomal, en otros casos directamente la lisis del endosoma.

- 4) La etapa siguiente consiste en la **expresión y la replicación del material genético** del virus, la misma involucra la síntesis de proteínas tempranas, la replicación del genoma viral y la síntesis de proteínas tardías. Para llevar a cabo estos eventos utilizando la maquinaria celular, los virus tienen distintas estrategias dependiendo del tipo y organización de su genoma dado que deben superar ciertas restricciones que la célula les impone. La célula no sintetiza ARN mensajero (ARNm) a partir de ARN; carece de enzimas que transcriban ADN en el citoplasma; la célula sólo traduce ARNm monocistrónico. En consecuencia, los virus han adquirido enzimas propias para poder completar su ciclo de multiplicación. Por ejemplo, en el caso de los retrovirus, poseen una transcriptasa reversa (TR) que sintetiza ADN doble cadena utilizando como molde ARN. Los poxvirus, que multiplican en el citoplasma, además de tener polimerasas, tienen una batería de enzimas como fosfatasas y timidino quinasas asociadas al virión.
- 5) El quinto paso, el **ensamblaje**, constituye la unión de las proteínas estructurales con el ácido nucleico para formar una partícula viral madura. En este caso, también existen distintos mecanismos por los cuales puede llevarse a cabo este evento dependiendo de la estructura del virión y del sitio de síntesis de cada una de las partes a reunir.
- 6) Finalmente, el ciclo de replicación termina con la **salida** del virus, es decir la liberación de las nuevas partículas infecciosas al exterior de la célula. En el caso de los virus desnudos, este paso se lleva a cabo mediante la lisis celular; en cambio los virus envueltos pueden brotar o lisar la célula huésped.

Como se mencionó previamente, en aquellos pasos o enzimas específicos de este ciclo de replicación está la clave para el desarrollo de agentes antivirales selectivos.

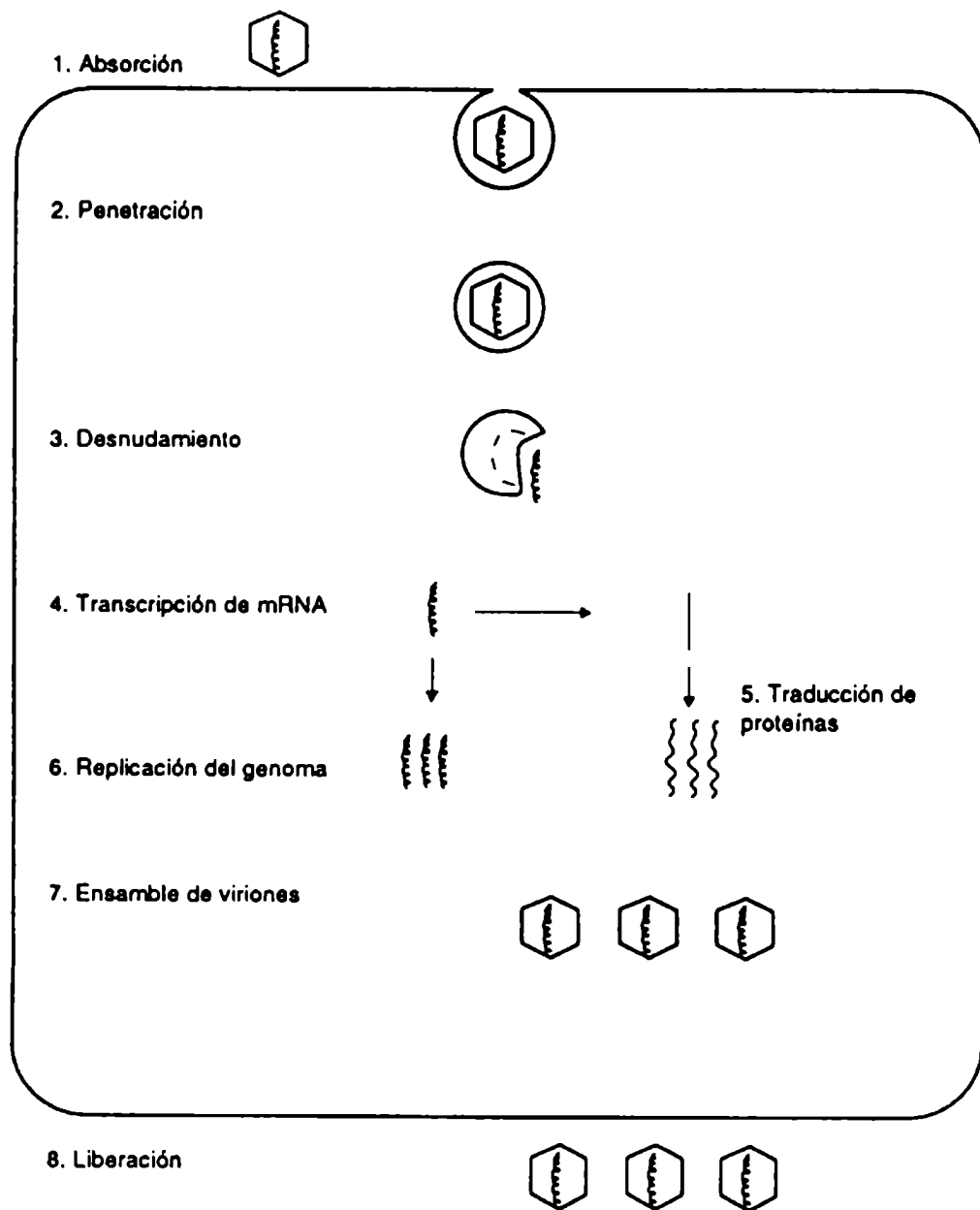
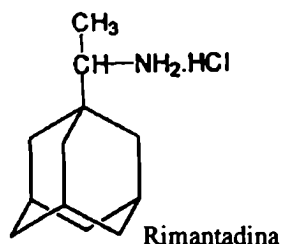
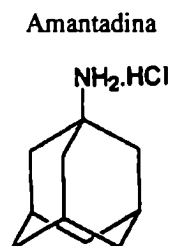


Figura 1. Esquema del ciclo de multiplicación viral de un virus desnudo (Damonte 1996).

1.4. Mecanismo de acción de los antivirales de uso clínico en la actualidad.

Amantadina y rimantadina.

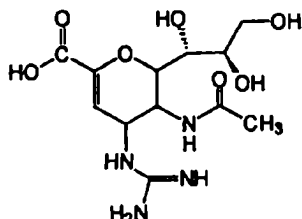


La amantadina es una amina sintética y la rimantadina un derivado de ella. El blanco de acción propuesto para la amantadina, establecido mediante la caracterización de mutantes resistentes

a la droga, es la proteína M_2 de Influenza A. M_2 está codificada por el segmento siete de ARN del genoma viral, es una proteína integral de membrana tipo III que se expone en la envoltura del virión como un homotetrámero. Cada monómero posee un dominio extracelular, uno transmembrana y otro citoplasmático, que contiene el extremo C-terminal, de 23, 19 y 54 aminoácidos cada uno, respectivamente. M_2 actúa como un canal iónico que, una vez que el virus fue endocitado, permite el pasaje de protones desde el endosoma al interior del virión. El cambio de pH en el interior del virión produce una perturbación de las interacciones proteína-proteína liberándose al núcleo la ribonucleoproteína de la proteína M_1 . Además del rol en el desnudamiento, M_2 disipa el gradiente de pH a través de la membrana del aparato de Golgi, lo cual para algunas cepas de Influenza A es esencial para mantener a la hemaglutinina en su forma metaestable pH-neutra.

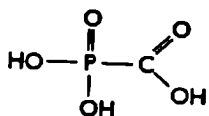
La amantadina se uniría al dominio transmembrana de la proteína M_2 provocando un bloqueo estérico del canal iónico, interfiriendo de este modo con el desnudamiento y/o ensamblaje del virus dependiendo de la cepa de Influenza A. Estudios de difracción de neutrones identificaron el sitio de unión de la amantadina entre los aminoácidos V27 y S31 de la región transmembrana de M_2 .

La amantadina se aprobó para su uso clínico en 1966 pero en 1979 se desarrolló un análogo más efectivo, con el mismo blanco de acción y que presentaba menores efectos secundarios, la rimantadina, aprobada para su uso clínico en 1993. Los efectos adversos que se producen en algunos pacientes están relacionados con desórdenes neurológicos. (Lin y col, Hay, Treanor y Falsey).



en la salida de los viriones de la célula infectada y también, intervendría en el movimiento del virus a través de la mucosa del tracto respiratorio.

Derivados del ácido neuramínico han sido descriptos como inhibidores de esta enzima, el primero, descubierto por Meindl y Tuppy en 1974 fue el ácido 2-deoxi-2,3-dehidro-*N*-acetilneuramínico (Neu5Ac2en). Sin embargo, ninguno de estos compuestos era apropiado como agente terapéutico ya que carecían de selectividad, pues también inhibían las sialidasas bacterianas y de mamíferos. Nuevos análogos del Neu5Ac2en se sintetizaron utilizando un diseño racional basado en la estructura cristalográfica de la NA de Influenza A. La droga más activa (4-guanidino-Neu5Ac2en, GG167 o Zanamivir) resultó ser un potente inhibidor específico tanto para la NA de Influenza A como para la de Influenza B. El zanamivir, aprobado recientemente para su uso clínico en el tratamiento de las infecciones causadas por Influenza A y B tiene una baja biodisponibilidad oral, se administra en forma intranasal, y no presenta efectos secundarios serios. (Shigeta, Jones, Treanor y Falsey).

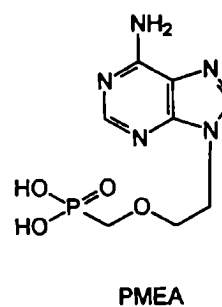
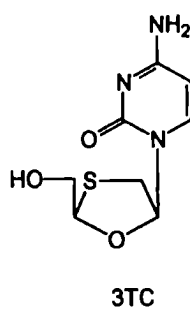
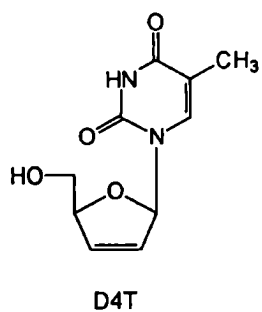
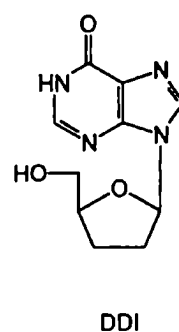
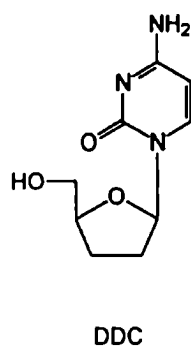
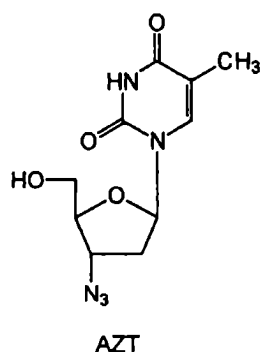


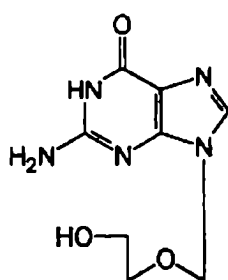
citomegalovirus en pacientes con SIDA. El foscarnet no necesita ser
 ulares o virales y actúa directamente a nivel de la síntesis de ADN de
 e la molécula interacciona con el sitio de unión del pirofosfato de la
 a inhición es no competitiva y lo que se bloquea es la formación de
 er entre la cadena de ADN en crecimiento y el nucleótido a ser
 hibe la TR de HIV y la ARN polimerasa ARN dependiente del virus

Influenza A. Los efectos secundarios observados en pacientes tratados con la droga se deben principalmente a su nefrotoxicidad. (Larson y Oberg, Whitley y Gnann, Balfour)

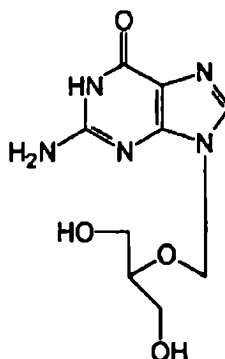
Análogos de nucleósidos y nucleótidos monofosfato.

Como ya fue mencionado, este grupo de drogas sintéticas revolucionó la terapia antiviral, ejemplos que se usan actualmente en la clínica son: zidovudina (AZT), didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), stavudina (d4T), lamivudina (3TC) y abacavir (PMEA) para el tratamiento de HIV; aciclovir (ACV), valaciclovir (forma oral del ACV), ganciclovir (GCV), penciclovir (PCV), famciclovir (forma oral del PCV), brivudina (BVDU) y cidofovir (HPMPC) para el tratamiento de diferentes herpesvirus y la ribavirina para el tratamiento de infecciones provocadas por virus respiratorio sincicial (RSV). Las moléculas que ya poseen un fosfato en su estructura son el PMEA y el HPMPC, el resto son análogos de diferentes nucleósidos por lo tanto no están fosforilados. Respecto del mecanismo de acción, todas actúan en forma similar (excepto la ribavirina que será considerada en un punto aparte) aunque varían en cuanto al espectro de acción, la selectividad y la efectividad que poseen.

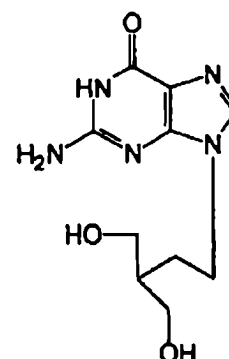




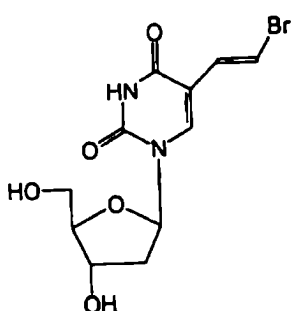
ACV



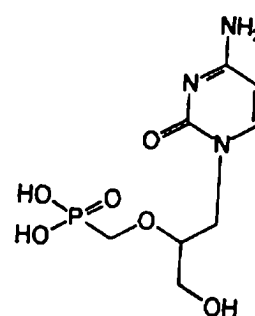
GCV



PCV



BVDU



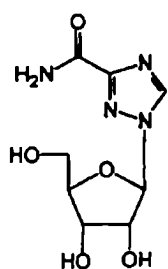
HPMPC

Normalmente en las células, los nucleósidos deben ser transformados a sus formas nucleotídicas trifosfato, por una serie de quinasas celulares, para poder ser incorporados a una cadena de ADN naciente. De igual modo los análogos de nucleósidos o de nucleótidos monofosfato deben ser trifosforilados para poder interferir con la maquinaria biosintética del ácido nucleico viral. Sin embargo, la acumulación de las formas mono, di y trifosfato de los análogos de nucleósidos resultan tóxicas para la célula, por lo tanto una característica deseada de estos compuestos es que sólo sean fosforilados en la célula infectada. Esta propiedad no es compartida por todos los integrantes de este grupo, tan sólo el ACV, el GCV, el PCV y la BVDU son monofosforilados por enzimas virales que están presentes únicamente en las células infectadas. En el caso del ACV, del GCV y del PCV el segundo y tercer paso de fosforilación lo llevan a cabo enzimas celulares; en cambio para la BVDU la incorporación del segundo fosfato también la realiza una enzima viral. El resto de los nucleósidos y los nucleótidos monofosfato son trifosforilados por la acción de quinasas celulares en todos los pasos.

Una vez activados los compuestos, a nivel de la ADN polimerasa o de la transcriptasa reversa viral pueden actuar de tres formas: como inhibidores competitivos de los sustratos naturales de la enzima, como sustratos alternativos que se incorporan internamente a la cadena, afectando la integridad y la estabilidad de la molécula de ADN o como terminadores de cadena porque se incorporan al ADN pero carecen de un OH en la posición 3' para que la elongación de la cadena continúe. Todas las formas trifosfato de las drogas mencionadas actúan como inhibidores competitivos pero solamente el GCV, el PCV y la BVUDU pueden ser incorporados internamente, el resto son terminadores de cadena obligados. La eficiencia de incorporación respecto de los sustratos naturales de las enzimas virales varían de un compuesto a otro, por ejemplo, mientras la TR de HIV incorpora con menor eficiencia el AZT y el 3TC que el dTTP y el dCTP, respectivamente, el d4T es incorporado con la misma cinética que el dTTP en la síntesis de ADN dependiente de ADN o de ARN (Vaccaro y col.). También, la especificidad por las enzimas virales respecto de las ADN polimerasas celulares, varía entre las distintas drogas, el ACV presenta una afinidad entre 10 y 30 veces mayor por la ADN polimerasa de HSV que la ADN polimerasa α (Whitley y Gnann).

En este punto cabe considerar en particular a la droga antiviral por excelencia, el ACV, que reúne en una sola molécula dos características que por sí solas no garantizan la ausencia o la disminución de los efectos secundarios que el tratamiento con este tipo de compuestos puede ocasionar en los pacientes: fosforilación específica por una enzima viral y terminador de cadena obligado. Ninguno de los otros análogos de nucleósidos o nucleótidos presenta ambas propiedades juntas ni ha podido superar la ausencia de efectos citotóxicos que posee el ACV. (Darby 1994, 1995, De Clercq 1995, 1997a y b)

Ribavirina.



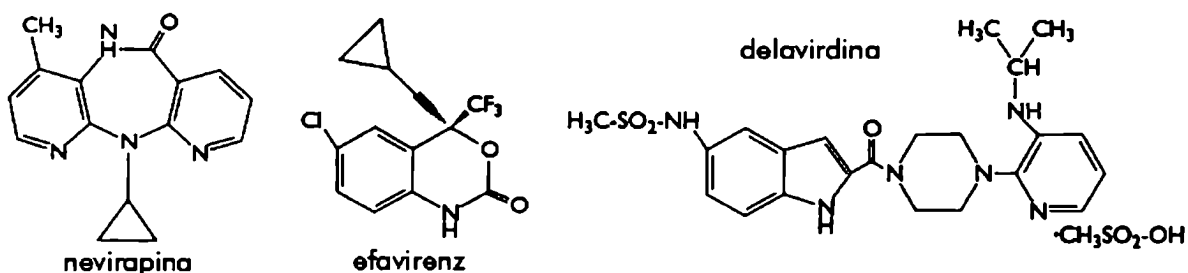
La ribavirina es un análogo de guanosina cuyo mecanismo de acción no ha sido claramente establecido pero difiere del expuesto en el punto 4 para los análogos de nucleósidos. In vitro, la ribavirina es activa contra una amplia variedad de ADN y ARN virus incluyendo los virus adeno, herpes, pox, picorna, toga, flavi, bunya, arena, reo, rhabdo y particularmente ortomixovirus. Se han propuesto tres mecanismos que pueden operar en células infectadas por diferentes virus, la forma monofosfato es un inhibidor competitivo de la inosín-monofosfato deshidrogenasa, provocando una disminución de la cantidad de guanina

intracelular necesaria tanto para la replicación celular como viral. La ribavirina trifosfato interfiere con el “capping” de los ARNm virales que dependen de la guanilil transferasa y también inhibe la ARN polimerasa ARN dependiente de los virus influenza, retrasando la iniciación y la elongación de los transcritos virales. El amplio espectro de acción antiviral observado in-vitro se atribuye al primer mecanismo descrito, sin embargo in-vivo presenta serios efectos secundarios relacionados con desórdenes hematológicos por eso en un principio sólo se administraba en forma de aerosol para el tratamiento de infecciones respiratorias severas por RSV en infantes. (Balfour, Shigeta, De Clercq 1997b)

Actualmente, también ha demostrado ser clínicamente efectiva para el tratamiento de infecciones causadas por virus Lassa (McCormick y col.) y más recientemente, la ribavirina administrada en cápsulas en combinación con Interferón- $\alpha 2$ recombinante inyectable, mostró ser muy beneficiosa para el tratamiento de la hepatitis C. A estos resultados se suma el hecho que se han descrito efectos inmunomoduladores de la ribavirina utilizando células T humanas que podrían explicar la acción sinérgica observada en combinación con el IFN (Sidwell).

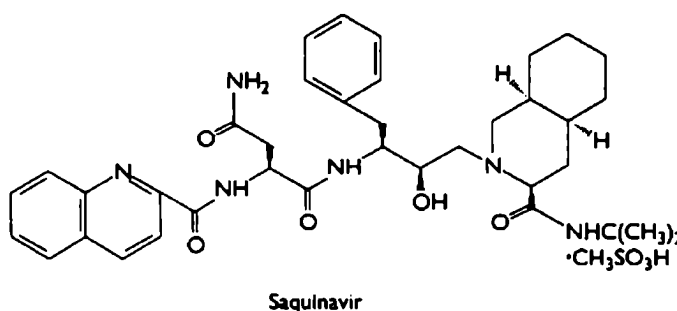
Inhibidores no nucleosídicos de la TR de HIV-1 (NNRTIs).

Dentro de este grupo se encuentran una serie de compuestos de los cuales están aprobados para su uso clínico tan sólo tres: la nevirapina, el efavirenz y la delavirdina. Si bien estas drogas tienen el mismo blanco de acción que los análogos de nucleósidos no actúan de igual modo. Los últimos, como se describió en el punto 4, interaccionan competitivamente con el sitio de unión de los sustratos. En cambio, los NNRTIs lo hacen en forma no competitiva con un sitio alostérico, funcionalmente y espacialmente relacionado pero diferente, del sitio de unión de los sustratos.



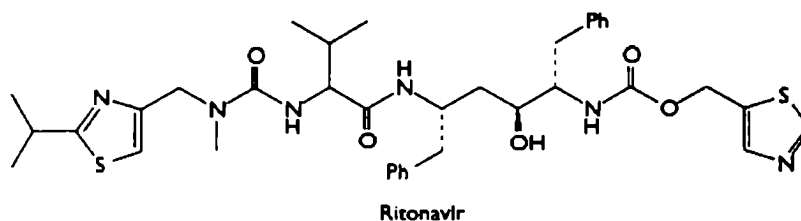
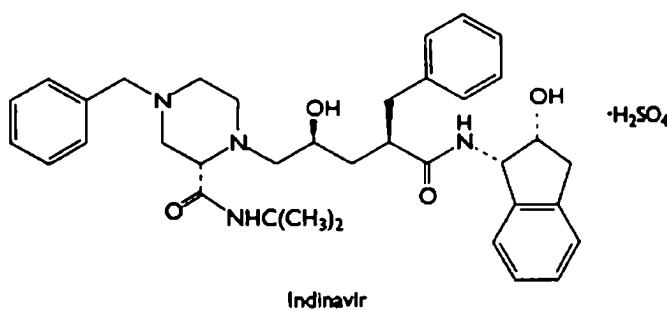
Este sitio particular corresponde a un bolsillo hidrofóbico, flexible que se encuentra exclusivamente en la TR de HIV-1. El bolsillo se abriría en presencia del inhibidor, y una vez en el interior, éste adoptaría una conformación de “mariposa” que interacciona con los restos aminoácidos circundantes mediante el establecimiento de fuerzas de Van der Waals. Por lo tanto, los NNRTIs poseen una especificidad única contra HIV-1. (De Clercq 1995, 1997b).

Inhibidores de la proteasa de HIV.



La proteasa de HIV es una aspartil proteasa codificada por el genoma viral, responsable del clivaje de los precursores proteicos *gag* y *gag-pol* (Pr55 y Pr160) en: las proteínas de la cápside p17, p24, p7 y p6, la proteasa

en sí misma (p11), la transcriptasa reversa (p66/p51) y la integrasa (p34). La proteólisis es necesaria para la maduración del virus y por lo tanto para la infectividad de la partícula. Los inhibidores aprobados hasta el presente son: el saquinavir, el ritonavir, el indinavir y el amprenavir. Todos constituyen “peptidomiméticos” ya que mimetizan la unión peptídica, que es normalmente clivada por la enzima, reemplazándola por un estado de transición no hidrolizable. Los inhibidores de proteasa resultan específicos ya que por ejemplo el saquinavir no afecta la actividad de otras aspartil proteasas como la renina, la pepsina, la elastasa, la colagenasa o la prolidasa. (De Clercq 1995, 1997b).



Interferón α

Los interferones (IFN) son una familia de citoquinas, que se clasifican en dos tipos: tipo I, que incluye al IFN- α , al IFN- β , al IFN- φ y al IFN- τ y el tipo II que consiste en el IFN- γ , y que poseen distintas propiedades biológicas como, acción antiviral, regulación del crecimiento y diferenciación celular, inducción de los antígenos de histocompatibilidad clase I y II, entre otras (Flint). La síntesis de IFN- α y β se induce frente a una infección viral en casi todos los distintos tipos celulares. Si bien, el mecanismo de inducción no está completamente dilucidado, se piensa que la señal principal que dispara dicha síntesis es la acumulación de ARN doble cadena que se produce tanto durante la replicación de los ARN como los ADN virus. De todos modos, en este punto, se considerará en mayor detalle el mecanismo de acción antiviral del IFN- α una vez que ya fue sintetizado.

Una célula no infectada en contacto con el IFN, si es susceptible al mismo, desarrolla lo que se denomina “un estado antiviral”, es decir queda preparada para frenar la multiplicación de una variedad de virus que entren a esa célula. La respuesta se produce una vez que el IFN se une a su receptor específico inserto en la membrana celular, activando la transcripción de genes que están bajo su regulación, y que corresponden a distintas proteínas, algunas responsables de la acción antiviral (Baron y Dianzani). Una de ellas es la proteína quinasa dependiente de ARN doble cadena (PKR), una serina/treonina quinasa compuesta por un dominio N-terminal regulatorio y otro C-terminal, catalítico. La mayoría de las células de mamíferos expresan niveles basales, de una forma inactiva de PKR, cuya transcripción aumenta de 5 a 10 veces por acción del IFN. El mecanismo postulado propone que cuando dos o más moléculas de PKR inactivas se unen a una molécula de ARN doble cadena, la proximidad induce la autofosforilación (inter o intramolecular) causando un cambio conformacional en el dominio catalítico que conlleva a la activación de la enzima. La acción antiviral de esta proteína está relacionada con el sustrato que hasta el presente se sabe es modificado in-vivo, la subunidad α del factor de iniciación eIF-2, que una vez fosforilado bloquea la síntesis proteica viral y celular por completo. Además del rol que la PKR tiene en la acción antiviral del IFN está en estudio su participación en otros caminos de transducción de señales de otras citoquinas (IL-3) y factores de crecimiento (PDGF, EGF), así como también en la apoptosis (Williams).

La 2',5'-oligoadenilato sintetasa y la ribonucleasa L (ARNasa L) también son proteínas que se sintetizan por acción del IFN. La forma de actuar de estas proteínas es la

siguiente: la primera sintetiza oligómeros de 2',5' ácido adenílico (poli-A), pero sólo cuando se activa por la presencia de ARN doble cadena, estos poli-A inusuales en la célula activan a la ARNasa L que comienza a degradar todos los ARNm celulares y virales.

Por último, la proteína MxA que pertenece a una pequeña familia de GTPasas inducibles por IFN que inhibiría la transcripción de determinados virus, también se sintetiza en las células susceptibles a la acción de este antiviral.

Sin embargo, después de más de 40 años del descubrimiento del IFN, la secuencia de eventos que llevan a la síntesis de dichas proteínas continúa siendo objeto de intensas investigaciones. Al respecto, se ha podido establecer que la unión del IFN- α a su receptor activa las tirosina quinasas asociadas al mismo Tyk2 y Jak1, quinasas de la familia Janus (JAK), éstas fosforilan los factores de transcripción citoplasmáticos denominados STATs (signal transducers and activators of transcription), p113, p91 y p84 que se multimerizan y se translocan al núcleo. Allí, se unen a una cuarta proteína denominada p48 y en su conjunto este complejo, denominado ISGF3 (IFN stimulated gene factor 3), interacciona con el ADN en las secuencias regulatorias de los genes que están bajo el control del IFN (dichas secuencias se denominan ISRE por IFN stimulated response element) y activan su transcripción (Larner y Reich, Levy).

El IFN comercial corresponde a una proteína recombinante del IFN- α 2 humano que se expresa en *Escherichia coli* y que en la clínica se indica para el tratamiento de infecciones virales producidas, en pacientes inmunocompetentes, por papilomavirus y por el virus de hepatitis C; infecciones virales en pacientes inmunocomprometidos; y fuera del campo de la virología se utiliza en determinados tratamientos oncológicos.

1.5. Mecanismos de acción de drogas en estudio.

Además de los mecanismos descritos para las drogas que actualmente se usan en la clínica, hay otros blancos dentro del ciclo de multiplicación viral, así como también blancos celulares que se requieren o participan del mismo, que son bloqueados por compuestos que exhiben actividad antiviral (De Clercq 1995, 1997b). Distintos ejemplos se mencionan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Diferentes blancos de acción de drogas antivirales en estudio.

Blanco de acción	Virus	Compuesto
Adsorción	HSV, HIV, RSV, Influenza A, VSV	Compuestos polianiónicos (dextrán sulfato, polisacáridos sulfatados, polioximetatos, policarboxilatos, etc).
Fusión	HIV	Ácido betulínico, seroalbúmina humana succinilada o aconitilada.
Desnudamiento	HIV, rinovirus	Biciclanos (JM2763 y JM3100), isoxazoles (pleconaril).
Transcripción	RSV, HIV	Oligonucleótidos antisentido, benzodiazepinas antagonistas de Tat (Ro5-3335).
Traducción	HIV	Ribozimas.
Maduración (glicosilación)	HIV	Castanospermina.

1.6. Problemas que enfrenta la terapia antiviral.

El desarrollo de mutantes virales resistentes a las drogas en uso es uno de los problemas más importantes a los que debe hacer frente la terapia actual (DeClercq 1997a). Cepas resistentes a todas las drogas utilizadas fueron detectadas en la clínica. A pesar de este inconveniente, el análisis de la resistencia a los antivirales provee información, no sólo sobre el mecanismo de acción sino también sobre nuevas estrategias para enfrentar el problema.

Así es como se pudo establecer, los cambios genéticos, la frecuencia y velocidad de aparición, y las interacciones de las mutantes resistentes a distintas drogas (De Clercq 1997b, Flint). Por ejemplo, en el caso del ACV, la resistencia está asociada con dos alteraciones, ausencia de fosforilación del ACV a su forma monofosfato y falla de la forma trifosfato en inhibir la ADN polimerasa viral. En ambos casos están descritas las mutaciones puntuales sobre la timidina quinasa y la ADN polimerasa, que llevan a dicho fenotipo, respectivamente. En cuanto a la velocidad de aparición por ejemplo, se sabe que las mutantes de HIV resistentes a los NNRTIs emergen más rápido que para los análogos de nucleósidos. También

se pudo precisar el patrón de resistencia cruzada para los antivirales con mecanismos de acción similares como lo son los análogos de nucleósidos o nucleótidos para HIV y para los herpesvirus. Además de la resistencia cruzada, otro tipo de interacciones entre las cepas resistentes son la resistencia antagónica y la sinérgica. Es decir, una mutación que origina resistencia a una droga puede restaurar o incrementar la susceptibilidad a otra, como por ejemplo: el cambio L74V en la TR de HIV que genera una cepa resistente a la didanosina restaura la susceptibilidad al AZT de una cepa con la mutación T215F en la TR.

Las estrategias que se plantean para resolver o prevenir este problema son varias (De Clerq 1997a):

- 1) Utilizar en forma sucesiva compuestos con diferentes mecanismos de acción que no presenten resistencia cruzada.
- 2) Utilizar en forma combinada compuestos con diferentes blancos o que presenten un patrón de resistencia antagónico.
- 3) Iniciar la terapia utilizando altas concentraciones de droga, en forma individual o combinada, para prevenir que el virus, resistente o no, escape a la acción del antiviral.

Finalmente, otro reto permanente que debe enfrentar la terapia antiviral, además del descubrimiento de nuevas drogas, es el mejoramiento de distintas propiedades como, potencia, selectividad, farmacocinética, biodisponibilidad y citotoxicidad, de las existentes.

En algunos casos, se han obtenido modificaciones exitosas para superar por ejemplo:

- la baja biodisponibilidad oral del ACV, con el valaciclovir, que corresponde a la molécula del ACV esterificada con una L-valina;
- modificar el espectro de acción del ACV, con el GCV mediante la adición de un grupo hidroximetilo en la posición 3' del ACV se obtuvo un sustrato mejor para la fosfotransferasa de CMV;
- aumentar la vida media intracelular del ACV, el PCV (o su forma oral el famciclovir) estructuralmente relacionado al GCV, posee un espectro de acción similar al del ACV pero la forma trifosfato permanece por mayor tiempo en el interior de la célula.

1.7. Compuestos de origen natural con actividad antiviral.

Desde hace tiempo, los productos naturales han sido una fuente inagotable para el descubrimiento de nuevos compuestos farmacológicamente activos, algunos ejemplos exitosos son la ciclosporina (inmunosupresor), la mevinolina (para el tratamiento de la

hipercolesterolemia), y el taxol (antitumoral) (Nisbet y Moore). Sin embargo, la búsqueda de sustancias con actividad antiviral no ha sido tan intensa ni clínicamente tan exitosa como para los antivirales sintéticos. Por un lado, esto se debe a que la mayoría de los científicos se inclinan por el diseño racional de drogas, debido al avance en el conocimiento molecular del ciclo de replicación viral. Por otro lado, existen problemas inherentes a la investigación de extractos naturales como por ejemplo la extracción, purificación e identificación del agente activo que requieren la dedicación de un equipo multidisciplinario (Vanden Berghe y col.).

A pesar de ello, en 1987 el “National Cancer Institute” de los Estados Unidos comenzó un programa para realizar una evaluación extensiva de productos naturales derivados de microorganismos, plantas superiores, hongos, algas y animales marinos con la esperanza de hallar sustancias que fueran capaces de inhibir la multiplicación del virus HIV. Un gran número de los extractos acuosos obtenidos de plantas terrestres, líquenes, cianobacterias, algas e invertebrados marinos analizados, exhibieron alguna actividad anti-HIV (Cardellina y col.). Estudios posteriores permitieron demostrar que en el caso de los extractos obtenidos de invertebrados marinos como esponjas, tunicados y cnidarios, la actividad estaba asociada a polisacáridos sulfatados (Beutler y col.), al igual que en el caso de las algas.

En las algas rojas los principales polisacáridos solubles son los galactanos sulfatados. Aquellos obtenidos del alga *Schizymenia dubyi* mostraron ser activos contra HIV, HSV-1 y 2 (Bourgougnon y col.), mientras que los aislados de *Aghardhiella tenera* resultaron efectivos para un amplio espectro de virus tales como HIV-1 y 2, herpes, toga, arena, mixo y rabdovirus (Witvrouw y col.). También se han aislado polisacáridos sulfatados del alga *Nothogenia fastigiata*, que exhibieron actividad contra HSV-1 y 2, HCMV, Influenza A y B, virus Junín, Tacaribe y HIV-1 y 2 (Damonte y col.) y del alga *Gigartina skottsbergii*, con actividad antiherpética (Carlucci y col.).

En cambio, se aislaron fundamentalmente fucanos sulfatados de las algas pardas. A partir del alga *Fucus vesiculosus* se obtuvieron fucanos que resultaron activos inhibidores de HIV (Béress y col.).

Las plantas también han sido objeto de estudio para el hallazgo de antivirales naturales. Extractos crudos de plantas utilizadas en las diferentes medicinas tradicionales, Kampo, China, Ayurveda, hawaiana, panameña, brasileña, argentina, presentaron actividad antiviral contra diferentes herpesvirus, HSV-1, CMV, poliovirus, sarampión, VSV y HIV-1 (Locher y col, Mantani y col., Hattori y col., Simoes y col., Yukawa y col., Kurokawa y col.,

García y col.) . Por ejemplo, se han aislado flavonoides, sustancias presentes en muchas plantas, de *Scoparia dulcis* activos contra HSV-1, uno de los más potentes resultó ser la acacetina (Hayashi y col.). Otro flavonoide obtenido de raíces de *Scutellonia banalensis* es activo contra influenza virus inhibiendo la brotación (Nagai y col.). Una proteína denominada YLP, aislada a partir de hojas de la planta *Yucca recurvifolia* Salisb ejerció una acción inhibitoria in-vitro sobre la replicación de HSV-1, exhibiendo una baja toxicidad (Hasashi y col.). La oryzacistatina, una cistatina obtenida del arroz que inhibe diferentes tiol proteasas, también mostró una potente actividad anti-HSV-1 in-vitro e in-vivo (Aoki y col.). De las plantas también se han obtenido otro tipo de compuestos como taninos, lignanos, alcaloides, lectinas y polisacáridos sulfatados, entre otros, con actividad antiviral (Fukuchi y col., Craigo y col., McMahon y col., Balzarini y col., Hirabayashi y col., Benencia y col. 1997b).

2. MELIACINA.

2.1. Actividad antiviral in-vitro.

La planta *Melia azedarach* L., cuyo nombre vulgar es árbol del paraíso, pertenece al género *Melia* de la familia *Meliaceae*, oriundo de Asia, en nuestro país es una especie muy difundida por su valor forestal y ornamental. Las meliáceas son plantas utilizadas desde hace siglos en la medicina Ayúrveda porque los extractos obtenidos de diferentes partes del árbol son benéficas, excepto los frutos que son tóxicos.

En el año 1982, el Laboratorio de Virología de la FCEyN de la UBA se reportó por primera vez las propiedades antivirales de extractos crudos obtenidos a partir de la raíz de la planta *M. azedarach* L.. Los extractos hidroalcohólicos inhibieron in-vitro la multiplicación de un amplio espectro de virus patógenos para el hombre y para los animales (ver cuadro 2), presentando una toxicidad muy baja para las células en cultivo. En ese trabajo se describió también la propiedad de los extractos de inducir un estado refractario a la infección viral, por pretratamiento de los cultivos celulares (Wachsman y col. 1982).

Extractos semipurificados obtenidos a partir de las hojas de *M. azedarach* L. también demostraron tener un factor antiviral de amplio espectro carente de citotoxicidad (Andrei y col. 1985). Por esta razón y por la necesidad de contar con material abundante para investigaciones más detalladas sobre la naturaleza química del principio activo y su mecanismo de acción, se comenzaron a utilizar las partes aéreas del árbol para obtener los extractos. La recolección de las mismas se puede realizar de noviembre a mayo, ya que la actividad antiviral no varía entre dichos meses (Descalzo 1991). El principio antiviral presente en los extractos semipurificados que además es capaz de inducir el estado antiviral en células en cultivo, se denominó meliacina (MA) (Andrei y col. 1988).

En relación al establecimiento del estado antiviral, las investigaciones llevadas a cabo hasta el presente permitieron determinar que se desarrolla en una variedad de cultivos celulares continuos y primarios (Vero, BHK-21, Hep-2, HeLa, L929, cultivo primario de embriones de pollo y RK-13). En células Vero, la inducción se produce sólo a temperatura fisiológica, el máximo de resistencia se alcanza con 2 hs de incubación y se mantiene por al menos 15 hs, pero se reestablece con un segundo pulso de MA. El estado antiviral no se transfiere ni por fluidos extracelulares ni por contacto directo con las células tratadas. MA tampoco induce la síntesis de IFN in-vitro, por el contrario, la producción de IFN está

inhibida en células L₉₂₉ tratadas con el antiviral (Andrei y col. 1988, 1990). Por lo tanto el mecanismo de inducción del estado antiviral activado por MA parecería ser independiente del sistema IFN.

Cuadro 2. Virus pertenecientes a diferentes familias susceptibles a la acción antiviral de meliacina.

Familia	Virus
<i>Arenaviridae</i>	Junín ^a
	Tacaribe ^a
	Pichinde ^a
<i>Togaviridae</i>	Sindbis ^a
<i>Picornaviridae</i>	Polio ^a
	FMDV ^a
<i>Rhabdoviridae</i>	VSV ^a
<i>Herpesviridae</i>	HSV-1 y 2 ^a
	PrV ^b
	Herpes bovino ^c
<i>Paramixoviridae</i>	Sarampión ^d
	NDV ^e
	Parainfluenza III ^e
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza A ^f

^a ver Wachsman y col. 1982, ^b ver Descalzo y col. 1989, ^ctesina Hernán Cavallieri, ^d datos no publicados por Andrea Barquero, ^e datos no publicados por Mónica Wachsman, ^f datos no publicados por Celia Coto.

Respecto de cuál es el paso de la multiplicación viral bloqueado en las células refractarias a la infección, se ha podido demostrar que ni la adsorción ni la penetración del virus Sindbis a células BHK-21 está afectada, en tanto que no se detecta síntesis ni de ARN ni de proteínas virales, en las células pretratadas (Wachsman y col. 1987).

Por otra parte, también se estudió el efecto de la presencia de MA durante la multiplicación viral estableciéndose claramente que no ejerce una acción virucida sino que interfiere con algún paso del ciclo de multiplicación.

En el caso de los picornavirus, los estudios realizados con la cepa Campos del virus Aftoso y células BHK-21, permitieron demostrar que el paso afectado era el desnudamiento (Wachsman y col. 1998).

También se investigó la acción de MA sobre el virus HSV-1 en células Vero pudiéndose establecer que en los cultivos infectados y tratados está inhibida la síntesis de determinadas proteínas tardías que participan en la replicación del genoma y en el ensamblaje de la partícula viral (Villamil y col.). En un trabajo posterior se comprobó que tanto la síntesis de ADN como la propagación viral estaban afectadas por MA. Los estudios de microscopía electrónica revelaron que en las células tratadas hay gran cantidad de partículas desnudas en el citoplasma y una menor proporción de partículas maduras pero incluídas en vesículas citoplasmáticas. En cambio, en las células sin tratar el virus maduro se observa en el espacio intercelular y las partículas desnudas en el núcleo (Alché y col. 2001). MA también fue capaz de potenciar la acción antiherpética del ACV y del PFA, inhibiendo en combinación con estas drogas tanto al virus salvaje como a una cepa mutante de HSV-1 TK⁻, sugiriendo que el mecanismo de acción de MA no tiene relación con el blanco de los compuestos utilizados (Barquero y col 1997a y b). También se evaluó el efecto de MA sobre otro herpesvirus, el virus de la pseudorrabia (PrV), encontrándose que el paso bloqueado debería ser posterior a la adsorción y penetración viral porque los mismos no están afectados en presencia de MA (Descalzo y col. 1989).

Un arenavirus susceptible a la inhibición producida por MA es el virus Junín, las investigaciones desarrolladas trabajando con este virus en células Vero y BHK-21, sugieren que los blancos de acción sobre este virus son dos. En células pretratadas se trataría del desnudamiento, mientras que en cultivos tratados con MA luego de la infección, habría un bloqueo a nivel de la liberación de las partículas virales al medio extracelular (Castilla y col.).

2.2. Actividad antiviral in-vivo.

Los modelos utilizados para estudiar la acción antiviral de MA in-vivo fueron los siguientes:

- 1) modelo de encefalitis en ratones neonatos infectados con el arenavirus Tacaribe por vía intraperitoneal (i.p.)
- 2) modelo de encefalitis en ratones adultos de exocría o endocría infectados con HSV-1 por vía intracerebral (i.c.) e intraperitoneal, respectivamente.
- 3) modelo de queratitis herpética estromal en ratones adultos infectados con HSV-1 en la córnea.

En el primer caso la administración de MA en el agua de bebida de los ratones o de las madres protegió a los ratones lactantes de la muerte por encefalitis causada por el virus Tacaribe. El antiviral redujo la distribución viral a los órganos periféricos como riñón e hígado, y el título de virus en el cerebro (Coulombié y col.).

Luego de demostrar que ratones adultos tratados con MA por vía i.p. durante un mes no presentaban efectos tóxicos visibles con pérdida de peso, alteraciones físicas o de comportamiento, ni muerte, se procedió a investigar la acción del extracto sobre ratones infectados con HSV-1 vía i.c.. Los resultados obtenidos en este modelo fueron alentadores pero dada la rapidez con que los animales desarrollan la enfermedad se decidió inocularlos por vía i.p.. De este modo, ratones adultos Balb/c infectados y tratados con MA no mostraron los resultados esperados para un antiviral ya que, tanto el período de incubación como la muerte de los ratones se aceleraron (Claus y col.).

Por el contrario, en el modelo de queratitis herpética, la administración en forma tópica de MA redujo la multiplicación del virus en el ojo y disminuyó significativamente la aparición de los síntomas de la enfermedad (Alché y col. 2000).

2.3. Basificación de los endosomas.

Recientemente se ha observado que al igual que los compuestos lisosomotrópicos MA produce una basificación de los compartimentos intracelulares ácidos en células BHK-21, demostrado mediante la técnica de tinción con naranja de acridina de células vivas tratadas con MA (Wachsman y col. 1998). Este efecto sólo se observa a temperatura fisiológica, requiere de un período de contacto de MA con las células de más de 10 min. y a diferencia de lo observado con el cloruro de amonio el efecto persiste al menos una hora luego de la remoción del antiviral. Esto explicaría la acción de MA sobre etapas tempranas del ciclo de multiplicación de virus que entran por un mecanismo pH-dependiente como Junín, VSV,

Sindbis y Aftosa, y que en cambio no se vea afectada significativamente la replicación del poliovirus.

2.4. Actividad inmunomoduladora.

Las investigaciones sobre la capacidad de MA de modificar parámetros de la respuesta inmune tanto in-vitro como in-vivo surgieron a partir de los resultados obtenidos en el modelo de ratón inoculado con HSV-1 vía i.p.. Resumidamente los resultados encontrados son:

- 1) Así como se observó la inhibición de la síntesis de IFN α/β in-vitro, la administración i.p. de MA también disminuyó la cantidad de IFN α/β circulante en ratones expuestos a diferentes inductores (Andrei y col. 1990). Por otra parte, se observó que extractos aplicados por la misma vía alteraron los parámetros hematológicos de los animales, aumentando en forma transiente el volumen de los glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina, y el número de neutrófilos (Benencia y col. 1992).
- 2) Extractos crudos de *M. azedarach* L. mostraron una fuerte actividad anticomplementaria, principalmente de la vía clásica, y no inhibieron la fagocitosis de partículas de zimosán opsonizadas ni el estallido respiratorio en leucocitos polimorfonucleares (Benencia y col. 1994). En cambio los extractos sí inhibieron la fagocitosis de eritrocitos de oveja opsonizados y el estallido respiratorio inducido por un éster de forbol en monocitos humanos (Benencia y col. 1997a). Así como también inhibieron la actividad fagocítica y el metabolismo oxidativo de exudados peritoneales de ratón (Courrèges y col. 1994).
- 3) También se evaluó el efecto de extractos crudos sobre la proliferación de linfocitos estimulados con mitógenos como la concanavalina A y lipopolisacáridos. La inhibición se observó sobre linfocitos T aislados de bazo o de ganglio de ratones de endocría. In-vivo, el tratamiento de ratones con los extractos afectó ligeramente la producción de anticuerpos anti-glóbulos rojos pero inhibió en forma dosis dependiente la reacción de rechazo de transplante del huésped por los linfocitos transplantados y la reacción de hipersensibilidad retardada (Courrèges y col. 1998).

2.5. Naturaleza del principio activo.

De acuerdo con la opinión de muchos investigadores, la búsqueda de antivirales en plantas ofrece perspectivas de interés por la variedad de estructuras químicas presentes en las mismas. Sin embargo, es difícil encarar el modo de estudio, así si se hace un rastreo de la actividad de extractos crudos como primer criterio de selección, luego, hay que proceder al aislamiento y purificación del o los principios activos, pudiendo encontrar al fin del camino que la actividad proviene de una mezcla y no de un solo principio. Por otra parte, surge la pregunta si valdrá la pena invertir dinero y esfuerzo en la caracterización de un producto que no muestre una actividad biológica de interés. Para el caso específico de MA, los extractos crudos mostraron propiedades biológicas tan interesantes que han justificado encarar su purificación (Coto, CE comunicación personal). El criterio elegido para seleccionar una metodología apropiada ha sido medir en cada caso la actividad antiviral de los sucesivos pasos de purificación utilizando al virus VSV como indicador de actividad biológica. En forma cronológica resumimos aquí el estado de situación.

Las primeras investigaciones llevadas a cabo para determinar la naturaleza química del principio activo presente en los extractos de *Melia azedarach* indicaron que podría tratarse de un polipéptido ya que, la actividad biológica se eliminaba por el tratamiento con tripsina 0,1% o por el autoclavado a 120°C durante 20 min a 1 atmósfera (Wachsman y col. 1984). Estudios posteriores demostraron que, a pesar de la naturaleza proteica del principio antiviral, los métodos tradicionales de purificación de proteínas como la precipitación con sulfato de amonio, o con polietilenglicol, o con dos volúmenes de etanol o con 10% de tricloacético, no permitieron recuperar la actividad presente en los extractos parcialmente purificados. Finalmente Andrei desarrolló un método de purificación a partir de los extractos acuosos liofilizados que incluía primero una filtración molecular en una columna de Sephadex G-100 seguida de una cromatografía de intercambio iónico en una DEAE-Sephadex A-25 y una posterior cromatografía de adsorción en sílica gel, donde la fracción activa se eluía con una mezcla de cloroformo:metanol 95:5. Dicha fracción se analizó mediante una cromatografía de capa delgada donde se detectaron tres bandas (I, II y III) pero sólo la banda II, con un Rf de 0,37 presentó actividad. Con este procedimiento la actividad específica aumentó 20 veces pero el rendimiento fue muy bajo del 2-3% de la actividad antiviral inicial. La caracterización estructural preliminar que se realizó permitió determinar que el compuesto presente en la

banda II era un péptido cíclico de 2200 a 2300 Kda de PM conteniendo sólo aminoácidos alifáticos y una molécula de glucosa (Andrei y col. 1994).

Este protocolo de purificación fue posteriormente modificado (Villamil y col.) con el objeto de lograr mayores rendimientos y masa suficiente para el análisis de las estructuras responsables de la actividad antiviral. En términos generales es el procedimiento que se utiliza en la actualidad para la obtención de MA purificada. El proceso comprende 1) recolección y lavado de hojas frescas 2) obtención del extracto acuoso de las hojas por extracción con buffer y centrifugación, 3) liofilización de los extractos para su concentración, 4) extracción del liofilizado resuspendido en agua con acetato de etilo, formación de una pastilla con la fase orgánica y sílica y posterior siembra sobre una columna de sílica gel, 5) elución consecutiva con cloroformo, cloroformo-metanol 97:5 y cloroformo –metanol 95:5. La actividad antiviral eluye regularmente en las fracciones 7, 8 y 9 de la mezcla cloroformo-metanol 95:5 (fracción sílica), 6) un concentrado de la mezcla procedente de varias columnas se siembra sobre una placa delgada de sílica y se deja correr con solvente cloroformo-metanol 90:10 , 7) expuesta la placa a la luz UV se visualizan varias fracciones de las cuales sólo dos, denominadas bandas 1 y 2, presentan actividad antiviral.

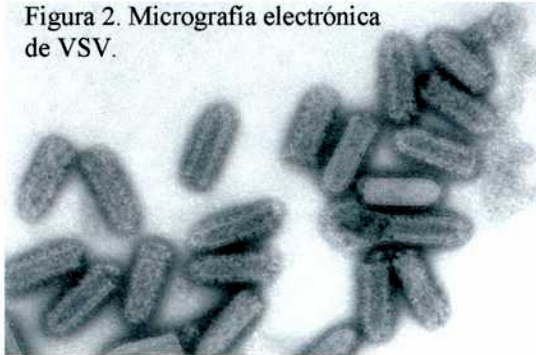
La fracción 2 es más abundante lo que ha permitido continuar con los estudios de purificación. Se ha comprobado que ambas bandas presentan el mismo espectro de acción antiviral que la fracción sílica. El análisis de la banda 2 se continúa por cromatografía flash de fase reversa C-18 y posterior elución con mezclas metanol-agua. De las fracciones eluidas se continúa con las fracciones activas las que se purifican posteriormente por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Se obtiene un perfil de varios picos de los cuáles sólo uno tiene actividad antiviral. A continuación la fracción activa se analiza por resonancia magnética nuclear protónica y de carbono 13 a 200 y 500 MHz y por espectrometría de masa. En la banda 2 se pudo detectar la presencia de un limonoide, tetranortriterpenoide, cuya estructura no está descripta en los bancos de datos. Hay que tener en cuenta que de la familia de las *Meliáceas* se han aislado varios limonoides. Al presente, luego de procesar varios kilogramos de hojas se están repitiendo los experimentos con el objeto de confirmar dicha estructura química.

La banda 1 se sometió a un análisis similar pero dada la baja masa obtenida no ha podido reconstruirse la molécula completa, las señales han revelado que la molécula presente podría ser un lignano que podría presentar uno o dos enlaces peptídicos (Coto C.E y col. datos no publicados).

3. VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR.

3.1. Generalidades.

Figura 2. Micrografía electrónica de VSV.



El virus de la estomatitis vesicular (VSV) es un virus a ARN cadena simple no segmentado de polaridad negativa que pertenece a la familia *Rhabdoviridae* género *Vesiculovirus*. Dicha familia es una de las más ampliamente distribuidas en la naturaleza ya que existen distintos miembros que son capaces de infectar vertebrados,

invertebrados y algunas especies de plantas. Asimismo, la mayoría de los rhabdovirus tienen un amplio rango de huésped.

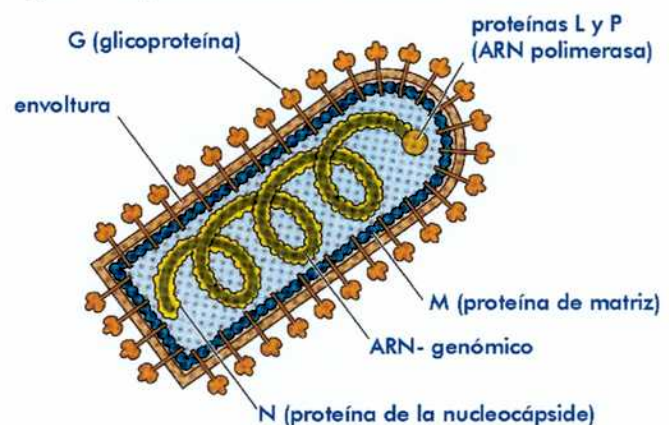
Existen dos serotipos de VSV Indiana (Ind) y New Jersey (NJ), capaces de infectar tanto insectos como mamíferos. En vacas y cerdos, si bien produce una enfermedad benigna tiene una gran importancia económica. Rara vez se detectan infecciones en humanos pero pueden ocurrir por exposición en el laboratorio o por contacto con carcasas de animales infectados (Wagner y Rose).

3.2. Estructura del virión.

La forma de "bala" típica de los rhabdovirus se puede observar en la foto de la figura 2 que corresponde a una microscopía electrónica de VSV. La partícula viral completa mide 180 nm de largo por 75 nm de ancho y está compuesta por dos estructuras: la nucleocápside o ribonucleoproteína (RNP) y la envoltura. En la figura 3 se presenta un esquema de VSV con la

distribución de los componentes estructurales que forman parte del virión. La nucleocápside, de simetría helicoidal, está formada por una molécula de ARN revestida por la proteína N

Figura 3. Esquema de la estructura de VSV.



(nucleocápside) y asociadas en menor proporción están la proteína L (grande) y la proteína P (fosfoproteína, originalmente denominada NS) que en conjunto forman la transcriptasa viral.

La envoltura está compuesta por lípidos en un 50 % y el resto por proteínas. La bicapa lipídica deriva de la célula huésped aunque difieren en la proporción de sus componentes, por ejemplo la membrana viral tiene mayor proporción de colesterol que la membrana plasmática. Las proteínas de la envoltura son dos: la glicoproteína (G) que atraviesa la membrana y la proteína de matriz (M) que se encuentra asociada a la membrana en el lado interno. Por lo tanto las cinco proteínas codificadas por el genoma de VSV, en menor o mayor grado forman parte de la estructura del virión (ver cuadro 3) (Wagner y Rose).

Cuadro 3. Composición proteica de las partículas de VSV.

Proteínas de VSV	Peso molecular ^a (daltones)	Moléculas por virión
N	47.355	1.258
P	29.878	466
M	26.064	1.826
G	63.416	1.205
L	240.707	50

^a Estimado a partir de la secuencia de aminoácidos, en el caso de la G incluye los 6.0000 daltones de hidratos de carbono.

3.3. Estructura del genoma.

El genoma de VSV está constituido por una molécula de ARN lineal monocatenaria de polaridad negativa (ARN⁻) de 11.161 nucleótidos que contiene cinco genes dispuestos en el orden que se observa en el esquema de la figura 4. Las regiones intergénicas son sólo de dos nucleótidos y los cinco ARNm que se sintetizan a partir de la cadena de polaridad negativa son monocistrónicos, con CAP, poliA y metilados.

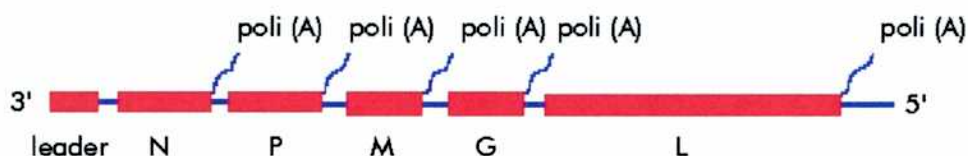


Figura 4. Organización del genoma de VSV.

3.4. Ciclo de multiplicación.

La multiplicación de VSV en una célula susceptible consiste en una serie de eventos que conllevan a la formación de la progenie viral y a la muerte de la célula huésped. En la figura 5 se presenta un esquema simplificado de los distintos pasos del ciclo viral ordenados linealmente.

a) Adsorción.

La infección comienza con la unión de la partícula viral al receptor específico ubicado en la superficie de la célula huésped. En el caso de VSV, en dicha interacción participan las espículas de la proteína G de la envoltura viral y la fosfatidilserina de la membrana plasmática, que sería al menos uno de los receptores celulares descritos en células Vero (Schlegel y col. 1983). Este proceso tiene lugar a 4° C porque es independiente de energía, pero a diferencia de otros virus como Semliki forest e Influenza A, es bastante ineficiente ya que tan sólo el 10 % o menos del virus agregado se une a la célula huésped. Por el contrario es dependiente del pH siendo 6,5 el pH óptimo de pegado a la célula (Matlin y col.). En cuanto a las cadenas de hidratos de carbono presentes en la proteína G no estarían involucradas en la adsorción pues viriones obtenidos de células infectadas tratadas con tunicamicina son totalmente infecciosos (Wagner y Rose).

b) Penetración.

Las últimas evidencias obtenidas apoyan la hipótesis que la internalización de VSV a la célula se produce a través del mecanismo de endocitosis mediada por receptor en vesículas recubiertas por clatrina (Hernández y col.). Al igual que la adsorción, respecto de otros virus

la penetración de VSV es un evento lento e ineficiente. Una explicación posible es que VSV requiera la formación de vesículas más grandes debido a su forma y tamaño (Matlin y col.).

c) Desnudamiento.

El desnudamiento de VSV consiste en la liberación de la nucleocápside al citoplasma a través de la fusión de la envoltura viral con la membrana endosomal. El pH ácido de los endosomas dispara un cambio conformacional en la glicoproteína G que se activa y cataliza la fusión. Luego del desnudamiento la proteína M se solubiliza en el citoplasma, la proteína G permanece en la membrana endosomal y la nucleocápside intacta que se libera al citosol se asocia a través de la proteína N al citoesqueleto celular (Rigaut y col.).

El mecanismo de fusión involucrado en este paso está poco descrito, en parte, porque aún no se dispone de la estructura por cristalografía de rayos X de la glicoproteína G. Sin embargo, estudios realizados con liposomas o células empleando técnicas de fluoromarcación, permitieron establecer:

- 1) La fusión de VSV no requiere ni fosfolípidos específicos ni un receptor particular en la membrana blanco, por el contrario, la fosfatidilserina (supuesto receptor de VSV) actuaría como un inhibidor.
- 2) La fusión está precedida por un período “lag” y el pH óptimo de fusión es 5,8-6 pero ya a pH 6,2-6,3 se detecta actividad fusogénica.
- 3) La actividad se elimina incubando al virus a pH bajos en ausencia de membrana blanco pero esta inactivación se revierte cuando se restablece el pH (Gaudin y col.).

En cuanto a la región de la glicoproteína G que interacciona con la membrana blanco, aún no ha sido identificada. El análisis de la estructura primaria de G no arroja ninguna secuencia que presente homología con otros péptidos de fusión pero evidencias obtenidas por estudios de mutagénesis dirigida y fotomarcación, sugieren que la región que incluye los residuos aminoácidos 118-139 podría estar involucrada (Hernández y col., Gaudin y col.).

El modelo de fusión propuesto postula que hay un cambio conformacional inicial en la proteína G, inducido por el pH de los endosomas, que expone una región hidrofóbica en el ectodominio. Luego, a medida que el pH desciende, se produce un segundo cambio conformacional que estabiliza la forma trimérica de G. Ambas alteraciones son totalmente reversibles cuando se aumenta el pH por arriba de 7 (Gaudin y col.).

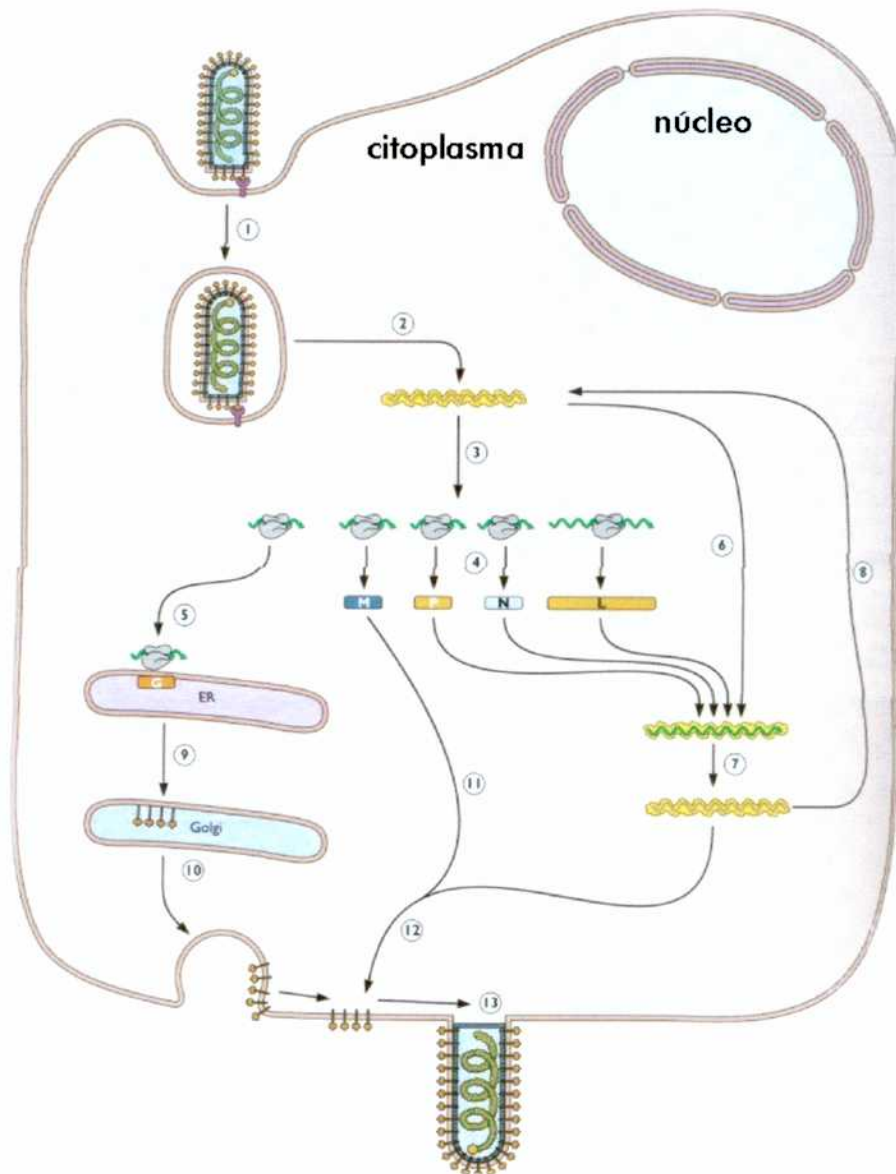


Figura 5. Esquema del ciclo de multiplicación de VSV. 1) El virus se une al receptor y entra a la célula por el mecanismo de endocitosis. 2) El virus se desnuda y se libera la nucleocápside al citoplasma. 3) A partir del genoma se sintetizan los ARNm virales que codifican las cinco proteínas de VSV. 4) Traducción de las proteínas N, P, M y L en ribosomas libres. 5) Traducción de la glicoproteína G en ribosomas asociados al retículo endoplásmico (ER). 6) Las proteínas P, N y L recién sintetizadas participan en la replicación viral, en donde se sintetiza una copia de ARN de polaridad positiva (ARN+) formándose una ribonucleoproteína. 7) A partir de los ARN+ se sintetizan más ARN de polaridad negativa (ARN-). 8) Algunos de esos ARN- sirven como templado para la síntesis de más ARNm. 9) La proteína G se procesa en el aparato de Golgi. 10) La proteína G se transporta a la membrana plasmática. 11 y 12) La proteína M y las nucleocápsides se transportan a la región de la membrana donde se encuentra la proteína G. 13) Se produce el ensamblaje y la brotación de los viriones de la progenie.

También está en discusión por qué VSV, al igual que el virus Semliki forest, induce fusión a un pH relativamente alto (pH 6,3) respecto de otros virus como Influenza que requieren pH más ácidos (pH 5,3). Una razón podría tener que ver con los cambios que sufre la glicoproteína G durante el transporte a la membrana plasmática (Fredericksen y Whitt).

d) Transcripción.

Una vez que la nucleocápside ha sido liberada al citosol, tiene lugar la transcripción primaria, es decir la síntesis del ARNm a partir del ARN genómico. Las características de este proceso son:

- ocurre aún en ausencia de síntesis de proteínas.
- la ARN polimerasa ARN dependiente que participa es la transcriptasa que transporta el virión asociada a la ribonucleoproteína.
- Los ARNm se sintetizan en forma secuencial y polar.

La polimerasa comienza a transcribir a partir del extremo 3', primero un fragmento iniciador o "leader" de 48 nucleótidos y luego sintetiza los cinco ARNm siguiendo el orden de aparición de los genes en el genoma (figura 4). Cada gen se transcribe aproximadamente en un 30 % menos respecto del inmediatamente superior, por lo tanto el orden de abundancia es $N > P > M > G > L$. Además de transcribir los cinco ARNm, la polimerasa viral realiza el "capping", la poliadenilación y la metilación de los mismos.

Considerando que la polimerasa debe comenzar a sintetizar obligatoriamente en el extremo 3', hasta el presente no se ha podido explicar cómo se generan los transcriptos individuales. Básicamente, se proponen dos modelos, en el primero se postula que existe un clivaje para eliminar las regiones intergénicas lo que podría explicar el cap 5' atípico que tienen los mARN de VSV pero no el fenómeno de atenuación. En el segundo, la polimerasa inicia la síntesis en el extremo 3' del genoma y luego de poliadenilar y terminar un mensajero examina la región intergénica y comienza la transcripción del siguiente gen en la primera U que encuentra aunque no esté en un contexto óptimo de sitio de inicio (Stillman y Whitt). Este modelo denominado "mecanismo start-stop" es el más aceptado.

e) Replicación.

A diferencia del proceso de transcripción, la replicación de VSV requiere síntesis de proteínas, en particular de N y P y al igual que en el primero, el complejo L-P actúa como ARN polimerasa. La transcriptasa primero sintetiza una cadena completa de ARN de polaridad positiva usando como templado la RNP parental y luego sobre estas cadenas transcribe los ARN progenie de polaridad negativa que serán incorporados al virión. El modelo aceptado para explicar cómo la polimerasa pasa de transcribir a replicar propone que la proteína N una vez sintetizada se une al ARN iniciador y previene el reconocimiento de las señales de terminación, de este modo se sintetiza una cadena de ARN completa en lugar de un ARNm.

f) Ensamblaje y brotación.

Las proteínas y el ARN genómico sintetizados se ensamblan formando nuevas partículas virales que salen de la célula huésped por brotación a nivel de la membrana plasmática. Este proceso involucra diferentes pasos, en primer lugar, las proteínas N, P y L se asocian en el citoplasma con la cadena de ARN de polaridad negativa a medida que se sintetiza para formar la RNP. Luego, la proteína M se une a la nucleocápside y la condensa en una estructura helicoidal compacta. La brotación se inicia cuando el “core” condensado se asocia a la cara interna de la membrana plasmática, muy probablemente a través de la interacción de la proteína M con factores celulares. Finalmente, el “core” se rodea de la envoltura compuesta por lípidos celulares y espículas de glicoproteína G liberándose la progenie viral.

Actualmente, ambos procesos son objeto de investigación, en particular la participación de las proteínas M y G. La primera tiene un rol preponderante en desencadenar el ensamblaje y en la brotación ya que, células que expresan la proteína M forman vesículas lipoproteicas que se liberan de la membrana plasmática (Li y col.). Recientemente se ha descrito que la porción amino terminal de M contiene la secuencia PPPY y que mutaciones en esta región reducen drásticamente la liberación de las partículas virales sin afectar etapas previas del ensamblaje (Jayakar y col.). En cuanto a la proteína G, no está claramente establecida su participación en dichos procesos ya que mutantes de delección pueden brotar pero con una eficiencia aproximadamente 30 veces menor. Contrariamente a lo que se tiende

a pensar, el dominio involucrado en la brotación estaría ubicado en la porción externa de G cercana a la membrana plasmática, y podría contribuir facilitando la curvatura de la membrana o modificando la composición lipídica (Robinson y Whitt).

3.5. Procesamiento post-traducciona de las proteínas de VSV.

a) Glicosilación.

La glicoproteína G de VSV Ind se sintetiza como un precursor de 511 aminoácidos (aa) con un péptido señal de 16 aa en el extremo N-terminal que es clivado cuando la proteína se inserta en el retículo endoplásmico (RE). Es una glicoproteína de membrana tipo I con un dominio extracelular con dos sitios de N-glicosilación en las posiciones 179 y 336, una porción transmembrana hidrofóbica o secuencia de anclaje y una cola citoplasmática de 20 y 29 aa, respectivamente. El ectodominio posee 12 cisteínas que participan en la formación de puentes disulfuros intracatenarios y la región citoplasmática tiene una cisteína a la cual se une una molécula de ácido palmítico.

La proteína G, como un homotrímero no covalentemente unido, forma las espículas en la envoltura del virión, para ello la proteína, además de glicosilada, debe ser plegada, oligomerizada y transportada hacia la membrana plasmática (Coll).

El transporte comienza con la translocación co-traducciona de la cadena polipeptídica al RE orientada con el dominio extracelular hacia el lumen, la secuencia de anclaje inserta en la membrana y la región C-terminal hacia el citoplasma. Allí se produce:

- la glicosilación en los residuos de asparagina y el procesamiento parcial de los oligosacáridos.
- la formación de los puentes disulfuros y el plegado de la cadena polipeptídica.
- la oligomerización de los monómeros correctamente plegados.

Durante su plegamiento, la proteína G interacciona secuencialmente con dos chaperonas, BiP y calnexina (Hammond y Helenius). La primera se une a los intermediarios parcialmente oxidados que se producen en las etapas tempranas de la maduración, previniendo la formación de puentes disulfuros intra o intercatenarios incorrectos, y se libera de G una vez que se completa la oxidación. La posterior interacción con la calnexina requiere que los oligosacáridos de dichos intermediarios hayan sido parcialmente procesados. Aparentemente, el rol de la calnexina además, de asistir el plegamiento, es retener en el RE las subunidades

mal plegadas. Los trímeros formados, en equilibrio con los monómeros, se transportan al aparato de Golgi a través de vesículas que brotan del RE. El paso de la proteína por el cis, medio y trans Golgi completa el procesamiento de los oligosacáridos y la G madura sale del trans-Golgi en vesículas que finalmente se fusionan con la membrana plasmática.

b) Fosforilación.

M y P son las dos proteínas de VSV que se fosforilan in-vivo. La proteína de matriz M juega un rol central en el ensamblaje de la partícula viral, tal como se mencionó en el punto f, pero también está involucrada en otras funciones virales como la citopatogenicidad, causando la desorganización del citoesqueleto, y la inhibición de la transcripción celular (Beckes y col., Ferrán y Lucas-Lenard), en consecuencia, la expresión de M resulta tóxica para las células. En cuanto a la localización intracelular de esta proteína, ha sido detectada tanto en el núcleo como en el citoplasma de células infectadas. La fosforilación de M ocurre in-vivo, en una pequeña fracción de moléculas (Kaptur y col. 1992) y se desconoce si dicha modificación post-traducciona juega algún rol en las funciones que desempeña esta proteína. El principal sitio de fosforilación es el residuo treonina (Thr) en la posición 31 o serina (Ser) en la 32. Hay sitios adicionales en el extremo N-terminal (Ser 2 o Ser 3) y en el C-terminal. Además, el análisis de los fosfoaminoácidos arrojó muy baja proporción de fosfotirosina (Kaptur y col. 1995). Si bien, la enzima responsable de la fosforilación de M no ha sido identificada, los aminoácidos circundantes a la Thr 31 o Ser 32 coinciden con la secuencia consenso del sitio de reconocimiento de la caseína quinasa I y II. Además, las moléculas fosforiladas de M se encuentran asociadas a la membrana plasmática sugiriendo que la quinasa involucrada tiene dicha localización.

La principal fosfoproteína de VSVInd, la proteína P, tiene 265 aa muchos con carga negativa, entre ellos 41 Ser y Thr, por eso en un SDS-PAGE migra como una proteína de 45 a 55 Kda en lugar de 30 Kda. Posee tres dominios estructurales denominados I, II y III que van de los residuos 1 a 150, 210 a 244 y 21 a 25 aa de la región C-terminal, respectivamente. Entre los dominios I y II hay una región denominada bisagra de 50 a 60 aa cuya función se desconoce. El dominio I es muy ácido mientras que el III es básico y es el único que no se fosforila (Barik y Banerjee). P, como subunidad de la transcriptasa viral, participa en la transcripción y replicación de VSV aunque carece de toda actividad enzimática.

Respecto de la fosforilación de P, se ha establecido que tanto in-vitro como in-vivo existen formas de P con diferente grado de fosforilación designadas inicialmente NS1 y NS2. Dichas especies se pueden identificar en un SDS-PAGE con urea (Chen y Banerjee). La expresión de PNJ en *E. coli* permitió obtener una forma no fosforilada de P (P0) estableciéndose in-vitro la siguiente secuencia de fosforilación (Barik y Bnerjee):



En el caso de PInd, P1 se obtendría por fosforilación en los residuos Ser 60 y 64 del dominio I mediante la caseína quinasa II, y P2 por la fosforilación en Ser 226 y 227 por una enzima aún no identificada. Además, P1 y P2 serían similares pero no idénticas a NS1 y NS2, respectivamente. En cuanto a la función de las distintas formas se sabe:

- P0 es inactiva en ensayos de transcripción in-vitro.
- las fosforilaciones en el dominio I son necesarias para la función de P en la transcripción in-vivo pero no para la replicación.
- las fosforilaciones en el dominio II se requieren para que la replicación sea óptima pero no se necesitan para la función de P en el transcripción (Chen y Banerjee).

Por lo tanto, la fosforilación de P estaría implicada en la regulación de la funcionalidad de esta proteína.

4. PARTICIPACION DEL SISTEMA VACUOLAR CENTRAL EN LA MULTIPLICACION DE LOS VIRUS.

El sistema vacuolar central está compuesto por: el retículo endoplásmico, el complejo de Golgi, los gránulos y vesículas secretorias, los endosomas, los lisosomas y la membrana plasmática. Estas organelas participan de los procesos de endo y exocitosis celulares, por lo tanto, están involucradas en la biosíntesis, procesamiento, transporte y degradación de proteínas y otras macromoléculas (Yoshimori y col.). El interior de varios de estos compartimentos es ácido (endosomas, lisosomas, gránulos secretorios y en algunas células el Golgi) tal como ha sido demostrado usando colorantes acidofilicos como el DAMP (Palokangas y col.).

Recién en el año 1989 se identificó una nueva clase de bomba de protones dependiente de ATP denominada ATPasa vacuolar (V-ATPasa) que sería la responsable de la acidificación (Yoshimori y col.). En los últimos años, la V-ATPasa ha sido aislada y purificada de distintas organelas, además ha sido caracterizada a nivel molecular relacionándosela estructural y evolutivamente con las F-ATPasas presentes en las mitocondrias, los cloroplastos y las bacterias (Forgac y col.). Las E-ATPasas son una tercera clase de enzimas que se encuentran en la membrana plasmática. Los tres tipos de ATPasas muestran una sensibilidad diferencial a distintos inhibidores. La V-ATPasa es sensible a la N-etilmaleimida, la F-ATPasa es sensible a la oligomicina y la azida y la E-ATPasa al vanadato de sodio. La bafilomicina A1, un antibiótico macrólido obtenido de *Streptomyces* sp, ha sido identificado como un inhibidor altamente específico de las V-ATPasas (Palokangas y col.).

Los compartimentos vacuolares íntimamente relacionados con el ciclo de multiplicación viral son: 1: **los endosomas** , que participan en la entrada de los virus a la célula, en el caso que ingresen a ella por el mecanismo de endocitosis mediada por receptor, 2: **los lisosomas** involucrados en la degradación de las partículas virales, 3: las organelas (**RE, complejo de Golgi, vesículas secretorias**) del sistema exocítico que participan en la síntesis, procesamiento y transporte de las glicoproteínas virales a la membrana plasmática.

Tanto la entrada como la salida de los virus dependen en gran medida del correcto funcionamiento del sistema vacuolar central.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1) Caracterizar el establecimiento del estado refractario a la infección viral inducido por meliacina en células Vero.
- 2) Identificar qué paso del ciclo de multiplicación de VSV, elegido como modelo, está bloqueado en las células refractarias a la infección.
- 3) Determinar el blanco de acción de meliacina en el postratamiento de células Vero y BHK-21 infectadas con VSV.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y MÉTODOS.

Células.

Se emplearon células Vero (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) y BHK-21 (riñón de hamster) 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 50µg/ml de gentamicina. Las monocapas fueron subcultivadas semanalmente y mantenidas a 37°C en MEM suplementado con 1,5% de suero bovino inactivado (MEM 1,5%).

Obtención de meliacina (breve).*

Extractos acuosos liofilizados de hojas verdes de *Melia azedarach* L. se resuspenden en agua y se extraen con acetato de etilo, luego se realiza una cromatografía de adsorción en columna de sílica (230-400 mesh, Merck) y la fracción activa se eluye con cloroformo:metanol 95:5. La cromatografía en capa delgada (TLC silicagel 60, Merk) de dicha fracción arroja dos bandas con actividad de las cuales en este trabajo se utilizó la banda II con un $R_f=0,68$. La solución madre se realizó en MEM 1,5% a una concentración de 1mg/ml.

* el protocolo completo se presentó en el punto 2.5 de la Introducción

Virus.

Se utilizó el virus VSV cepa Indiana que fue propagado en células Vero. El stock se preparó en botellas de 125 ml, infectando las células a una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,01 unidades formadoras de placa (UFP) por célula. Luego de 1 h de adsorción a 37°C se descartó el inóculo y las células se cubrieron con MEM 1,5% incubándose durante 24 hs a 37°C. Finalmente las células se sometieron a tres ciclos de congelado y descongelado, luego el sobrenadante se clarificó por centrifugación durante 15 min a 10000g y se fraccionó en alícuotas que se conservaron a -70°C hasta su utilización.

Ensayo de cuantificación viral por el método de placas.

El stock obtenido se tituló en células Vero que se infectaron con diluciones al décimo del virus. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, se descartó el inóculo y las células se cubrieron con el medio semisólido (MEM 1,5% doble concentrado con metil celulosa al 1,4% en una proporción 1:1). Después de 24 hs de incubación a 37°C, en aquella dilución que lo permitía se contó el nº de UFP calculando el título con la siguiente fórmula: título (UFP/ml)= UFP promedio/vol. inóculo x dilución. El título del stock fue 1×10^9 UFP/ml.

Drogas.

Las soluciones madres de los distintos inhibidores que se utilizaron fueron: 500 µg/ml de actinomicina D (Sidus) en agua destilada, 10 mg/ml de cicloheximida (Sigma) en MEM 1,5%, 50 mM de tirfostina A1 y 25 mM de tirfostín B46 (Calbiochem) en dimetilsulfóxido (DMSO), 50 mM de genisteína (Genay) en DMSO, 150 mM de 2-aminopurina (Sigma) en ácido acético glacial :PBS 1:200, 20 mM de ortovanadato de sodio (Sigma) en agua destilada, 0,5 mM de caliculina A (GIBCO), 0,5 mM de ácido okadaico (GIBCO) en 10% de dimetilsulfóxido y 1 mM de estaurosporina (Sigma) en etanol.

El IFN- α humano recombinante fue una gentil donación de un laboratorio privado con una concentración de $7,14 \times 10^6$ UI/ml.

En todos los casos las diluciones a partir de estas soluciones madres se realizaron en MEM 1,5%.

Ensayo de citotoxicidad.

La citotoxicidad de los antivirales y de los distintos inhibidores se determinó mediante el ensayo colorimétrico del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol -2 yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, Sigma) descrito por Mosmann T.

Células Vero crecidas en una microplaca de 96 pocillos fueron tratadas con diluciones seriadas al medio en MEM 1,5% del compuesto a testear (tres pocillos por cada duplicado). Luego de los distintos tiempos de tratamiento se descartó el sobrenadante y las células se incubaron a 37°C durante 24 hs en MEM 1,5%. Al cabo de dicho tiempo se agregó 10 µl de una solución de MTT (5mg/ml) a cada pocillo y se incubó por 2 hs a 37°C. Seguidamente se

descartaron los sobrenadantes y los cristales azules se disolvieron con 200 µl de etanol. La densidad óptica se determinó en un lector de microplacas (Eurogenetics MPR-A4I) a 570 y 630 nm.

Ensayo antiviral por el método de reducción en el número de placas o plaqueo directo.

Monocapas de células Vero o BHK-21 crecidas en microplacas de 24 cavidades se trataron con distintas concentraciones de MA a 37°C durante las 2 hs previas a la infección (pretratamiento) o todo el tiempo luego de la adsorción (postratamiento). Las células se infectaron con 100 µl por pocillo de una dilución del stock de VSV que contuviera aproximadamente 100 UFP. Después de la hora de adsorción a 37°C se descartó el inóculo y las células se cubrieron con 500 µl por pocillo del medio semisólido. La microplaca se incubó a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 24-48 hs. Luego se contó el n° de UFP por pocillo y se calcularon los porcentajes de inhibición respecto al control de virus (CV) sin tratar.

Inhibición del rendimiento viral.

Células Vero o BHK-21 crecidas en una microplaca de 24 pocillos se pretrataron con 50 µg/ml de MA durante 2 hs a 37°C. Las células se infectaron con VSV a una m.i.=1 durante 1 h a 0°C, después de la adsorción se descartó el inóculo y se lavó con PBS. El tratamiento con MEM pH 5 o MEM pH 7,4 durante 5 min a 37°C se realizó antes o después de la adsorción. Luego las células se incubaron con MEM pH 7,4 a 37°C, a las 20 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó el rendimiento viral por el método de placas.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Células Vero crecidas sobre cubreobjetos colocados en una microplaca de 24 pocillos tratadas con 50 µg/ml de MA por pre o post-tratamiento se infectaron con VSV a la m.i. que se indica en los resultados. Luego de los tiempos de incubación requeridos en cada caso, se descartó el medio y se realizaron dos lavados con PBS. Para realizar la IFI total, revelando antígeno intracelular y de superficie, las células se fijaron con metanol frío durante 10 min a -20°C. Las células fijadas se incubaron con una dilución 1/400 de un anticuerpo monoclonal

(Mab) anti-M_{VSV} o 1/100 de un suero policlonal hecho en conejo anti-G_{VSV} (gentilmente cedidos por el Dr. Pablo Grigera, Centro de Virología Animal, CEVAN) durante 30 min a 37°C. El primer antisuero se lavó exhaustivamente con PBS y luego se realizó la incubación con una dilución 1/50 del segundo antisuero (anti-IgG de ratón o de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína FITC, SIGMA). Al cabo de 30 min de incubación a 37°C se realizaron dos lavados con PBS y dos con H₂O bidestilada, se tiñeron los núcleos con azul de Evans, los vidrios se montaron sobre portaobjetos y las células se observaron en un microscopio Zeiss con epifluorescencia. En la IFI de membrana la única diferencia en el protocolo es que la incubación con el primer anticuerpo se realiza durante 30 min a 0°C antes de fijar las células con metanol, de este modo se detecta sólo el antígeno expresado en la superficie de la célula.

Doble marcación.

Monocapas de células Vero crecidas sobre cubreobjetos fueron infectadas con VSV a una m.i.=1. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, los cultivos celulares se trataron con 50 µg/ml de MA durante 6 hs a 37°C. Al cabo de dicho tiempo las monocapas se lavaron con PBS y se fijaron con metanol durante 10 min a -20°C. Los preparados fijados se incubaron con la dilución 1/100 del primer antisuero anti-G_{VSV} durante 30 min a 37°C y luego de varios lavados con PBS se agregó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo FITC (dilución 1/50) junto con una lectina de *Triticum vulgaris* conjugada a rodamina (WGA-TRICT, Sigma) en una dilución 1/400, como marcador del aparato de Golgi (Tartakof y Vasalli). La mezcla de ambos conjugados se incubó con los preparados durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavó exhaustivamente con PBS y agua. Los vidrios se montaron en portaobjetos con glicerina tamponada y se observaron en el microscopio Zeiss de fluorescencia con los filtros respectivos para cada fluorocromo.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).

Se utilizaron minigeles de poliacrilamida según el sistema de Laemmli (16). En general, para la resolución de las proteínas se preparó un gel con una concentración final de acrilamida 10% en buffer Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 con 0,1% de dodecilsulfato de sodio (SDS). Para la concentración de las muestras se agregó sobre el gel anterior un gel con 4% de

acrilamida en buffer Tris-HCl 0,125 M pH 6,8. Se sembraron 10 a 20 μ l de cada muestra por calle y el gel se sometió a 200 volts con voltage constante durante 45 min utilizando el sistema mini-protean II de BioRad.

Análisis de la síntesis de proteínas.

Monocapas de células Vero o BHK-21 crecidas en microplacas de 24 pocillos se trataron con distintas concentraciones de MA a 37°C durante las 2 hs previas a la infección (pretratamiento) o todo el tiempo luego de la adsorción (postratamiento). Las células se infectaron con 100 μ l por pocillo de VSV a una m.i.=1 durante 1 h a 37°C. Luego se descartó el inóculo y las células se incubaron con MEM 1,5% a 37°C hasta las 4 hs p.i.. En ese momento se cambió el medio por MEM sin metionina y después de una hora de ayuno se agregó 35 S-metionina a una concentración final de 10 μ Ci/ml (NEN, New England). Al cabo de dos horas de marcación se realizaron dos lavados con PBS, las células se resuspendieron en 50 μ l /pocillo de buffer muestra precalentado a 100°C, se trasvasaron a un tubo eppendorf y se calentaron durante 5 min a 90°C. Las proteínas sintetizadas se analizaron en un 10% SDS-PAGE. Luego de la fluorografía los geles se secaron y se expusieron a una película Kodak durante 24 a 48 hs a -70°C hasta su revelado.

Ensayo con naranja de acridina.

Monocapas de células Vero crecidas sobre cubreobjetos se trataron con 50 μ g/ml de MA en MEM sin suero durante 2 hs a 37°C. A distintos tiempos post-tratamiento (0, 2, 4, 8, 10 y 24 hs) se descartó el medio y las células se incubaron con 5 μ g/ml de naranja de acridina en MEM sin suero durante 15 min a 37°C. Luego se realizaron tres lavados con PBS frío y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos para su observación en un microscopio Zeiss con epifluorescencia (Moriyama y col.).

Obtención y purificación de un stock de VSV marcado con 35 S-metionina.

Células BHK-21 crecidas en tres botellas de plástico de 450 ml de capacidad se infectaron con una m.i. de 0,01 del stock de VSV (vol. de inóculo= 2 ml), luego de 1 h de adsorción a 37°C las células se cubrieron con MEM 1,5%. Aproximadamente a las 15 hs p.i.

el medio se cambió por MEM sin metionina y luego de dos horas de ayuno se agregó ^{35}S -metionina a una concentración final de $10\ \mu\text{Ci/ml}$ (NEN, New England). Al cabo de 8 hs de marcación se cosechó el sobrenadante de las tres botellas y se clarificaron por centrifugación durante 20 min a 8500 rpm. El sobrenadante se ultracentrifugó durante 2 hs a 26000 rpm y el pellet se resuspendió en PBS por sonificado y se sembró en un gradiente discontinuo de sacarosa 15%-60%. Luego de ultracentrifugar durante 2 hs a 46000 rpm se recogió la banda de virus que se obtuvo en la interfase del gradiente. Para concentrar y descartar la sacarosa se llevó a cabo otra ultracentrifugación a 46000 rpm durante 2 hs. El pellet se resuspendió en PBS por sonificado, obteniéndose una preparación final de virus ^{35}S -VSV con $4,6 \times 10^9$ UFP/ml y $2,8 \times 10^6$ cpm/ml.

Ensayo de adsorción a 0°C.

Células Vero o BHK-21 crecidas en viales de 5 ml se pretrataron con $50\ \mu\text{g/ml}$ de MA durante 2 hs a 37°C , luego se realizó un lavado con medio de unión frío (MEM sin suero suplementado con $0,5\ \text{mg/ml}$ de seroalbúmina bovina, BSA y $3\ \text{mM}$ de HEPES). Aproximadamente 1 a 3×10^4 cpm/vial de ^{35}S -VSV se agregaron con el medio de unión y los viales se incubaron en agitación durante distintos tiempos a 0°C . Luego de descartar el inóculo y realizar tres lavados con medio de binding frío, las células se solubilizaron en NaOH $0,1\ \text{N}$ SDS 1% durante 15 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 3 ml de líquido de centelleo y la radioactividad total asociada a las células se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

Ensayo de adsorción a 37°C .

Células Vero o BHK-21 crecidas en viales de 5 ml se trataron con $50\ \mu\text{g/ml}$ de MA durante 2 hs antes o durante la hora de adsorción a 37°C que se realizó incubando las células con 3×10^4 cpm/vial de ^{35}S -VSV en medio de unión. Al cabo de dicho tiempo se descartó el inóculo, se realizaron tres lavados con medio de unión y se cuantificó tanto la radioactividad total asociada a células (como se explicó en el ensayo anterior) como la radioactividad internalizada. En este último caso, una serie de viales se trataron con $1\ \text{mg/ml}$ de proteinasa K (PK, Sigma) en PBS durante 45 min a 0°C con agitación. Luego, se agregó PBS con $0,2\ \%$ de BSA y $1\ \text{mM}$ de PMSF, las células se trasvasaron a un tubo eppendorf y se centrifugaron. El

pellet se lavó dos veces con PBS 0,2 % de BSA y finalmente se resuspendió en NaOH 0,1 N SDS 1% durante 15 min a temperatura ambiente. En ambos casos, la radioactividad se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

Ensayo de internalización.

Células Vero o BHK-21 crecidas en viales de 5 ml se pretrataron con 50 µg/ml de MA. Luego, las células se infectaron con 3×10^4 cpm/vial de ^{35}S -VSV en medio de unión durante 1 h a 0°C. Al cabo de dicho tiempo, se descartó el inóculo, se realizaron dos lavados con medio de unión y los viales se incubaron con MEM 1,5% durante distintos tiempos a 37°C. A los respectivos tiempos se cuantificó la radioactividad : total asociada a células, internalizada y soluble en el sobrenadante. Las dos primeras, como se explicó anteriormente y la última se llevó a cabo en una tercera serie de duplicados del siguiente modo : los sobrenadantes se trasvasaron a un tubo eppendorf, se agregó un volumen igual de ácido tricloro acético (TCA) 10 % y se incubó durante 45 min a 0°C. Luego, los tubos se centrifugaron y el sobrenadante obtenido se mezcló con el líquido de centelleo para cuantificar la radioactividad soluble.

Purificación de VSV.

Se siguió el mismo protocolo usado para marcar el virus sin utilizar precursor radioactivo.

Células Vero crecidas en cuatro botellas de 35 ml de capacidad se infectaron con VSV, luego de 24 hs de incubación a 37°C en MEM 1,5% se cosechó el sobrenadante de las cuatro botellas (140 ml) para utilizarlo como fuente de virus. Dicho sobrenadante se clarificó por centrifugación durante 20 min a 8500 rpm, se descartó el precipitado y el sobrenadante se ultracentrifugó durante 2 hs a 26000 rpm. El pellet se resuspendió en PBS por sonicado y se sembró en un gradiente discontinuo de sacarosa 15%-60%. Luego de ultracentrifugar durante 2 hs a 46000 rpm se recogió la banda de virus que se obtuvo en la interfase del gradiente. Para concentrar y descartar la sacarosa se llevó a cabo otra ultracentrifugación a 46000 rpm durante 2 hs. El pellet se resuspendió en PBS por sonicado y es lo que se va a utilizar como virus purificado. Determinación de proteínas por el método de Bradford: 1,85 µg/ml.

Obtención de extractos celulares.

Monocapas de células Vero o BHK-21 crecidas durante 24 hs en viales de 10 ml se trataron con 50 µg/ml de MA durante 1 h a 37°C o a 4°C. Al cabo de dicho tiempo las células se lavaron tres veces con PBS, se resuspendieron en 50 µl de agua bidestilada por vial y se congelaron a -70°C. Luego de tres ciclos de congelado y descongelado se determinó la concentración proteica de los diferentes extractos por el método de Bradford que osciló entre los 2 y 5 µg/µl.

Ensayo de fosforilación in-vitro.

La reacción de fosforilación in-vitro se llevó a cabo según un protocolo standard (Beckes y col.); en un volumen final de 15µl incubando 10 µg de VSV purificado en presencia o ausencia de 2 µg de extracto celular en 50 mM de Tris-acetato pH 8, 8 mM MgCl₂, 0,1% NP-40, 2 mM DTT, 25 µM de ATP y 10 µCi ATPγ³²P (NEN, New England), durante 1h a 37°C. La reacción se frenó con 15 µl de buffer muestra y los 30µl se sembraron en un gel de poliacrilamida 10% con SDS. Luego de teñir, decolorar y secar el gel, se expuso a una película radiográfica Kodak durante 24 hs a -70°C hasta su revelado.

Ensayo de fosforilación in-vivo.

Células BHK-21 crecidas durante 24 hs en viales de 5ml con MEM 5% se incubaron otras 24 hs en MEM sin fosfato (Gibco). Luego, las células se infectaron con VSV a una m.i.=1 durante 1 h a 37°C. Al cabo de la adsorción, las monocapas se trataron con distintas concentraciones de MA en MEM sin fosfato. A las 4 hs p.i. sin descartar el sobrenadante se agregó 100 µCi/ml de ³²PO₄HNa₂ (CONUAR) durante 2 hs a 37°C. Al cabo de dicho tiempo se lavó con PBS y las células se levantaron con 50 µl de buffer muestra precalentado a 100°C por vial. Las muestras así obtenidas se sonicaron y 15 µl se sembraron en un gel de poliacrilamida 10% con SDS. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de PVDF (MSI) a 0,8 mA/cm² durante 1h utilizando el sistema Novablot de LKB. Las proteínas fosforiladas se revelaron exponiendo la membrana a una película radiográfica Kodak durante 24 hs a -70°C.

“Inmunoblotting” anti-P_{VSV}.

Luego de ser expuesta, para revelar las proteínas marcadas con ^{32}P , la membrana obtenida en el punto anterior se usó para realizar un “inmunoblotting” anti-P_{VSV}. El bloqueo se realizó incubando la membrana con una solución 5% BSA 0,5% Tween en buffer TS (Tris-NaCl) durante toda la noche en la heladera. Después la membrana se incubó con una dilución 1/2000 de un anticuerpo policlonal anti-P_{VSV} (gentilmente cedido por el Dr. Amiya Banerjee, The Cleveland Clinic Foundation) en la solución de bloqueo durante 1h con agitación a temperatura ambiente. Antes de agregar el segundo anticuerpo se realizaron cinco lavados con 0,1% Tween en TS, luego la membrana se incubó con una dilución 1/1000 del anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (ICN) en la solución de bloqueo durante 1h con agitación a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron cinco lavados con 0,1% Tween en TS y finalmente las bandas se revelaron con el reactivo de quimioluminiscencia (Dupont NEN) en una película radiográfica.

RESULTADOS

PRIMERA PARTE

1. PRETRATAMIENTO.

1.1. Caracterización del estado refractario a la infección viral inducido por MA.

Los estudios previos en donde se describe el efecto del pretratamiento con meliacina sobre diferentes cultivos celulares fueron realizados con extractos parcialmente purificados tal como se menciona en la introducción. En el presente trabajo de tesis como fuente de MA se utilizó una fracción obtenida a partir de un proceso de purificación parcialmente modificado. Por esta razón se decidió comenzar por definir las características del establecimiento del estado refractario a la infección viral (o estado antiviral), inducido por el principio activo presente en dicha fracción, en función de la concentración, temperatura y tiempo de tratamiento en células Vero. Para cuantificar y poner de manifiesto el estado de inhibición se eligió el método de plaqueo directo y al virus VSV. Una vez caracterizado el sistema, se investigó la acción de distintos inhibidores de funciones o procesos celulares sobre el establecimiento del estado antiviral, con el objeto de establecer cuáles participan en el mecanismo de inducción.

1.1.a. Efecto de la concentración de MA.

Células Vero crecidas en monocapa se trataron con distintas concentraciones de MA durante 2 hs a 37°C. Luego de descartar el sobrenadante, las células se infectaron con aproximadamente 100 UFP de VSV. Al cabo de 1 h de adsorción se removió el inóculo, las células se cubrieron con medio semisólido y se incubaron a 37°C durante 24 hs. Los porcentajes de reducción en el número de placas se calcularon respecto del control de virus (CV) sin tratar y los porcentajes de inhibición se graficaron en una curva dosis-respuesta (figura 6). Los resultados obtenidos muestran que al tratar las células con concentraciones mayores a 0,1 µg/ml de MA las mismas desarrollan un estado refractario a la infección viral que se traduce en la inhibición del número de placas. Dicha inhibición aumentó en forma lineal con la concentración de MA utilizada hasta los 1,2 µg/ml aproximadamente, concentraciones mayores redujeron en un 100 % el número de placas siendo la concentración efectiva que produce un 50 % de inhibición (CE₅₀) 0,5 µg/ml.

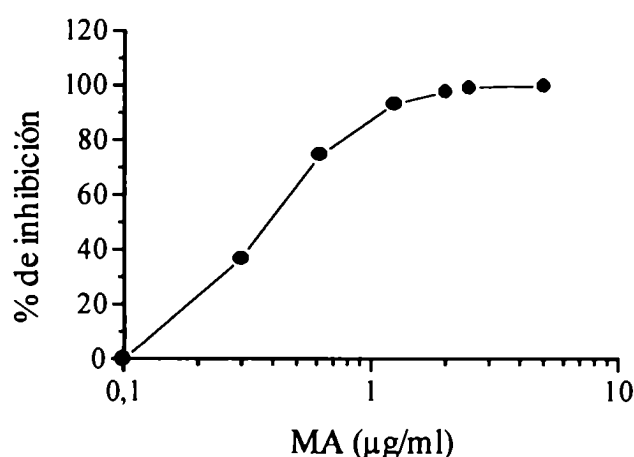


Figura 6. Curva dosis-respuesta obtenida por el pretratamiento con MA. Monocapas de células Vero se pretrataron con distintas concentraciones de MA durante 2 hs a 37°C. Luego se removi6 el sobrenadante y las células se infectaron con 100 UFP de VSV. Al cabo de la adsorción a 37°C se descart6 el in6culo, las células se cubrieron con medio semis6lido y se incubaron durante 24 hs a 37°C. La reducci6n en el n6 de UFP se expres6 como porcentaje de inhibici6n respecto del CV sin tratar.

1.1.b. Efecto de la temperatura y tiempo de tratamiento.

Para el estudio de la dependencia del establecimiento del estado antiviral con el tiempo de contacto de las células con MA y la temperatura de tratamiento, se eligió trabajar con concentraciones de 1 o 2 µg/ml de MA, que según los datos de la figura 1 producen entre un 80 y 100 % de resistencia a la infecci6n viral.

En primer lugar, las células se trataron con 1 µg/ml de MA durante distintos tiempos a 37°C y a 4°C e inmediatamente despu6s de la remoci6n de MA se infectaron con 100 UFP de VSV y se incubaron 24 hs a 37°C hasta el desarrollo de las placas. Los datos de reducci6n en el n6mero de placas obtenidos se expresaron como porcentajes de inhibici6n respecto del CV y se graficaron en la figura 7. Estos resultados confirmaron, por un lado, que a 37°C el estado antiviral evoluciona con el tiempo. A los 20 min de incubaci6n de las células con MA se observa protecci6n y el m6ximo de inhibici6n se alcanza a las 2 hs de tratamiento, tiempos de exposici6n mayores no aumentan el porcentaje de inhibici6n (datos no mostrados).

A 4°C no se induce el establecimiento del estado antiviral confirmando que MA necesita de un metabolismo celular activo para poder actuar (Andrei y col. 1988).

Dado el tipo de respuesta encontrado, la siguiente pregunta fue ver si la presencia de MA en el medio extracelular se requería en forma permanente durante las dos horas de pretratamiento. Para ello, se agreg6 2 µg/ml de MA durante distintos tiempos a 37°C pero luego de descartar el sobrenadante conteniendo MA se agreg6 medio de cultivo sin MA y se

incubó a 37°C hasta que se cumplieran las 2 hs de pretratamiento para luego infectar, en lugar de hacerlo inmediatamente después de remover el antiviral.

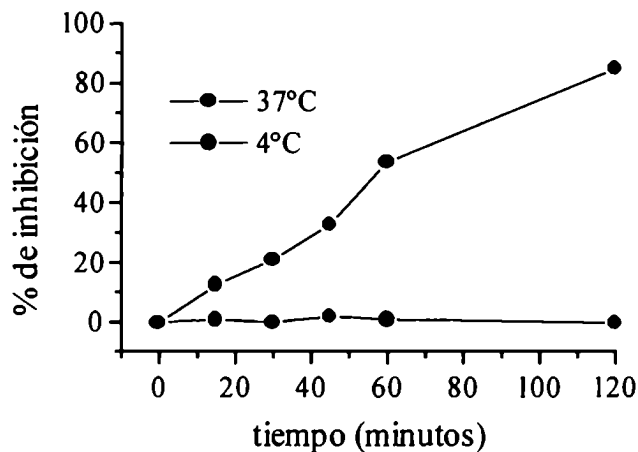


Figura 7. Efecto de la temperatura y tiempo de tratamiento. Monocapas de células Vero se trataron con 1 µg/ml de MA durante distintos tiempos a 37°C y a 4°C. Después se descartó el sobrenadante, se infectó con 100 UFP de VSV y se incubó 1 h a 37°C. Luego se removió el inóculo y las células se incubaron bajo metil celulosa a 37°C. A las 24 hs p.i. se contó el n° de UFP y se calcularon los porcentajes de inhibición.

Los resultados obtenidos muestran (figura 8) que en la inducción del estado antiviral no es necesario que MA esté presente todo el tiempo puesto que con sólo 30 min. de contacto se logra, a las dos horas, el mismo grado de inhibición (figura 6). Estos resultados indican además, que cuando el compuesto se remueve del medio extracelular el efecto de MA no revierte inmediatamente, y que en el mecanismo de inducción existe una etapa dependiente de la presencia de MA y otra independiente, durante la cual no se necesita que MA esté presente, al menos en el medio extracelular.

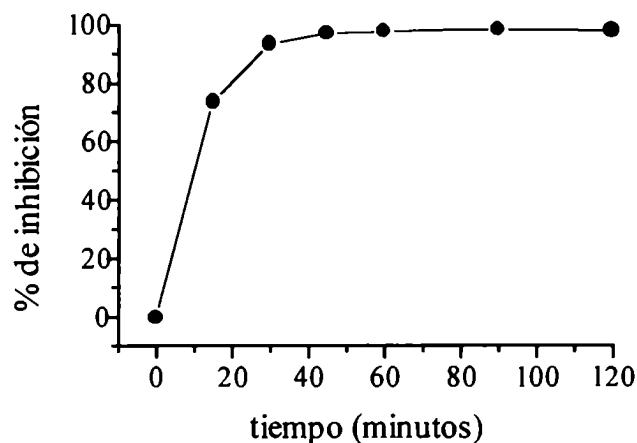


Figura 8. Remoción de MA del medio extracelular. Células Vero se trataron con 2 µg/ml de MA durante distintos tiempos a 37°C. Al cabo de cada tiempo se descartó el sobrenadante, se agregó MEM 1,5% y se incubó a 37°C hasta cumplir las 2 hs de tratamiento. Luego se infectó con VSV y se incubó 1h a 37°C. Finalmente se descartó el inóculo y las células se incubaron durante 24 hs a 37°C. Los porcentajes de inhibición se calcularon respecto al CV sin tratar.

1.1.c. Hipótesis del receptor.

La posible existencia de un receptor proteico para MA, expuesto en la membrana de las células Vero, se planteó como hipótesis que explicara lo observado en la figura 3. Una estrategia disponible que se empleó para investigarla fue, usar una proteasa en condiciones tales que permitiera remover de la superficie celular los dominios proteicos extracelulares sin afectar la viabilidad de la célula. Para ello, células Vero se trataron con quimotripsina (QT) durante 30 min a 37°C antes de la hora de pretratamiento con 1 µg/ml de MA. Luego se descartó el sobrenadante, las células se infectaron con VSV y se incubaron durante 24 hs a 37°C. Los resultados del n° de UFP obtenidos en cada caso se presentan en la figura 9 y muestran que el tratamiento con la proteasa produjo un aumento en el valor del CV del orden de un 22%. Esto se explica porque el receptor de VSV, de naturaleza lipídica, queda más expuesto luego del tratamiento con la QT favoreciendo la adsorción del virus (Schlegel y col. 1982a). En el caso de las células incubadas con MA, también se ve que el tratamiento con QT causó un aumento en el n° de UFP respecto de las células que no fueron tratadas con la proteasa. Esto ocasionó que el porcentaje de inhibición obtenido con MA disminuya del 88,6 % al 71,5% en las células tratadas con la QT, sin embargo dicho porcentaje aumenta al 76,7% si se calcula respecto del CV tratado con QT, es decir que MA puede seguir actuando luego del tratamiento de las células con una proteasa sugiriendo que ninguna proteína expuesta en la membrana celular está implicada en su acción.

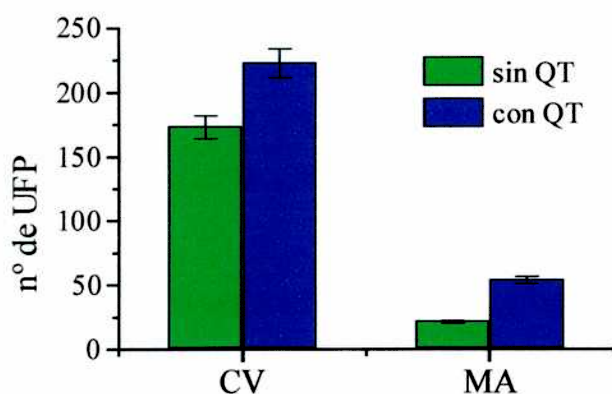


Figura 9. Efecto del tratamiento con QT sobre la acción de MA. Monocapas de células Vero se trataron con 50 µg/ml de QT durante 30 min a 37°C. Luego se descartó el sobrenadante y las células se lavaron tres veces con PBS. Entonces se agregó 1 µg/ml de MA durante 1 h a 37°C. Al cabo de dicho tiempo se removió el sobrenadante y las células se infectaron con VSV. Después de la hora de adsorción las células se incubaron bajo metil celulosa a 37°C durante 24 hs antes de contar el n° de UFP.

1.1.d. Efecto de la cicloheximida y la actinomicina D.

Para investigar que funciones o procesos celulares participan durante la etapa de establecimiento del estado antiviral inducido por MA se comenzó utilizando dos inhibidores, la actinomicina D (act D) y la cicloheximida (CHX) que afectan la transcripción y traducción celular, respectivamente.

Por un lado, las células se trataron con 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de act D durante 30 min a 37°C, luego, sin descartar el sobrenadante se agregó MA (0,5 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó por 2 hs más a la misma temperatura. Al cabo de dicho tiempo se removió el medio y las células se infectaron con 100 UFP de VSV incubándose durante 24 hs a 37°C hasta la aparición de placas visibles. Los datos de la bibliografía corroboran que en las condiciones ensayadas la act D no afecta la transcripción viral pero inhibe la transcripción celular. El porcentaje de inhibición, calculado con los datos de reducción en el número de UFP, obtenido con MA sola fue de un 57,2%, en cambio, cuando se realizó el tratamiento con MA en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de act D aumentó al 83,6% y al 100% con 5 $\mu\text{g/ml}$ de act D. Estos resultados estarían indicando que MA no requiere de transcripción celular para inducir el estado antiviral, por el contrario, si la transcripción está inhibida se favorece su acción.

Por otro lado, las células se trataron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CHX durante las 2 hs de tratamiento con 2 $\mu\text{g/ml}$ de MA. Luego se descartó el sobrenadante, las células se infectaron con 100 UFP de VSV y se incubaron durante 24 hs a 37°C. Los resultados obtenidos mostraron que en las condiciones ensayadas la CHX no afectó la multiplicación viral ni la inhibición producida por MA (datos no mostrados), demostrando que durante el establecimiento del estado antiviral inducido por MA no se requiere de la síntesis de un producto proteico.

1.1.e. Efecto de distintos inhibidores de quinasas y fosfatasas.

El mecanismo de fosforilación/desfosforilación proteica controla muchos de los eventos biológicos que tienen lugar en los organismos vivos, regulando por ejemplo el metabolismo, la división celular, la expresión génica, la diferenciación celular, el aprendizaje y la memoria. Intracelularmente, la fosforilación reversible también participa en la transducción de señales disparada por efectores extracelulares como hormonas, mitógenos, citoquinas y neurotransmisores. Los residuos aminoacídicos que se fosforilan

predominantemente son serina (Ser), treonina (Thr) y tirosina (Tyr), las quinasas de proteínas se dividen en dos grupos aquellas que fosforilan en Ser/Thr y las que lo hacen en Tyr, mientras que las fosfatasa de proteínas se dividen en tres grupos según desfosforilen los residuos Ser/Thr, Tyr o Ser/Thr/Tyr, respectivamente. Se dispone de inhibidores específicos de los distintos grupos de quinasas o fosfatasa para estudiar si dichas enzimas median una dada respuesta biológica en células intactas.

Inhibidor de PKR.

Considerando el rol de la PKR en el efecto antiviral del IFN- α y en la transducción de señales de otras citoquinas y factores de crecimiento, tal como se describió en la introducción, se investigó el efecto de un inhibidor específico para esta enzima, la 2-aminopurina (2-AP), sobre el desarrollo del estado antiviral inducido por MA. Células Vero crecidas en monocapa se trataron con 10 mM de 2-AP desde 1 h antes del agregado de MA hasta su remoción luego de las 2 hs de pretratamiento. Después, las células se infectaron con aproximadamente 100 UFP de VSV y se incubaron durante 24 hs. Los datos de UFP obtenidos con cada tratamiento se graficaron en la figura 10, observándose que no existen diferencias significativas entre el CV y las células tratadas con 2-AP, es decir que en las condiciones utilizada no afectó la multiplicación viral. Por otro lado, al comparar la reducción en el número de placas producida por MA sola respecto de MA más 2-AP, tampoco se observan diferencias significativas y los porcentajes de inhibición obtenidos con 1 y 2 μ g/ml de MA (90,4 y 97,6 %, respectivamente) no se modificaron por el agregado de la 2-AP.

Por lo tanto en las condiciones ensayadas la 2-AP no afectó el establecimiento del estado antiviral inducido por MA sugiriendo que la PKR no tiene ninguna participación en dicho mecanismo.

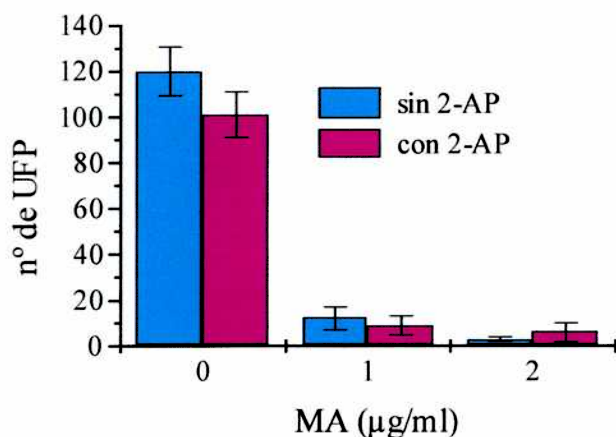


Figura 10. Efecto de la 2-AP sobre la inducción del estado antiviral. Células Vero se trataron con 10 mM de 2-AP durante 1 h a 37°C, sin descartar el sobrenadante se agregó MA y se incubó durante 2 hs más a 37°C. Al cabo de dicho tiempo se removió el sobrenadante y las células se infectaron con VSV. Al finalizar la hora de adsorción las células se cubrieron con medio semisólido y se incubaron a 37°C. A las 24 hs p.i. se contó el nº de UFP obtenido con los distintos tratamientos.

Inhibidores de tirosinas quinasas y fosfatasas.

La fosforilación en Tyr es un evento menos abundante respecto de la fosforilación en Ser/Thr, sin embargo, tiene un rol central en muchos pasos de los caminos de transducción de señales de diferentes citoquinas, hormonas y factores de crecimiento. Para evaluar su función en la inducción del estado antiviral producido por MA se utilizó, como inhibidor de tirosina fosfatasas, el ortovanadato de sodio (VAN) y como inhibidores de tirosina quinasas, la genisteína (Gen) y la tirfostina B46 (Tir B46).

Cuando se repitió la curva dosis-respuesta de MA agregando durante las 2 hs de pretratamiento, 20 μM de VAN (figura 11) se observó que el grado de inhibición fue mayor que en su ausencia. El efecto potenciador del VAN se manifestó cuando MA estaba presente ya que se observa que *per se* no produce ningún efecto.

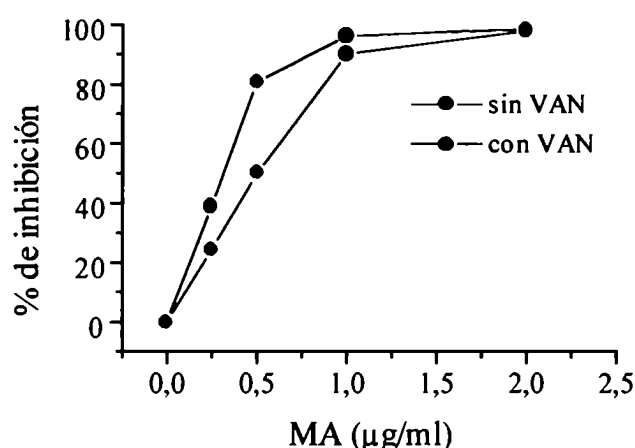


Figura 11. Efecto del VAN sobre la inducción del estado antiviral. Monocapas de células Vero se trataron con distintas concentraciones de MA en ausencia o en presencia de 20 μM de VAN durante 2 hs a 37°C. Luego se descartó el sobrenadante y las células se infectaron con VSV. Al finalizar la hora de adsorción las células se incubaron a 37°C durante 24 hs. Los porcentajes de inhibición se calcularon respecto del CV sin tratar.

En un segundo experimento se decidió tratar a las células con distintas concentraciones de VAN durante las dos horas de incubación con una concentración constante de MA (0,25 $\mu\text{g/ml}$) tal que, por su escaso grado de inhibición, permitiera poner de manifiesto la respuesta observada en la figura 11. Los datos obtenidos y graficados como porcentajes de inhibición en la figura 12 muestran que, efectivamente la presencia de VAN incrementa en forma concentración dependiente la actividad de MA. La inhibición del orden del 7% obtenida con 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de MA llegó a aumentar diez veces cuando se agregó 80 μM de VAN. En ninguno de los cultivos controles tratados con distintas concentraciones de VAN, ni la viabilidad celular ni la multiplicación del virus, se vieron afectados por el tratamiento con el inhibidor (datos no mostrados).

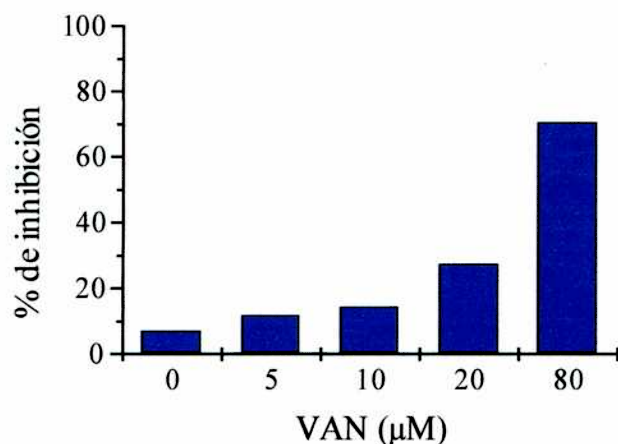


Figura 12. Efecto dosis dependiente del VAN sobre la inducción del estado antiviral. Células Vero se trataron con 0,25 $\mu\text{g/ml}$ de MA sola o en presencia de distintas concentraciones de VAN durante 2 hs a 37°C. Luego se descartó el sobrenadante, se infectó con VSV y al cabo de la hora de adsorción las células se incubaron bajo metil celulosa a 37°C. A las 24 hs p.i. se calcularon los porcentajes de inhibición respecto al CV sin tratar.

Luego se investigó si el efecto del VAN variaba si se agregaba antes o después del tratamiento con MA. Para ello las células se trataron con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de MA durante 1 h y con 20 μM de VAN durante 30 min antes de agregar MA. Los resultados obtenidos se graficaron en la figura 13 y se observa que el VAN agregado antes de MA no modificó significativamente la reducción en el número de UFP obtenida con MA sola. En cambio, en el control realizado con las mismas concentraciones de MA y VAN pero incubados juntos, el porcentaje de inhibición de MA aumentó del 38 % al 95,7 % en presencia del VAN. De igual modo, cuando las células se trataron primero con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de MA durante 1 h y luego de remover el antiviral, con 20 μM de VAN por el mismo período de tiempo, el inhibidor ni aumentó ni disminuyó la reducción del número de UFP obtenida con MA sola (figura 13). Por lo tanto, para poder potenciar la inducción del estado antiviral, el VAN debe estar presente en el medio extracelular durante el tratamiento con MA.

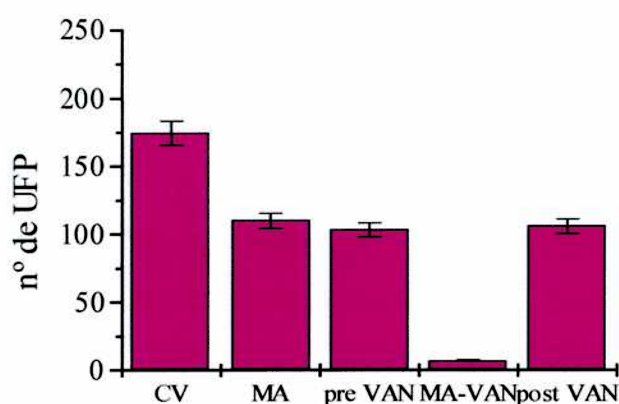


Figura 13. Efecto del VAN agregado a distintos tiempos. Monocapas de células Vero se trataron a 37°C con 20 μM de VAN durante 30 min antes de agregar MA (pre VAN), o durante 1 h después de remover MA (post VAN) o durante el agregado de MA (MA-VAN). El tratamiento con MA fue con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ durante 1 h a 37°C. Al cabo de los distintos tratamientos se removió el sobrenadante y se infectó con VSV. A las 24 hs se contó el nº de UFP.

Los resultados obtenidos sugieren que durante el mecanismo de inducción del estado antiviral desencadenado por MA podría estar involucrada alguna fosforilación en tirosina, que se encuentra favorecida por el agregado de un inhibidor de tirosina fosfatasas como el VAN.

Obviamente, la fosforilación en tirosina es el resultado de un balance controlado entre la actividad de las quinasas y las fosfatasas de tirosina, por esta razón también se evaluó el efecto de dos inhibidores de tirosina quinasas, la Gen y la Tir B46, sobre el establecimiento del estado antiviral inducido por MA. Monocapas de células se trataron con distintas concentraciones de Gen 30 min antes y durante las 2 hs de pretratamiento con MA, luego se infectaron con VSV y se incubaron a 37°C. A las 24 hs p.i. se contó el n° de UFP y se calculó el porcentaje de inhibición respecto del CV. Los resultados muestran que el grado de inhibición obtenido con MA no se modificó ni positiva ni negativamente en presencia de ninguna de las concentraciones de Gen utilizadas (figura 14). Los controles realizados con Gen sola no mostraron efectos adversos ni sobre la multiplicación viral ni sobre la viabilidad celular (datos no mostrados).

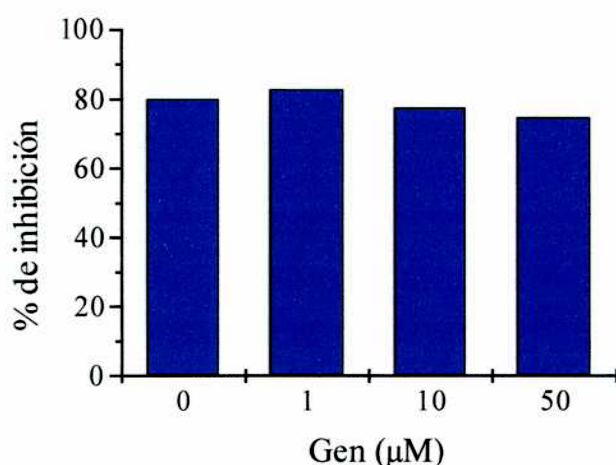


Figura 14. Efecto de la Gen sobre la inducción del estado antiviral. Monocapas de células Vero se trataron con distintas concentraciones de Gen durante 30 min a 37°C, luego, sin descartar el sobrenadante se agregó 1 µg/ml MA y se dejó incubando durante 2 hs más. Al cabo de dicho tiempo, las células se infectaron con 100 UFP de VSV. Después de 1 h a 37°C se descartó el inóculo y las células se incubaron a la misma temperatura bajo metil celulosa. A las 24 hs p.i. se calcularon los porcentajes de inhibición respecto del CV sin tratar.

El mismo protocolo se repitió utilizando distintas concentraciones de Tir B46 y, como control, Tir A1 porque tiene la misma estructura química que las tirfostinas pero no es activo como inhibidor de tirosina quinasas. En este caso, los resultados obtenidos muestran (figura 15) que el tratamiento con el Tir B46 produjo un aumento significativo en la reducción del número de UFP debida a MA sin alterar la multiplicación del virus ni la viabilidad celular (datos no mostrados). El porcentaje de inhibición del 37 % obtenido con 0,5 µg/ml de MA aumentó al 55,4% y al 63,2% cuando se usó 1 y 10 µM de Tir B46, respectivamente, durante

el tratamiento con MA. Este efecto potenciador de la Tir B46 sobre la acción de MA no se observó cuando el experimento se realizó con el control negativo Tir A1.

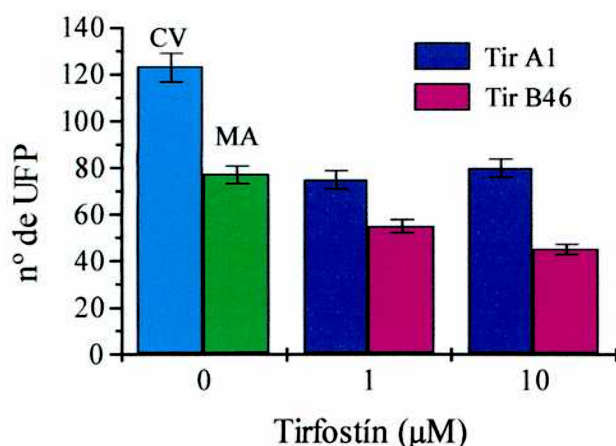


Figura 15. Efecto de la Tir B46 sobre la inducción del estado antiviral. Células Vero se trataron con 1 y 10 µg/ml de Tir A1 o Tir B46 durante 30 min a 37°C. Luego sin descartar el sobrenadante se agregó 0,5 µg/ml MA incubándose por 2 hs más a la misma temperatura. Al cabo de dicho tiempo se removió el sobrenadante y las células se infectaron con VSV durante 1h a 37°C. Luego, las células se cubrieron con el medio semisólido incubándose durante 24 hs a 37°C para cuantificar el n° de UFP.

Considerando que el VAN y el Tir B46 actúan sobre enzimas que realizan funciones inversas, es de esperar que al medir su acción sobre un mismo fenómeno, se obtengan resultados contrarios. Sin embargo, en este caso ambos compuestos potenciaron en mayor o menor medida, la acción inhibitoria de MA. De todos modos, los resultados obtenidos con estos compuestos sugieren que en el mecanismo de inducción del estado antiviral de MA estaría involucrada alguna/s fosforilación/es en tirosina.

Inhibidores de serina/treonina quinasas y fosfatasas.

Para completar la investigación sobre la participación de la fosforilación proteica en el mecanismo de inducción de MA, se evaluó el rol de las fosforilaciones en ser/treonina mediante el uso de dos inhibidores de fosfatasas y uno de quinasas, el ácido okadaico (OKA), la caliculina A (CA) y la estaurosporina (STA), respectivamente. Monocapas de células Vero se trataron con 10 nM de OKA, CA o de STA durante 1 h antes y 1 h durante el agregado de distintas concentraciones de MA. Luego las células se infectaron con VSV y se incubaron durante 24 hs a 37°C para contar el n° de UFP. Las curvas de inhibición de MA obtenidas tanto en presencia de OKA y de CA como de STA no variaron significativamente respecto de la obtenida en ausencia de los inhibidores (figura 16). Es decir que en las condiciones ensayadas ni OKA ni CA ni STA afectaron el establecimiento del estado antiviral

desencadenado por MA sugiriendo que en este mecanismo, la fosforilación en Ser/Treo no jugaría un rol esencial.

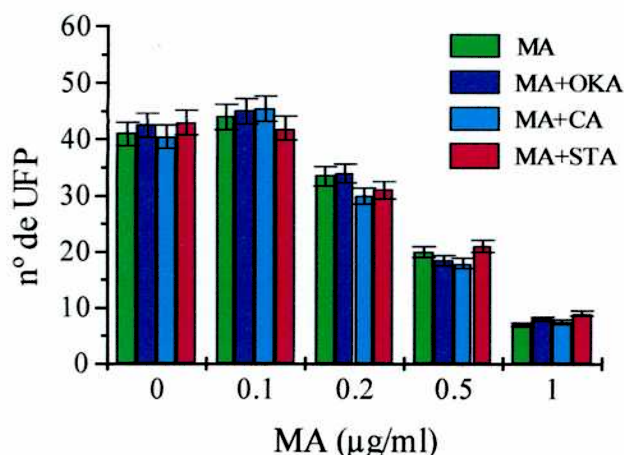


Figura 16. Efecto de los inhibidores de Ser/Treo quinasas y fosfatasas sobre la inducción del estado antiviral. Células Vero se trataron con 10 nM de OKA, CA o STA durante 1h a 37°C, sin descartar el sobrenadante se agregaron las distintas concentraciones de MA y se incubó por 1 h más. Al cabo de dicho tiempo, las células se infectaron con VSV y al finalizar la hora de adsorción se cubrieron con el medio semisólido. A las 24 hs p.i. se contó el nº de UFP obtenido con los distintos tratamientos.

1.1.f. Comparación con el sistema IFN.

La inducción de un estado antiviral en células en cultivo es un fenómeno biológico que también se observa en respuesta al tratamiento con IFN tal como se describe en la introducción. Por esta razón se consideró provechoso ensayar el efecto de los distintos inhibidores sobre el sistema IFN, sobre todo teniendo en cuenta que se conoce la participación de las fosforilaciones en tirosina, de una PKR-IFN dependiente y que se requiere de transcripción celular para el establecimiento del estado antiviral. El efecto de los inhibidores de dichas enzimas celulares en este sistema se comparó respecto de lo observado con MA.

En el primer caso, células Vero se trataron con distintas concentraciones de VAN, Gen y Tir B46 durante 30 min a 37°C, luego, sin descartar el sobrenadante se agregó el IFN- α (175 UI/ml) y las células se incubaron durante 4 hs más. Después, los cultivos infectaron con VSV y a las 24 hs p.i. se contó el nº de UFP calculándose los porcentajes de inhibición respecto del CV. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 4 comparando, a una misma concentración de VAN, Gen o Tir B46, el efecto sobre la acción del IFN y de la MA. Los porcentajes de inhibición se normalizaron dividiendo los obtenidos con MA o con IFN en presencia de VAN, Gen o Tir B46 respecto de los obtenidos con MA o IFN solos. Es decir que, si los inhibidores no afectan o inhiben o potencian el efecto de los antivirales, se obtendrán valores iguales, menores o mayores a uno, respectivamente. Con 50 μ M de Gen el porcentaje de inhibición del IFN se redujo casi a la mitad mientras que el de MA no se alteró.

En presencia de 10 μM de Tir B46 o de 20 μM de VAN la inhibición obtenida con IFN se redujo a la mitad mientras que dichas concentraciones aumentaron el porcentaje de inhibición obtenido con MA.

Cuadro 4. Comparación del efecto de distintos inhibidores de Tyr quinasas y fosfatasa sobre la actividad antiviral de IFN y MA.

Inhibidor	IFN-α	MA
Genisteína 50 μM	0,68	0,93
Tirfostina B46 10 μM	0,52	1,69
Vanadato 20 μM	0,58	1,61

Estos resultados confirman que al inhibir la fosforilación/desfosforilación en tirosina se altera el efecto del IFN sobre los cultivos celulares, de acuerdo al rol que dicha modificación post-traducciona juega en este sistema. En cambio, para MA tan sólo se puede atribuir un efecto positivo de dichos inhibidores sin poder inferir el rol real de la fosforilación en tirosina en la inducción del estado antiviral.

En la figura 10 se mostró que la incubación de las células con 2-AP antes y durante las 2 hs de tratamiento con MA no interfiere con el establecimiento del estado antiviral. Sin embargo, para asegurarnos que la 2-AP estaba inhibiendo la PKR, decidimos probar en paralelo su efecto sobre el sistema IFN y MA. A diferencia de lo realizado en la figura 5, se utilizó un tiempo de inducción de 3 hs, que en nuestro sistema resultó ser el mínimo necesario para que se desarrolle la respuesta inducida por IFN. Durante el pretratamiento de las células Vero con IFN o con MA se agregó 10 mM de 2-AP y luego los cultivos se infectaron con VSV. Los datos de reducción en el número de UFP obtenidos muestran que, en estas condiciones tampoco hay diferencias significativas entre la inhibición producida con MA sola o con MA más 2-AP, en ambos casos se obtuvo aproximadamente un 90 % de inhibición. Por el contrario, la inhibición del 91,2 % producida con IFN se redujo significativamente al 46,3 % cuando los cultivos se pretrataron con IFN y 2-AP (figura 17). Estos resultados confirman que, la 2-AP no afecta el establecimiento del estado refractario a

la infección viral inducido por MA, pero si interfiere con el sistema IFN, que requiere la actividad de la PKR para desarrollar su efecto antiviral.

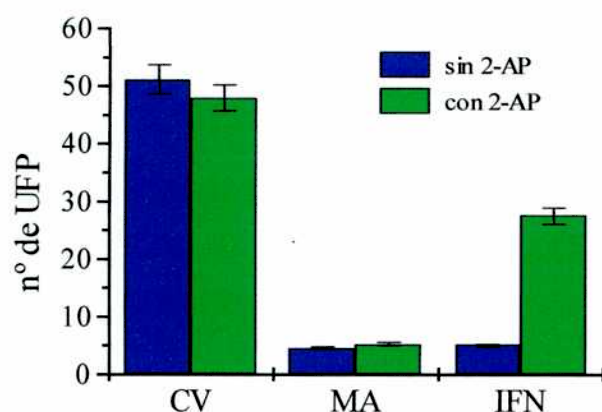


Figura 17. Comparación del efecto de la 2-AP sobre los sistemas IFN y MA. Monocapas de células Vero se trataron con 10 mM de 2-AP sola o en presencia de 1 µg/ml de MA o 178,5 UI/ml de IFN durante 3 hs a 37°C. Al cabo de dicho tiempo las células se infectaron con VSV. Luego de 1h de adsorción a 37°C se descartó el inóculo y las células se incubaron a la misma temperatura bajo metilcelulosa. A las 24 hs p.i. se contó el nº de UFP obtenido con cada tratamiento.

Finalmente, se probó que con 1 µg/ml de act D durante 30 min antes y hasta la remoción de 175 UI/ml de IFN luego de 4 hs de tratamiento, el porcentaje de inhibición del IFN se redujo de un 60% al 0%, ratificando que la act D afecta negativamente la acción del IFN a diferencia de lo que ocurre con MA.

Conclusiones parciales:

De los experimentos hasta aquí analizados se puede concluir que las características del establecimiento del estado refractario a la infección viral en células pretratadas con MA son iguales a las descritas con los extractos crudos de hojas de *M. azedarach* L.. El grado de inhibición depende de la concentración y del tiempo de tratamiento con MA, el máximo efecto se obtiene luego de dos horas de incubación, y las células deben estar metabólicamente activas para desarrollar el estado antiviral. Los nuevos aportes son:

- MA no requiere ninguna molécula de naturaleza proteica expresada en la superficie de las células tratadas para ejercer su acción.
- MA no requiere de los mecanismos de transcripción o traducción celulares activos para establecer el estado antiviral.
- En el mecanismo de inducción no interviene ni la PKR ni ninguna otra quinasa ni fosfatasa de Ser/Treo.
- En el establecimiento del estado antiviral está involucrada alguna/s fosforilaciones en tirosina pero no juegan el mismo rol que en el sistema del IFN.

1.2. Determinación de la etapa del ciclo de multiplicación de VSV afectada por el pretratamiento con MA.

Una vez caracterizado el establecimiento del estado antiviral en células Vero, se comenzó a investigar qué etapa del ciclo de multiplicación de VSV estaba afectada en células Vero y BHK-21 refractarias a la infección viral.

1.2.a. Efecto del pretratamiento con MA sobre la síntesis de proteínas virales.

La síntesis de proteínas constituye un paso importante dentro del ciclo de multiplicación viral y permite separar eventos tempranos de tardíos según tengan lugar antes o después de esta etapa. Por esta razón, para comenzar a investigar qué paso de la multiplicación de VSV está bloqueado en los cultivos pretratados con MA, se decidió estudiar si la reducción en la producción de virus infeccioso estaba acompañada por la inhibición en la expresión de proteínas virales. Células Vero o BHK-21 tratadas con distintas concentraciones de MA durante 2 hs fueron infectadas con VSV a una m.i.=1. A las 5 hs p.i. las células se incubaron con ^{35}S -metionina durante 2 hs, al cabo de ese tiempo, las proteínas marcadas se analizaron en un SDS-PAGE. En la figura 18 (A y B) se muestran las fotografías de los perfiles proteicos obtenidos en los geles para las células Vero y BHK-21, respectivamente. En ambos casos, en las calles de los controles de virus se observan tan sólo cuatro bandas, correspondientes a las proteínas virales, porque la síntesis de las proteínas celulares se inhibe en las células infectadas por VSV. En cambio, en las calles correspondientes a los cultivos de Vero o BHK-21 infectados y tratados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de MA la síntesis de proteínas virales se reduce considerablemente y se observa el mismo patrón de proteínas que en los controles sin infectar (CC), es decir se reestablece la síntesis de todas las proteínas celulares. La especificidad de la inhibición observada se demuestra porque ocurre en forma dependiente de la concentración de MA utilizada y no afecta la síntesis de otra proteína que no sea viral. Estos resultados indican que el pretratamiento con MA está inhibiendo la síntesis de proteínas virales *per se* o como consecuencia de que la etapa afectada es un paso temprano en el ciclo de multiplicación de VSV.

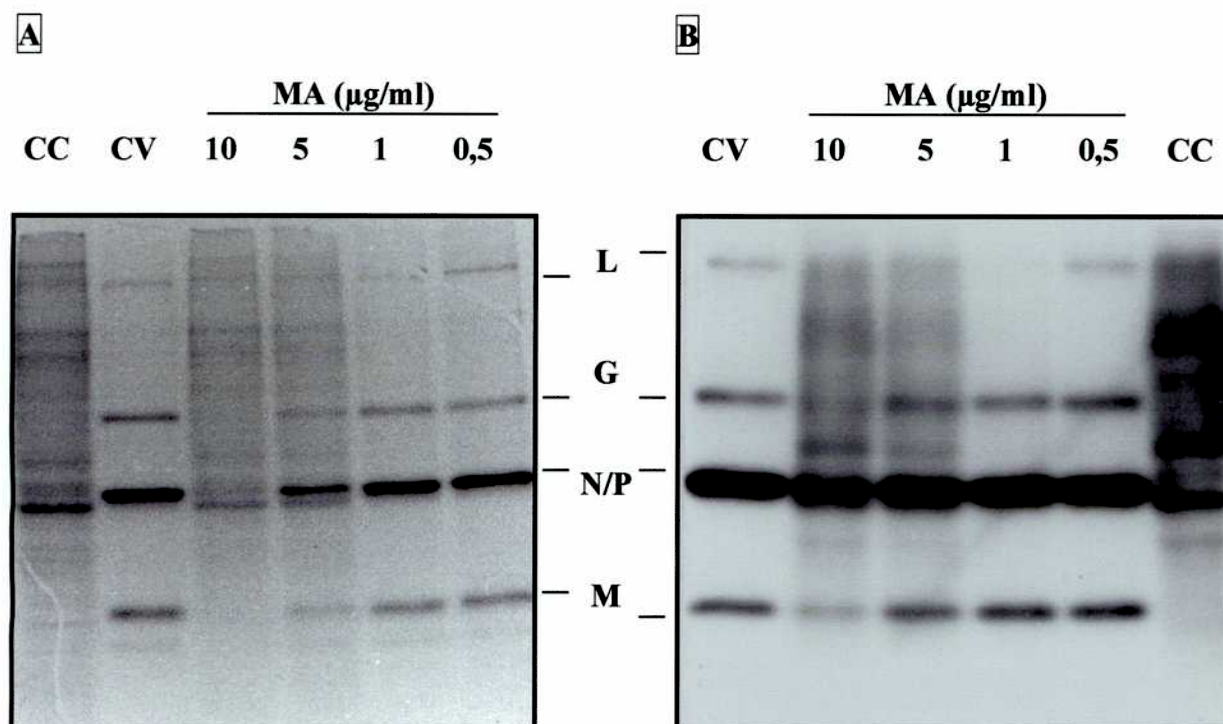
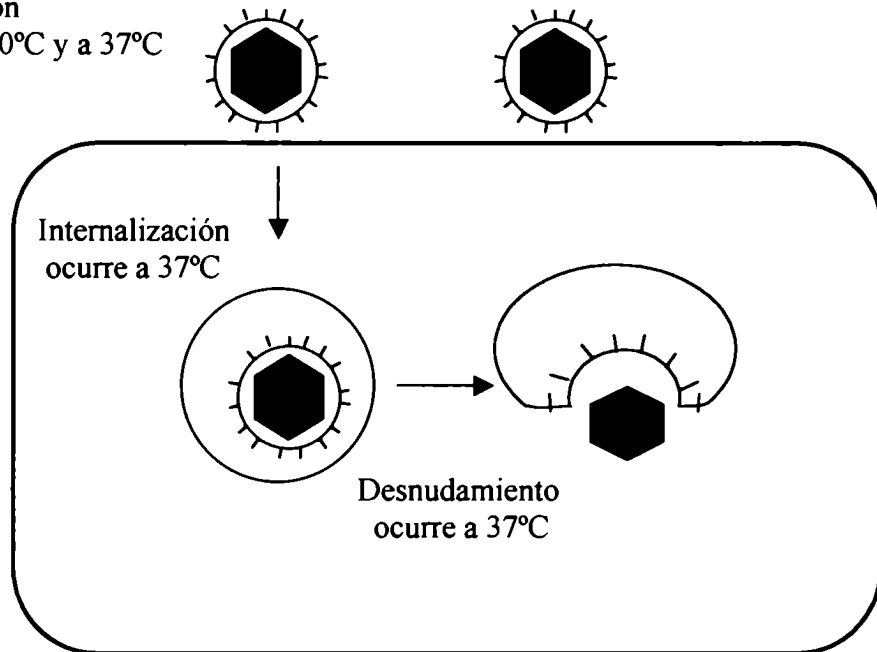


Figura 18. Acción de MA sobre la síntesis de proteínas virales. Células Vero (A) o BHK-21 (B) pretratadas con distintas concentraciones de MA se infectaron con VSV a una m.i.= 1. A las 5 hs p.i. se realizó la marcación con metionina-³⁵S durante 2 hs. Luego, las células se resuspendieron en buffer muestra y las proteínas virales se analizaron mediante un SDS-PAGE 10 % y posterior autorradiografía. CV, control de virus sin tratar. CC, control de células sin infectar ni tratar. L, G, N/P y M corresponden a las cinco proteínas estructurales de VSV.

1.2.b. Efecto del pretratamiento con MA sobre las etapas tempranas del ciclo de VSV.

Para corroborar si la ausencia de síntesis proteica viral producida por el pretratamiento con MA se debe a la inhibición de un paso previo, se investigó el efecto de MA sobre las etapas tempranas del ciclo de multiplicación de VSV, la adsorción, la internalización y el desnudamiento (ver esquema figura 19). Para llevar a cabo estos experimentos se obtuvo una preparación de VSV purificado y marcado metabólicamente con ³⁵S-metionina tal como se describe en materiales y métodos.

Adsorción
ocurre a 0°C y a 37°C



Tratamiento con PK

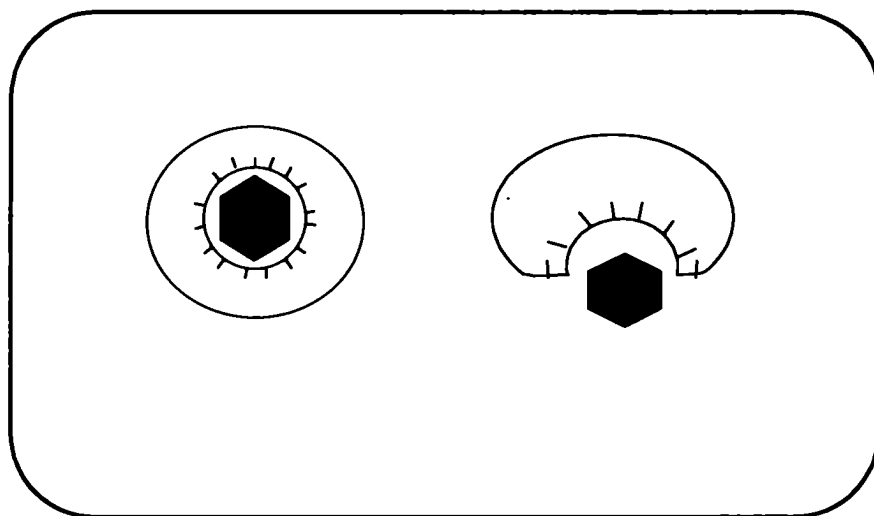


Figura 19. Esquema de las etapas tempranas del ciclo de multiplicación de VSV y efecto del tratamiento con proteinasa K (PK).

Adsorción a 0°C.

Para determinar si la inhibición de VSV para multiplicar en células pretratadas ocurre por un bloqueo en la adsorción, células Vero o BHK-21 se incubaron con VSV a 0°C, temperatura a la cual la adsorción tiene lugar pero la internalización no ocurre. Previamente, los cultivos celulares se trataron con 50 µg/ml de MA durante 2 hs a 37°C y luego se infectaron con ^{35}S -VSV durante distintos tiempos a 0°C. La radioactividad total (medida en cpm) asociada a las células se cuantificó al cabo de cada tiempo graficándose la cinética de adsorción en comparación con cultivos sin tratar (figura 20). Tal como se reporta en la bibliografía (Matlin y col.), luego de 1 h de incubación de VSV con los cultivos no tratados, menos del 10% del virus inoculado se asocia con las células, 5% en Vero y 6,6% en BHK-21. Asimismo, en los cultivos de células Vero o BHK-21 pretratados con MA se alcanzaron los mismos valores que en los respectivos controles y con la misma cinética. Por lo tanto, se concluye que en las células refractarias a la infección viral la adsorción de VSV no está afectada.

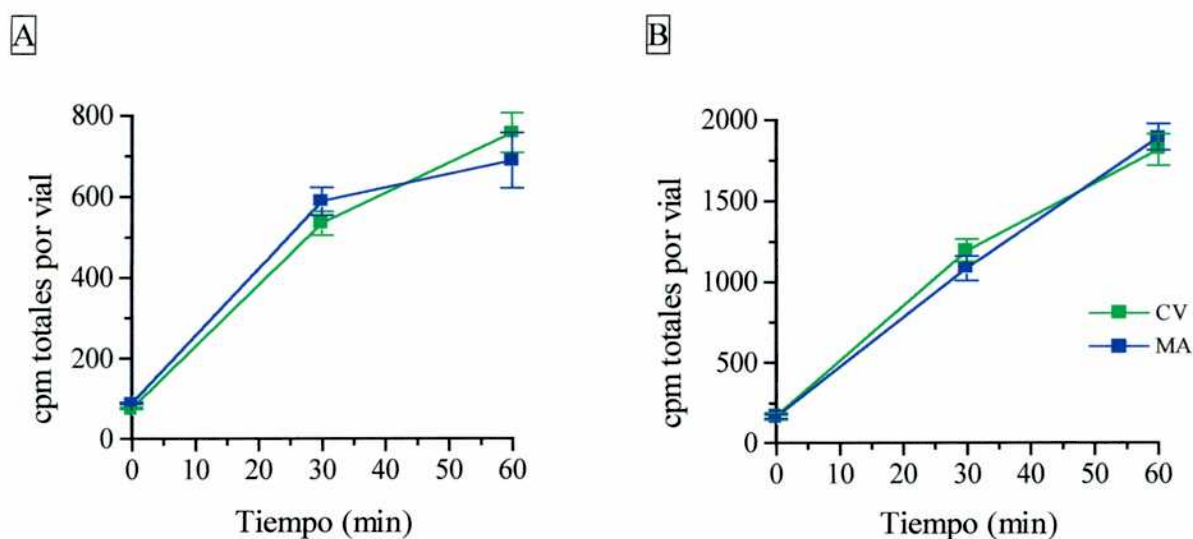


Figura 20. Acción de MA sobre la cinética de adsorción a 0°C. Células Vero (A) o BHK-21 (B) pretratadas con 50 µg/ml de MA durante 2 hs se incubaron con $1,4 \times 10^4$ (A) o 3×10^4 (B) cpm de ^{35}S -VSV por vial durante distintos tiempos a 0°C. Luego, las células se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en NaOH-SDS. La radioactividad asociada a células se cuantificó en un contador de centelleo líquido.

Adsorción a 37°C.

En segundo lugar se estudió la interacción de VSV con células Vero o BHK-21 a 37°C, condiciones bajo las cuales tanto la adsorción como las etapas subsiguientes de internalización y desnudamiento tienen lugar. Células Vero o BHK-21 infectadas con ³⁵S-VSV durante 1 h a 37°C se trataron con MA 2 hs antes o durante la hora de adsorción. Al cabo de dicho tiempo, la radioactividad total asociada a células y la resistente a proteinasa K (pK) se cuantificaron tal como se describe en materiales y métodos. El tratamiento con dicha proteasa se utiliza para remover de la superficie celular el virus unido al receptor (ver figura 19) y de este modo se obtiene la marca que corresponde al virus internalizado, mientras que la marca total corresponde a la suma del virus que permanece adsorbido en la superficie más el internalizado. Los resultados obtenidos (cuadro 5) muestran que, en las células Vero pretratadas, MA produjo una inhibición del orden del 44% en las cpm totales respecto del control de virus sin tratar. Al analizar las cpm resistentes a pK (cpm intern.) se observa que los valores de virus internalizado son similares en ambos casos pero obviamente al calcular el porcentaje de virus internalizado respecto de las cpm totales, éste fue mayor en el caso de los cultivos pretratados. Por el contrario, en las células Vero tratadas con MA durante la hora de incubación con el virus, no se observan diferencias significativas ni en las cpm totales ni en las internalizadas. En el caso de las células BHK-21, con ninguno de los dos tratamientos realizados con MA, se observan diferencias significativas respecto de la marca total e internalizada de los controles de virus sin tratar.

Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que en células Vero pretratadas con MA está bloqueada alguna etapa temprana subsiguiente a la adsorción, mientras que en las células BHK-21 no parece ocurrir lo mismo.

Efecto de MA sobre la internalización y degradación de VSV.

Considerando los resultados obtenidos en el experimento anterior, se decidió estudiar la internalización independientemente de la adsorción analizando la cinética de entrada de VSV previamente unido a las células. Para lo cual, monocapas de células Vero o BHK-21 pretratadas con MA durante 2 hs a 37°C se infectaron con ³⁵S-VSV durante 1 h a 0°C. Luego de realizar una serie de lavados, los cultivos se incubaron durante distintos tiempos a 37°C, al cabo de los cuales se determinó la radioactividad internalizada resistente a pK y la marca

soluble liberada al sobrenadante, como una medida del procesamiento intracelular que sufre la partícula viral luego de la internalización.

Cuadro 5. Acción de MA sobre la penetración de VSV.

Tratamiento	Vero		BHK-21	
	CPM Totales	CPM Intern. (%internalizado)	CPM Totales	CPM Intern. (%internalizado)
Control sin tratar	5816 ± 524	1483 ± 162 (25,5)	2946 ± 192	872 ± 74 (29,6)
MA 2 hs pretratamiento	3273 ± 322	1630 ± 176 (49,8)	3063 ± 234	787 ± 82 (25,7)
MA 1 h durante la infección	5726 ± 556	1277 ± 136 (22,3)	2889 ± 272	820 ± 90 (28,4)

Células Vero o BHK-21 crecidas en viales se incubaron 1 h a 37°C con VSV-³⁵S y se trataron con MA (50 µg/ml) 2 hs antes o durante la infección. Luego, las células se resuspendieron en NaOH-SDS cuantificándose la radioactividad total por vial (cpm totales ± SD) o se trataron con pK (cpm intern. ± SD) determinándose el porcentaje de radioactividad internalizada en relación a sus respectivos totales.

En la figura 21 se observan las cinéticas de internalización y de degradación de VSV (cpm solubles en el sobrenadante) en las células Vero y en las BHK-21. En los controles sin tratar de ambos tipos celulares se observa que, todo el virus capaz de internalizarse en estas condiciones lo hace a los cinco minutos de aumentar la temperatura a 37°C y después no aumenta significativamente con el tiempo. Además, si consideramos que luego de una hora de incubación a 0°C aproximadamente el 6% del virus colocado se adsorbe, es decir alrededor de 2000 cpm en este experimento, también se observa que la marca internalizada no llega al 10% del virus adsorbido como ya se ha reportado en la bibliografía (Matlin y col.). Esta cinética de internalización no presenta diferencias significativas en los cultivos pretratados con MA demostrando que dicha etapa no está bloqueada en las células Vero o BHK-21 refractarias a la infección viral. En cuanto a la cinética de degradación, en las células sin tratar se observa que a los 20 min en las BHK-21 y a los 40 min en las Vero, las cpm solubles en TCA comienzan

a aumentar en el sobrenadante. En cambio, en los cultivos de ambas células tratados con MA, no se observa la misma cinética ya que la marca soluble no aumenta como en los controles respectivos sino que permanece constante a lo largo del tiempo. Por lo tanto, estos resultados sugieren que algún paso posterior a la internalización, que se requiere no sólo para completar el ciclo de multiplicación sino también como parte del proceso de degradación que sufre la partícula viral que entra a la célula, está inhibido tanto en las células Vero como en las BHK-21 pretratadas con MA.

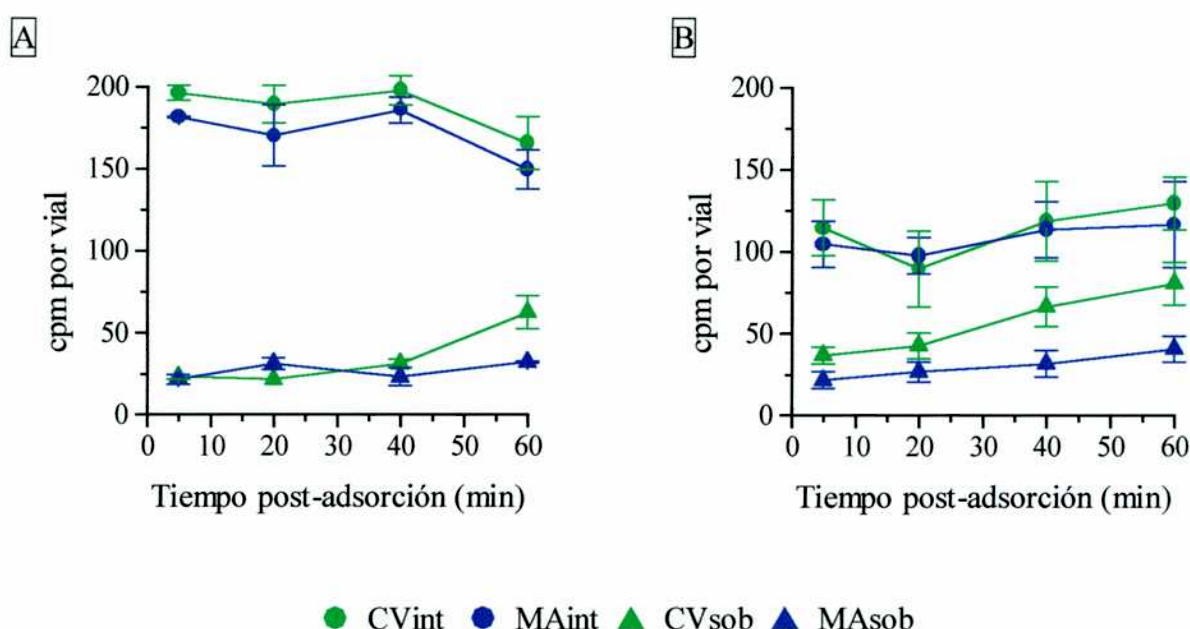


Figura 21. Acción de MA sobre las cinéticas de internalización y degradación de VSV. Células Vero (A) o BHK-21 (B) pretratadas 2 hs a 37°C con 50 µg/ml de MA se infectaron con VSV-³⁵S durante 1 h a 0°C. Luego, se descartó el inóculo y los cultivos se incubaron con medio de mantenimiento a 37°C. A distintos tiempos se cuantificó la radioactividad internalizada luego de remover el virus adsorbido con pK (int) y la radioactividad soluble liberada al sobrenadante luego de precipitar con TCA (sob). CV: control de virus. MA: tratadas.

Observaciones morfológicas.

Para obtener evidencias morfológicas que aporten datos a los resultados bioquímicos antes descritos, la entrada de VSV en células Vero refractarias a la infección viral también se examinó mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Células crecidas sobre cubreobjetos en una microplaca de 24 pocillos se pretrataron con MA durante 2 hs a 37°C y después se infectaron con VSV a una alta m.i., aproximadamente de 1000 UFP/cél. Luego de 1 h de adsorción a 0°C (T_0) se realizaron lavados para descartar el virus no adsorbido y, una serie de pocillos se incubó con un anticuerpo monoclonal (Mab) contra la proteína M de VSV (M_{VSV}) antes de fijar para revelar el antígeno de superficie en una IFI de membrana, mientras que otra serie de cultivos se incubaron durante 1 h más a 37°C (T_1). Al cabo de dicho tiempo, las células se incubaron con el Mab anti- M_{VSV} antes o después de fijar las células, para visualizar el antígeno de superficie o el total, respectivamente.

Los preparados correspondientes a T_0 de la IFI de membrana muestran un patrón de fluorescencia de puntos brillantes, que corresponden a los viriones unidos en la superficie celular, tanto para los cultivos tratados como para los controles (figura 22B y A, respectivamente). De igual modo a T_1 no se observan diferencias entre los cultivos pretratados o no con MA. En la IFI de membrana se observa como los viriones han desaparecido de la superficie celular mientras que en la IFI total se obtiene un patrón de puntos brillantes correspondientes a los viriones internalizados en las vesículas endocíticas (figura 22C, D, E y F). Por lo tanto, estos resultados cualitativos confirman que en las células Vero pretratadas con MA ni la adsorción ni la internalización de VSV están afectadas.

1.2.c. Efecto del pretratamiento con MA sobre la capacidad fusogénica de VSV.

Los resultados hasta aquí obtenidos señalan que, la etapa temprana del ciclo de VSV que podría estar afectada en las células pretratadas con MA, tiene lugar en los endosomas, punto en común del ciclo de multiplicación y de degradación del virus. Por esta razón, se decidió investigar si las células pretratadas con MA también son refractarias a la infección viral cuando la entrada del virus se produce por la vía endosoma independiente. Está descrito que VSV puede fusionar directamente a nivel de la membrana plasmática si previamente se adsorbe a 0°C y luego se incuba a 37°C durante unos minutos con un medio de pH inferior a 6 (Nagata y col.).

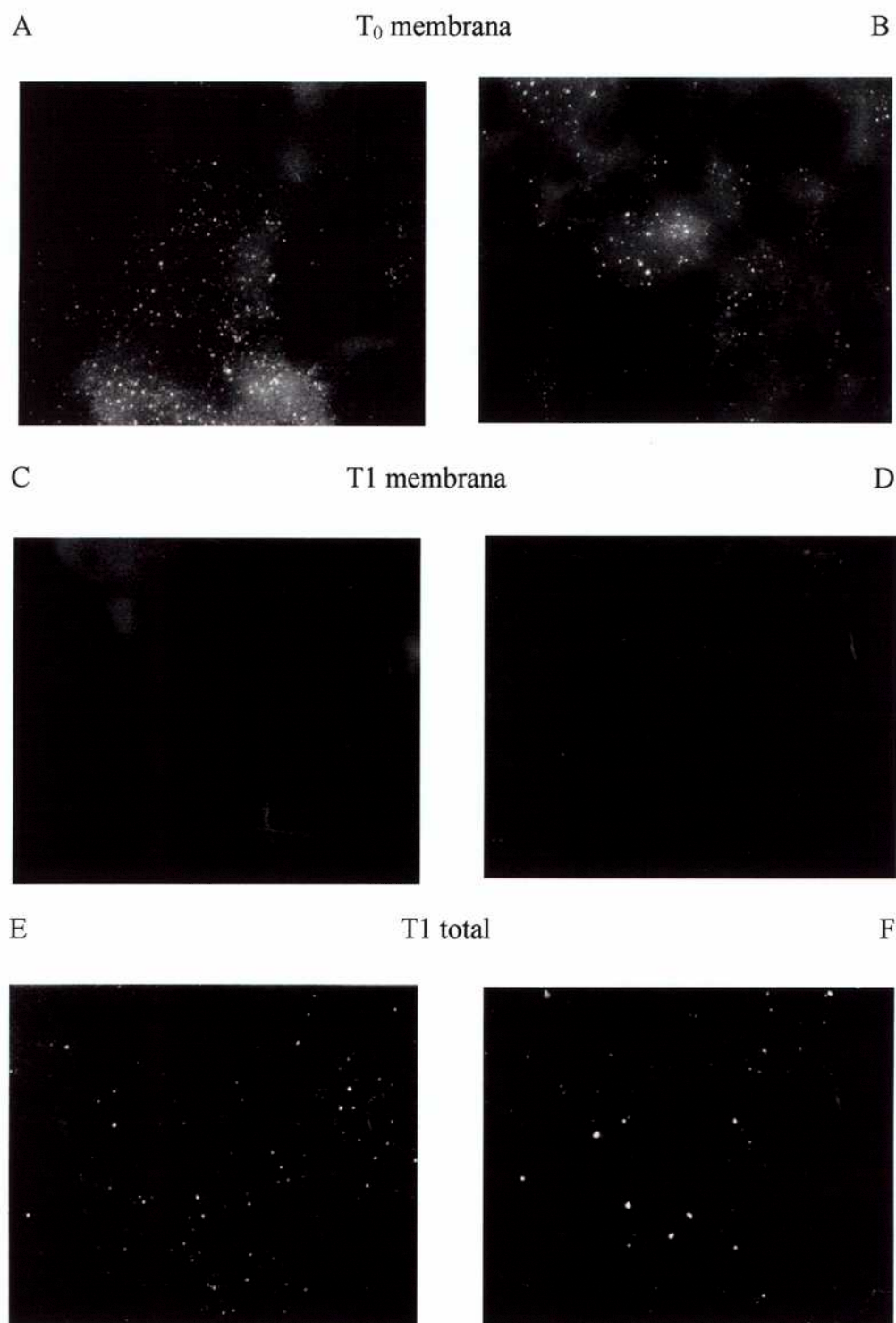


Figura 22. Aspectos morfológicos de la unión e internalización de VSV. Células Vero pretratadas 2 hs a 37°C con 50 µg/ml MA (B, D y F) se infectaron con VSV (m.i.= 1000) durante 1 h a 0°C. Después de la adsorción (T₀, A y B) se descartó el inóculo, se lavó con PBS y las células se incubaron durante 1 h a 37°C en medio de cultivo para permitir la internalización del virus adsorbido (T₁, C a F). A T₀ y T₁ el virus se visualizó mediante una IFI usando un anticuerpo monoclonal anti-M_{VSV} realizada para revelar antígeno de membrana y/o total según se indica. Aumento de las fotos 1000X.

De este modo, células Vero o BHK-21 pretratadas con MA 2 hs a 37°C se infectaron con VSV a una m.i.=1 durante 1 h a 0°C. Después de realizar los correspondientes lavados, se indujo la fusión del virus unido incubando las células durante 5 min con MEM pH 5 a 37°C. Luego se cambió el medio por MEM 1,5% pH 7,4 y a las 20 hs p.i. se cuantificó el rendimiento viral por el método de placas. La figura 23 muestra los resultados obtenidos en ambos cultivos celulares, tanto en Vero (A) como en BHK-21 (B) no hay diferencias significativas entre los controles de virus que fueron incubados a pH 5 o pH 7,4. En cuanto a los cultivos tratados con MA, aquellos en los que no se indujo la fusión, se observa una inhibición del orden de 3 o 4 log del título de virus respecto de los controles sin tratar, en BHK-21 y Vero respectivamente. Por el contrario, en los cultivos tratados que se incubaron a pH 5 la inhibición observada fue menor, de dos órdenes en BHK-21 y de un orden en Vero.

Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que la inhibición producida por el pretratamiento con MA puede ser parcialmente revertida si se induce la fusión de VSV a nivel de la membrana plasmática.

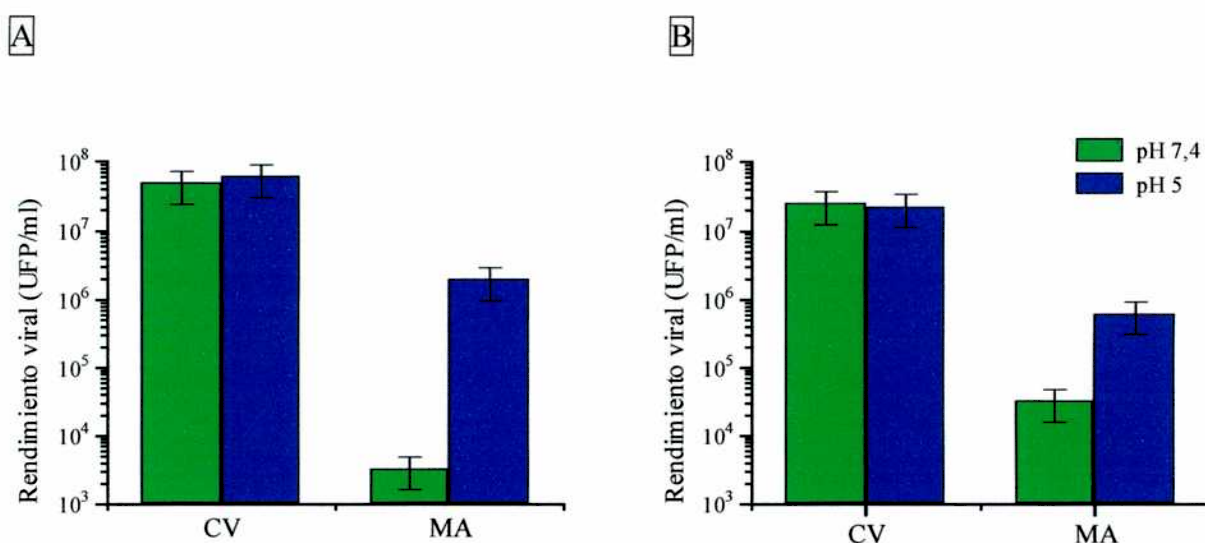


Figura 23. Acción de MA sobre la capacidad fusogénica de VSV. Células Vero (A) o BHK (B) se pretrataron con 50 µg/ml de MA durante 2 hs a 37°C. Las células se infectaron con VSV a una m.i.=10 durante 1 h a 0°C, después de la adsorción se descartó el inóculo y se lavó con PBS. Luego se realizó el tratamiento con MEM pH 5 o MEM pH 7,4 durante 5 min a 37°C y las células se incubaron hasta las 20 hs p.i. en MEM pH 7,4. Al cabo de dicho tiempo, se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó el rendimiento viral por el método de placas.

En paralelo, se realizó un experimento bajando el pH del medio después de las dos horas de incubación con MA y antes de infectar con el virus, en lugar de hacerlo después de la adsorción. En este caso, la inhibición producida por MA respecto de los controles de virus no se vió afectada por el pH ni en Vero ni en BHK-21 (figura 24).

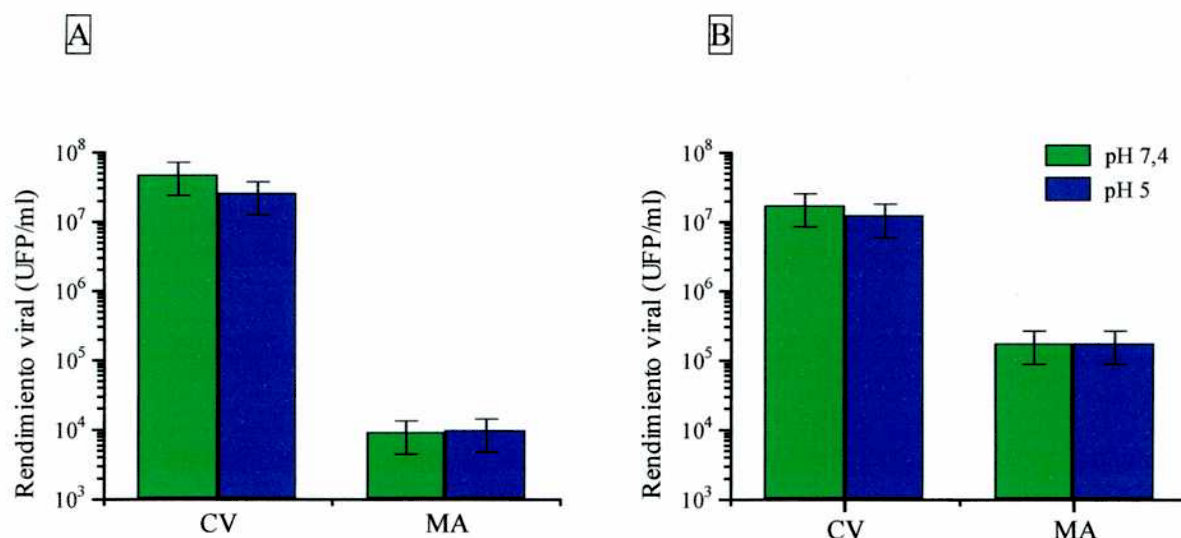
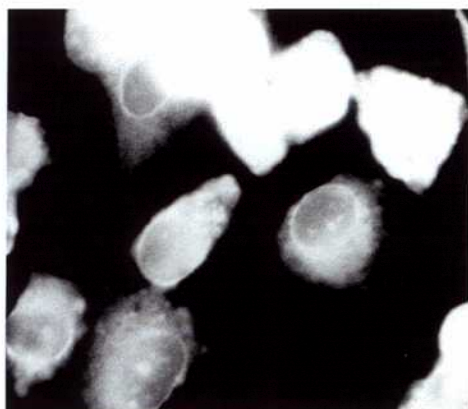


Figura 24. Acción de MA sobre la capacidad fusogénica de VSV. Células Vero (A) o BHK (B) se pretrataron con 50 μ g/ml de MA durante 2 hs a 37°C. Luego se descartó el sobrenadante, se lavó con PBS y se realizó el tratamiento con MEM pH 5 o MEM pH 7,4 durante 5 min a 37°C. Después de tres lavados con PBS, las células se infectaron con VSV a una m.i.=10 durante 1 h a 0°C. Al cabo de la adsorción los cultivos se incubaron en MEM pH 7,4 hasta las 20 hs p.i., momento en el que se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó el rendimiento viral por el método de placas.

Con lo cual, estos resultados confirman que en este experimento, el efecto del pH es inducir la fusión del virus a nivel de la membrana plasmática y no alterar, de algún otro modo, el estado antiviral desencadenado en las células por la acción de MA.

Por otra parte, experimentos morfológicos realizados mediante IFI también aportaron datos en favor de la hipótesis que al entrar por la vía endosoma independiente, el virus puede evitar la acción antiviral de MA. Monocapas de células Vero crecidas sobre cubreobjetos se pretrataron con MA y luego se infectaron con VSV (m.i.=1000) durante 1 h a 0°C. Después de lavar el virus no adsorbido, las células se incubaron con MEM pH 5 o pH 7,4 durante 5 min a 37°C y luego 2 hs más con MEM pH 7,4. Al cabo de dicho tiempo las células se fijaron y se llevó a cabo una IFI con un Mab anti-M_{VSV} para revelar el antígeno viral.

A



B



C



D

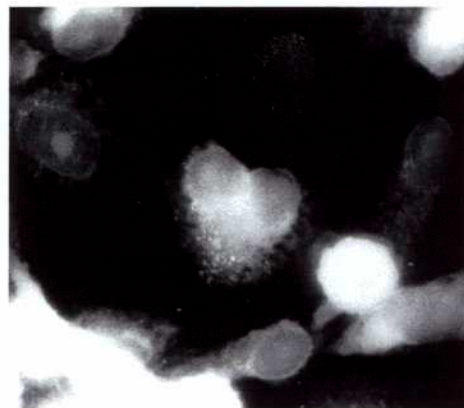


Figura 25. Aspectos morfológicos del efecto de MA sobre la capacidad fusogénica de VSV. Células Vero crecidas sobre cubreobjetos pretratadas (C y D) o no (A y B) con 50 $\mu\text{g/ml}$ de MA durante 2 hs a 37°C se infectaron con VSV a una m.i.=1000 durante 1 h a 0°C. Después de la adsorción se descartó el inóculo, se lavó con PBS y se agregó MEM pH 5 (B y D) o MEM pH 7,4 (A y C) durante 5 min a 37°C. A las 2 hs p.i. las células se fijaron y se realizó una IFI total con un Mab anti-M_{VSV}. Aumento de las fotos 1000X.

Tal como se observa en las fotos de la figura 25, en los cultivos sin tratar con MA a las dos horas p.i. ya hay síntesis de proteína M independientemente de si los mismos fueron incubados (B) o no (A) con MEM pH 5. Por el contrario en los cultivos pretratados con MA, sólo se observa síntesis de proteína viral en aquellos en los que se indujo la fusión de VSV con MEM pH 5 (D). En los cultivos tratados incubados a pH 7,4 se observa el patrón de puntos brillantes que corresponde al virus internalizado que permanece en las vesículas endocíticas (C).

Es decir que, al utilizar otro mecanismo de entrada, tal como se induce bajando el pH del medio extracelular, VSV puede infectar células Vero o BHK-21 pretratadas con MA sintetizando antígeno y dando una progenie viral infectiva.

1.2.d. Relación entre la basificación de los endosomas versus la inhibición en células pretratadas con MA.

Uno de los eventos que tiene lugar en los endosomas, es el desnudamiento, y como ya se mencionó en la introducción, este proceso requiere del pH ácido endosomal para que se dispare el cambio conformacional en la glicoproteína viral que media la fusión entre la membrana endosomal y la envoltura viral. Considerando que está descrito que una fracción menos purificada de MA, respecto de la utilizada en este trabajo, altera el pH de los endosomas (Wachsman y col. 1998), se decidió estudiar si hay una relación directa entre dicho efecto y la inhibición de la multiplicación viral observada en las células Vero tratadas con la preparación de MA utilizada en este trabajo.

Monocapas de células tratadas con MA durante 2 hs se infectaron con VSV a distintos tiempos post-tratamiento (p.t.) realizándose en paralelo un ensayo con naranja de acridina para evaluar el pH de los endosomas al momento de la infección.

Los resultados obtenidos con el ensayo de reducción en el número de placas muestran que, en las células tratadas con MA, el porcentaje de inhibición es mayor al 90% aún en aquellos cultivos que fueron infectados después de 10 hs de finalizado el tratamiento con el antiviral, mientras que a las 24 hs p.t. ya no se observa el efecto inhibitorio (figura 26). Por lo tanto, el estado refractario a la infección viral, tal como se había descrito para los extractos crudos, se mantiene más de 10 hs p.t., encontrándose una reversión total a las 24 hs p.t..

Asimismo, con el ensayo con naranja de acridina se observa como, en las células tratadas durante 2 hs con MA, hay un aumento en el pH endosomal evidenciado por la ausencia del granulado fluorescente de color naranja que se observa en los controles sin tratar (figura 27B y A respectivamente). Dicho efecto persiste en igual forma hasta las 4 hs p.t. (figura 27C y D) mientras que a las 8 y 10 hs p.t. se comienza a observar la aparición de puntos fluorescentes naranjas pero no con la misma intensidad que en el control de células (figura 27E y F), en cambio, a las 24 hs p.t. se observa que el pH de los endosomas ya está prácticamente restablecido (figura 27G).

Por lo tanto, la correlación entre ambos experimentos sugiere que el efecto inhibitorio del pretratamiento sobre la multiplicación de VSV es una consecuencia directa de la alteración del pH endosomal causada por MA.

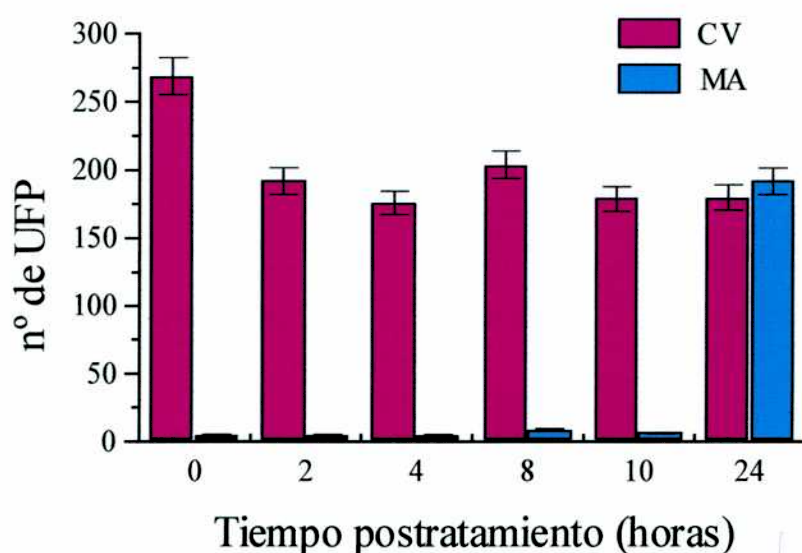


Figura 26. Duración del estado antiviral inducido por MA. Monocapas de células Vero pretratadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de MA durante 2 hs a 37°C se infectaron a distintos tiempos postratamiento con 100 UFP de VSV. Luego de la hora de adsorción se descartó el inóculo y las células se cubrieron con la mezcla semisólida. A las 48 hs p.t. se revelaron y se cuantificaron las UFP.

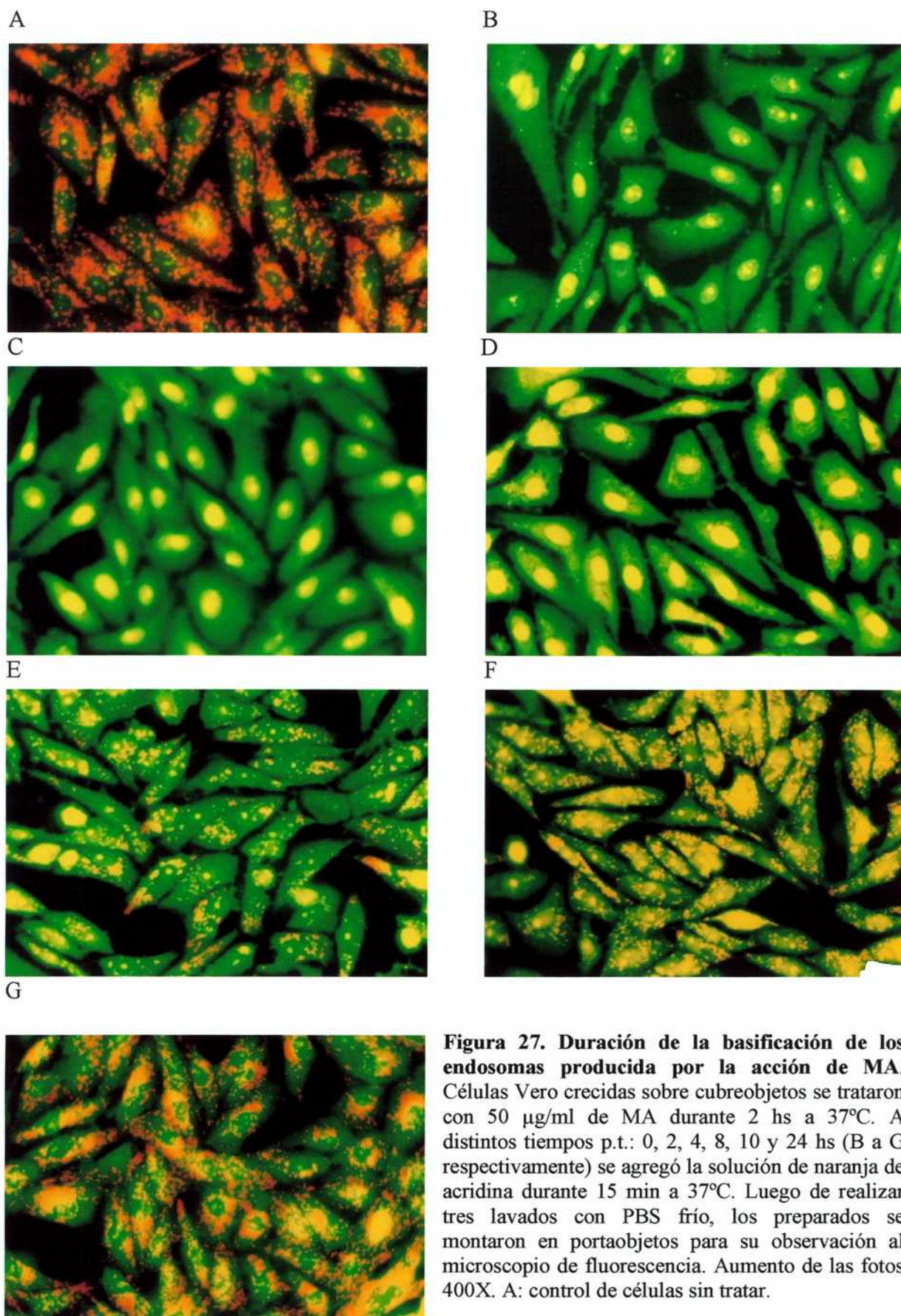


Figura 27. Duración de la basificación de los endosomas producida por la acción de MA. Células Vero crecidas sobre cubreobjetos se trataron con 50 µg/ml de MA durante 2 hs a 37°C. A distintos tiempos p.t.: 0, 2, 4, 8, 10 y 24 hs (B a G respectivamente) se agregó la solución de naranja de acridina durante 15 min a 37°C. Luego de realizar tres lavados con PBS frío, los preparados se montaron en portaobjetos para su observación al microscopio de fluorescencia. Aumento de las fotos 400X. A: control de células sin tratar.

Conclusiones parciales.

Los resultados obtenidos permiten concluir que en las células refractarias a la infección viral la etapa afectada del ciclo de multiplicación de VSV es un evento temprano que ocurre luego de la internalización del virus. Las evidencias presentadas señalan al desnudamiento como el blanco probable y esto ocurriría como una consecuencia directa de la alteración que MA produce sobre el pH de los endosomas.

SEGUNDA PARTE

2. POSTRATAMIENTO.

El trabajo realizado que se describe en esta segunda parte tuvo por objetivo evaluar la acción de MA como antiviral, agregándola a los cultivos celulares luego de la infección (es decir por post-tratamiento). Como modelo de estudio también se usó el virus VSV y una vez establecida la CE_{50} se procedió a determinar qué etapa de la multiplicación del virus estaba afectada por el tratamiento con MA.

2.1. Curva dosis-respuesta obtenida con el postratamiento con MA.

La acción antiviral se cuantificó por medio del ensayo de reducción de placas en células Vero infectadas con VSV durante 1 h a 37°C. Luego de descartar el inóculo, los cultivos se incubaron a 37°C con distintas concentraciones de MA hasta la aparición de placas visibles. Aproximadamente a las 48 hs p.i. se contó el número de UFP en todos los cultivos, expresándose los resultados obtenidos como porcentaje de inhibición respecto del control de virus sin tratar. La figura 28 muestra que MA agregada luego de la adsorción también es capaz de inhibir la multiplicación de VSV en forma dosis dependiente. Además, si se compara con los resultados de la figura 1 se observa que el pretratamiento resulta más efectivo que el postratamiento, siendo la CE_{50} del postratamiento 2,5 $\mu\text{g/ml}$, valor tres veces mayor.

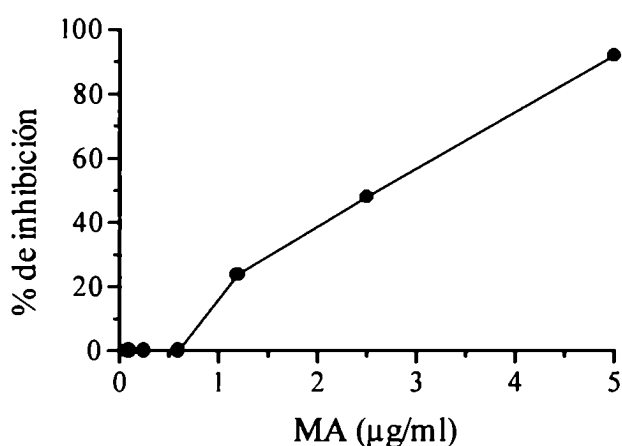


Figura 28. Acción de MA sobre la multiplicación de VSV. Células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades se infectaron con aproximadamente 100 UFP de VSV y luego de la adsorción se trataron con distintas concentraciones de MA. A las 48 hs post-infección (p.i.) se observó la aparición de placas bajo metilcelulosa y se calculó el % de inhibición respecto al control de virus sin tratar.

2.2. Efecto del tiempo de agregado de MA.

Considerando que en las células refractarias a la infección viral la etapa bloqueada del ciclo de multiplicación de VSV es un evento temprano, y que el ciclo de VSV se completa aproximadamente en seis horas, se decidió evaluar el efecto del agregado de MA o bien durante todo el tiempo luego de la adsorción, o tan sólo durante las últimas tres horas del ciclo de multiplicación, cuando las etapas tempranas ya tuvieron lugar. La infección se sincronizó realizando la adsorción a 0°C durante 1 hora y luego de descartar el inóculo se aumentó la temperatura a 37°C. MA se agregó en el medio de cultivo de 0 a 6 o de 3-6 hs post-adsorción. En ambos casos, a las 6 hs se cosechó el sobrenadante y se cuantificó el rendimiento viral por el método de placas. Los resultados obtenidos se graficaron en la figura 29 donde se puede ver que los tratamientos realizados con MA redujeron significativamente la producción de virus infeccioso respecto del control de virus, aún cuando MA se agregó después de tres horas de iniciada la infección. Por lo tanto, estos datos sugieren que cuando MA se agrega luego de la adsorción la etapa afectada no es temprana sino que se trataría de un evento tardío.

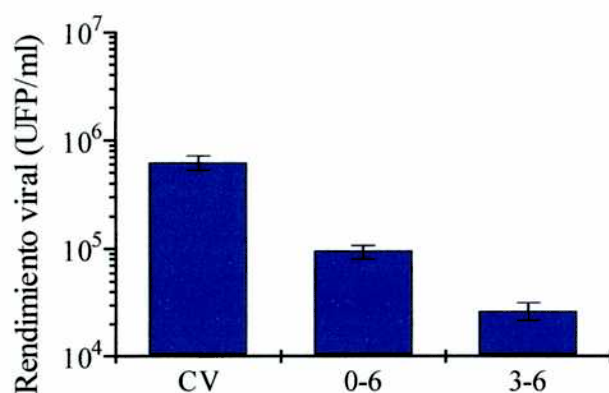


Figura 29. Efecto del agregado de MA a distintos tiempos. Células Vero se infectaron con VSV (m.i.=1) durante 1 h a 0°C. Luego se descartó el inóculo y las células se trataron con 50 µg/ml de MA de 0-6 o de 3-6 hs post-adsorción. A las 6 hs se cosechó el virus extracelular y se cuantificó por el método de placas.

2.3. Determinación de la etapa del ciclo de multiplicación de VSV afectada por el postratamiento con MA.

Al igual que en las células refractarias a la infección viral, se decidió estudiar el efecto del postratamiento con MA sobre distintas etapas del ciclo de multiplicación de VSV para establecer el blanco de acción del antiviral.

2.3.a. Efecto sobre la síntesis de proteínas virales.

Se comenzó investigando la expresión de proteínas virales en células Vero y BHK-21 infectadas con VSV (m.i.=1) que se trataron con distintas concentraciones de MA luego de la adsorción del virus. A las 5 hs p.i. las células se incubaron con ^{35}S -metionina durante 2 hs y las proteínas marcadas se analizaron en un SDS-PAGE.

Los perfiles proteicos de los controles de virus sin tratar son similares a los obtenidos en la figura 18 tanto para Vero (figura 30A) como para BHK-21 (figura 30B), aparecen cuatro bandas muy intensas correspondientes a las proteínas de VSV y en este caso, no es tan evidente la inhibición que el virus provoca sobre la síntesis de las proteínas celulares. En las calles que corresponden a los cultivos infectados y tratados con MA se observa, si bien con menor intensidad, el mismo patrón de proteínas virales que en los controles de virus. Aún con una concentración de MA aproximadamente diez veces mayor que la CE_{50} , el postratamiento no mostró un efecto evidente sobre la síntesis de proteínas de VSV, ni en Vero ni en BHK-21.

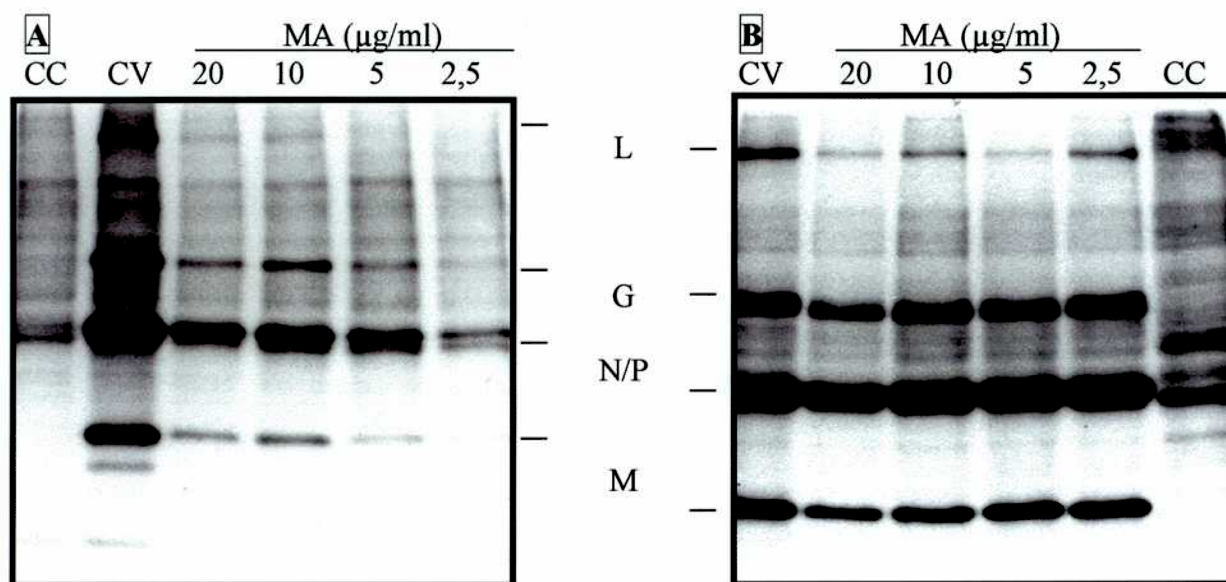


Figura 30. Acción del postratamiento con MA sobre la síntesis de proteínas virales. Células Vero (A) o BHK-21 (B) se infectaron con VSV (m.i.= 1) y luego se trataron con distintas concentraciones de MA. La marcación con metionina- ^{35}S se realizó entre las 5 y 7 hs p.i. Luego, las células se resuspendieron en buffer muestra y las proteínas virales se analizaron mediante SDS-PAGE y posterior autorradiografía. CV, control de virus sin tratar. CC, control de células sin infectar ni tratar. L, G, N/P y M corresponden a las cinco proteínas de VSV.

Por lo tanto, al igual que en la figura 29, los resultados obtenidos sugieren que el efecto inhibitorio del postratamiento se debe a la acción de MA sobre una etapa tardía del ciclo de multiplicación de VSV, posterior a la síntesis de proteínas virales.

2.3.b. Efecto sobre la fosforilación de las proteínas de VSV.

Como se mencionó en la introducción, una de las dos fosfoproteínas de VSV es la proteína P, fosforilada en pasos sucesivos por la caseína quinasa II y una actividad quinasa asociada a la proteína L. Si bien aún no se ha podido establecer con certeza el mecanismo de regulación, está aceptado que la fosforilación de P juega un rol esencial en la transcripción y replicación de VSV. Tanto la inhibición de la fosforilación como la hiperfosforilación de P afectan la síntesis de ARN viral (Chang y col.). Por lo tanto, considerando el rol de dicha modificación post-traducciona en eventos tardíos se decidió investigar el efecto de MA sobre la fosforilación in-vitro e in-vivo de las proteínas de VSV.

- Ensayos de fosforilación in-vitro.

Las reacciones in-vitro se realizaron utilizando virus VSV purificado, tal como se describe en materiales y métodos, como sustrato y extractos celulares como fuente de enzimas.

En un primer ensayo se puso a punto la reacción incubando viriones purificados con el ATP- ^{32}P en ausencia de extractos celulares, para determinar el patrón de fosforilación producido por las proteínas quinasas asociadas al virión. La reacción se detuvo con buffer muestra y las proteínas marcadas se analizaron en un SDS-PAGE. En la figura 31 se presentan el gel teñido con coomasie y la autorradiografía correspondiente con las bandas de las proteínas virales fosforiladas. En el gel (31A) se puede observar el grado de purificación de la preparación de virus utilizada y verificar que se usaron cantidades similares en todas las reacciones. En la autorradiografía (31B) se observa que, P y M fueron las que más incorporaron ^{32}P mientras que L y G (que in-vivo no se fosforilan) lo hicieron en menor grado (calle1), tal como se describe en la bibliografía (Clinton y col.). Por otro lado, se realizó un control agregando durante la reacción heparina, un inhibidor de la caseína quinasa II y en la calle 2 se observa como la presencia de heparina inhibió la fosforilación de todas las proteínas menos la de M. Una vez puesto a punto el sistema y corroborado que era susceptible de ser

inhibido, se realizó un segundo ensayo agregando durante la reacción MA. En la figura 31C se observa la autorradiografía obtenida donde las calles 1, 2 y 3 corresponden al virus solo, al virus más heparina o más MA, respectivamente. La diferencia en el número de bandas observadas con respecto a la figura 31B se debe al menor tiempo de exposición de la autorradiografía. En este experimento se puede ver nuevamente cómo la heparina afectó la fosforilación de P sin modificar la de M, mientras que el agregado de MA no produjo cambios en ninguna de las proteínas marcadas. Estos resultados indicarían que MA no tiene una acción directa sobre las actividades quinasas asociadas al virión, que están participando en la fosforilación de las proteínas virales en estas condiciones de ensayo.

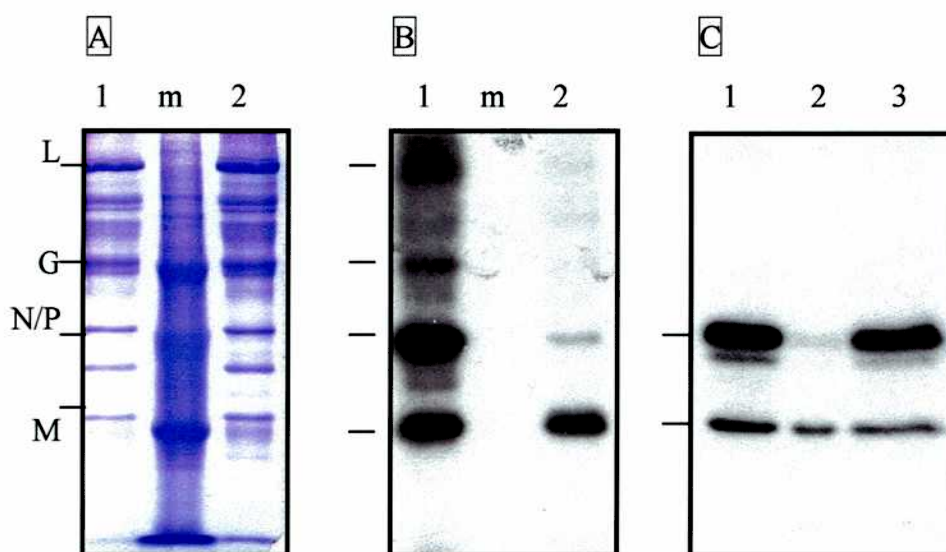


Figura 31. Efecto de MA sobre la fosforilación in-vitro de VSV. El ensayo se llevó a cabo incubando 10 μg de VSV purificado con 10 μCi de $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$ en un volumen de 15 μl de buffer de reacción, durante 1 h a 37°C (calle 1 en A, B y C). La reacción se frenó con 15 μl de buffer muestra y los 30 μl se sembraron en un gel 10% con SDS que luego se expuso a una película radiográfica. En las calles 2 (A, B y C) y 3 (C) se agregó durante la reacción 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina o 20 $\mu\text{g/ml}$ de MA, respectivamente. A, gel teñido con coomasie blue y B, autorradiografía del mismo experimento. C, autorradiografía de otro ensayo. m, marcadores de peso molecular. L, G, N/P y M proteínas de VSV.

Finalmente, para completar el análisis de la fosforilación in-vitro se agregó a la reacción extracto de células tratadas o no con MA, como fuente de enzimas. Los extractos que se usaron en estos ensayos provenían de células Vero o BHK-21 tratadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de MA durante 1 h a 37°C o a 4°C, la autorradiografía obtenida se observa en la figura 32. Las calles

1 y 5 corresponden al patrón de fosforilación obtenido con VSV en presencia de extractos de células Vero o BHK-21 no tratadas con MA, respectivamente. Al agregar la fuente de enzimas celulares se observa que la incorporación de ^{32}P se produce principalmente en una sola banda, a diferencia de lo observado en la figura 31B, correspondiente a la proteína P. Cuando se agregaron extractos de células Vero o BHK-21 tratadas con MA a 37°C (calles 2 y 6, respectivamente) o a 4°C (calles 3 y 7, respectivamente), el patrón de fosforilación obtenido no varió significativamente respecto de los controles antes descriptos. En cambio, la presencia de heparina durante la incubación con los extractos controles, sí inhibió la incorporación de ^{32}P a la proteína P (calles 4 y 8). Los resultados obtenidos sugieren que MA no afecta ninguna de las actividades enzimáticas celulares que, en estas condiciones, participan en la fosforilación de la proteína P.

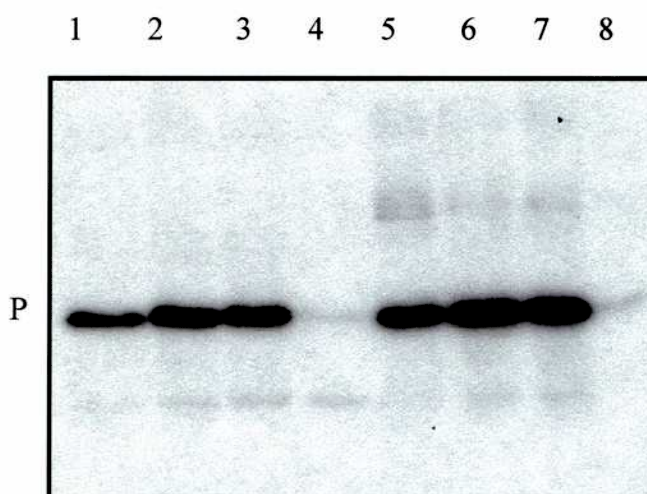


Figura 32. Efecto de extractos celulares tratados con MA sobre la fosforilación in-vitro de VSV. Los ensayos se realizaron incubando 10 μg del virus purificado más 10 μCi de $\text{ATP}\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ en presencia de 2 μg de extractos de células Vero (1 a 4) o BHK-21 (5 a 8) tratados con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MA a 37°C (2 y 6) o a 4°C (3 y 7). Los extractos sin tratar corresponden a las calles 1 y 5. En las calles 4 y 8 se agregó además durante la reacción 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de heparina. Las reacciones se frenaron con buffer muestra, las proteínas fosforiladas se separaron en un SDS-PAGE 10% y se visualizaron mediante una autorradiografía.

- Ensayos de fosforilación in-vivo.

A pesar de los resultados obtenidos in-vitro, se decidió realizar un ensayo de marcación in-vivo con ^{32}P , que reproduce mejor las condiciones del ensayo antiviral utilizado de rutina. Monocapas de células BHK-21 infectadas con VSV a una m.i.=1 se trataron con

distintas concentraciones de MA luego de la adsorción viral. A las 4 hs p.i. se agregó el ^{32}P -ortofosfato disódico durante dos horas, luego las proteínas fosforiladas marcadas se separaron en un SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. La autorradiografía obtenida al exponer dicha membrana (figura 33A) muestra que, respecto del control de células, en el control de virus aparece una banda de alrededor de 45 KDa de PM que correspondería a la proteína P. En el caso de las células infectadas y tratadas con MA se observa la misma banda independientemente de la concentración de MA utilizada. Al realizar un inmunoblotting sobre la misma membrana con un anticuerpo anti-P se confirmó que la banda observada con ^{32}P en las células infectadas tratadas o no con MA corresponde a dicha proteína (figura 33B).

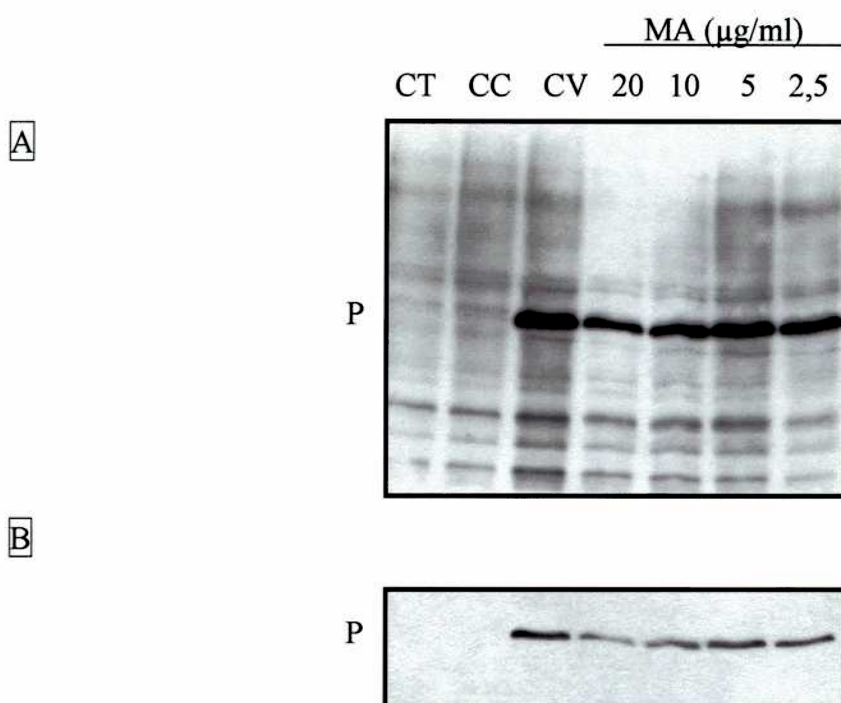


Figura 33. Efecto de MA sobre la fosforilación in-vivo de VSV. Células BHK-21 se infectaron con VSV (m.i.=1) y luego de la adsorción se trataron con distintas concentraciones de MA. A las 4 hs p.i. se agregó 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de $^{32}\text{PO}_4\text{HNa}_2$ durante 2 hs a 37°C. Al cabo de dicho tiempo las células se resuspendieron en buffer muestra y se sembraron en un gel 10 % con SDS. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y las fosforiladas se visualizaron mediante una autorradiografía (A). Luego, la membrana se incubó con un Mab anti-P para revelar la posición de dicha proteína mediante un inmunoblotting (B).

Por lo tanto, los resultados obtenidos con los experimentos realizados in-vitro e in-vivo demuestran que el postratamiento con MA no está afectando la multiplicación de VSV como consecuencia de inhibir la fosforilación de las proteínas virales.

2.3.c. Distribución intracelular de las proteínas M y G en células tratadas con MA.

Las proteínas de VSV no se sintetizan todas en el mismo sitio ni tienen el mismo procesamiento post-traducciona. La proteína M se traduce en los ribosomas libres que se encuentran en el citoplasma mientras que la glicoproteína G se sintetiza en los ribosomas que se encuentran unidos al retículo endoplásmico rugoso (RER), donde co-traduccionalmente se inserta en la membrana y se glicosila. Finalmente, luego de ser modificada en el aparato de Golgi por el agregado de moléculas de ácidos grasos y diferentes hidratos de carbono, se transporta a la membrana plasmática de las células infectadas, tal como se describió en la introducción. Tanto las modificaciones post-traduccionales de G como la correcta localización de las distintas proteínas de VSV se requieren para que los eventos tardíos, como son el ensamblaje y la brotación de la partícula viral, tengan lugar adecuadamente.

Los resultados obtenidos con el postratamiento indican que en presencia de MA hay síntesis de las cinco proteínas de VSV (figura 30A y B), pero considerando lo expuesto en el párrafo anterior se decidió estudiar si la distribución intracelular de las proteínas M y G estaba afectada o no por la acción de MA. Monocapas de células Vero infectadas con VSV (m.i.=1) se trataron con 50 µg/ml de MA durante 6 hs. Al cabo de dicho tiempo las células se fijaron con metanol y las proteínas se visualizaron mediante una IFI realizada con anticuerpos anti-G_{VSV} y anti-M_{VSV}. Las fotos de la figura 34 muestran que en los controles de virus la fluorescencia correspondiente a la proteína G se distribuye como un puntillado homogéneo en el citoplasma celular; en cambio, en las células tratadas con MA además del puntillado se observan inclusiones citoplasmáticas perinucleares de fluorescencia muy intensa. En cuanto al número de células antígeno-positivas no hubo diferencias significativas entre los cultivos tratados o no con MA (datos no mostrados).

Respecto de la distribución de la proteína M, en los controles de células infectados sin tratar también se observa en el citoplasma un puntillado fluorescente aunque no tan uniforme como se ve para la proteína G; dicho patrón se repite en las células tratadas con MA.

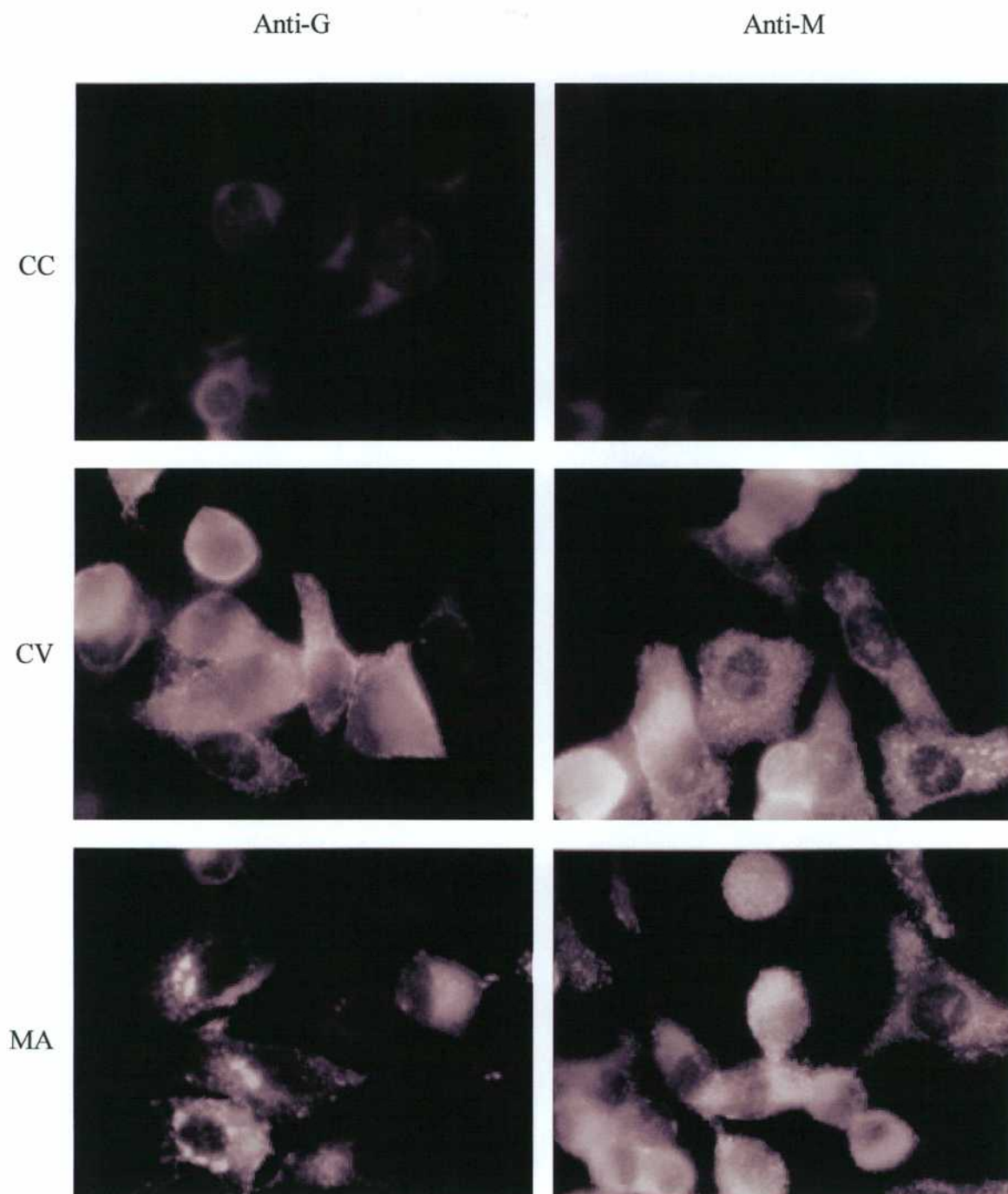


Figura 34. Efecto de MA sobre la distribución intracelular de las proteínas M y G. Células Vero infectadas con VSV (m.i.=1) se trataron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de MA. A las 6 hs p.i. las células se fijaron con metanol y luego se incubaron con anticuerpos anti-M o anti-G para revelarlas mediante IFI las proteínas de VSV. CC, control de células. CV, control de virus. MA, células infectadas tratadas con MA.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que el postratamiento con MA afecta particularmente la distribución intracelular de la proteína G de VSV sin alterar la correspondiente a la proteína M.

2.3.d. Transporte a la membrana de la proteína G en células tratadas con MA.

Considerando los resultados observados en la figura 30 se planteó como hipótesis que en presencia de MA la proteína G no se transporta a la membrana citoplasmática. Entonces, células Vero infectadas con VSV (m.i.=1) se trataron con MA durante 6 hs y se incubaron con un anticuerpo anti-G_{VSV} antes de fijar los preparados para revelar mediante una IFI el antígeno de membrana. Las fotos que se presentan en la figura 35 muestran que, mientras en los controles de virus hay focos de células fluorescentes con un marcado efecto citopático (B), en los cultivos tratados con MA sólo se observan células fluorescentes aisladas (C).

Asimismo, el recuento de células mostró que en los cultivos sin tratar y en los tratados, el porcentaje de células antígeno-positivas respecto del total fue de un 29,7 % y de un 9,7 %, respectivamente, confirmando que el transporte de la proteína G a la membrana citoplasmática está inhibido en las células tratadas con MA.

2.3.e. Co-localización intracelular de la proteína G en las células tratadas con MA.

En las células animales, el aparato de Golgi constituye el lugar donde se sintetizan los glicolípidos, la porción oligosacáridica de las glicoproteínas y los proteoglicanos (Mellman y Simons). A medida que la proteína G atraviesa los distintos compartimientos del aparato de Golgi se completa el procesamiento de las cadenas de oligosacáridos incorporadas en el RER y la proteína madura sale del trans-Golgi en vesículas que por último se fusionan con la membrana plasmática. Dado que, en presencia de MA la proteína G no llega a su destino final, se decidió investigar si las inclusiones citoplasmáticas observadas en la figura 34 co-localizan con dicha organela intracelular. Células Vero infectadas con VSV (m.i.=1) se trataron con 50 µg/ml de MA durante 6 hs, luego las células se fijaron con metanol y se realizó una doble marcación utilizando anticuerpos anti-G revelados con un conjugado marcado con fluoresceína y la lectina WGA conjugada a rodamina para visualizar la localización de G y del aparato de Golgi, respectivamente.

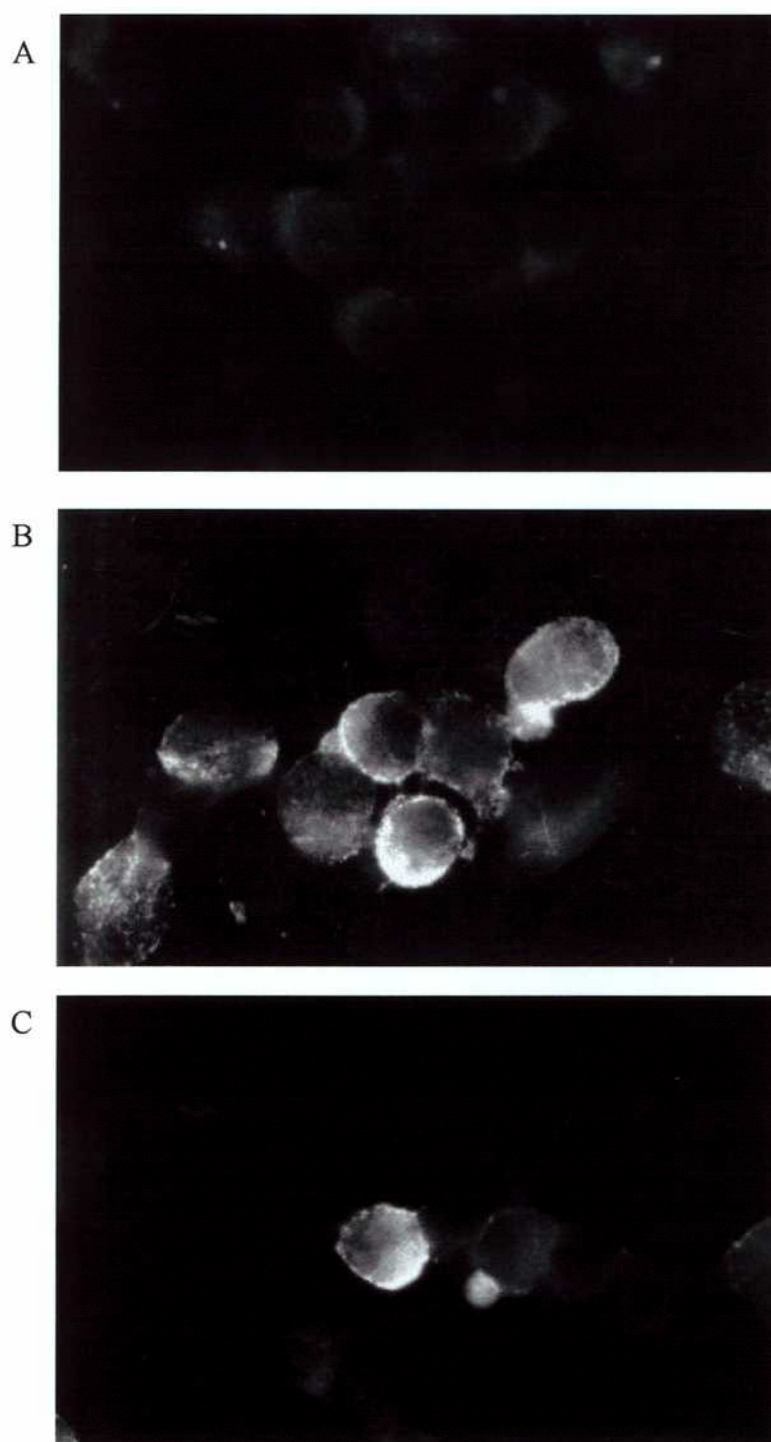


Figura 35. Efecto de MA sobre el transporte a membrana de la proteína G. Células Vero infectadas con VSV (m.i.=1) se trataron con 50 µg/ml de MA. A las 6 hs p.i. las células se incubaron con un anticuerpo anti-G antes de fijar las células para revelar mediante una IFI el antígeno de membrana. A, control de células sin infectar. B, control de virus. C, células infectadas y tratadas con MA.

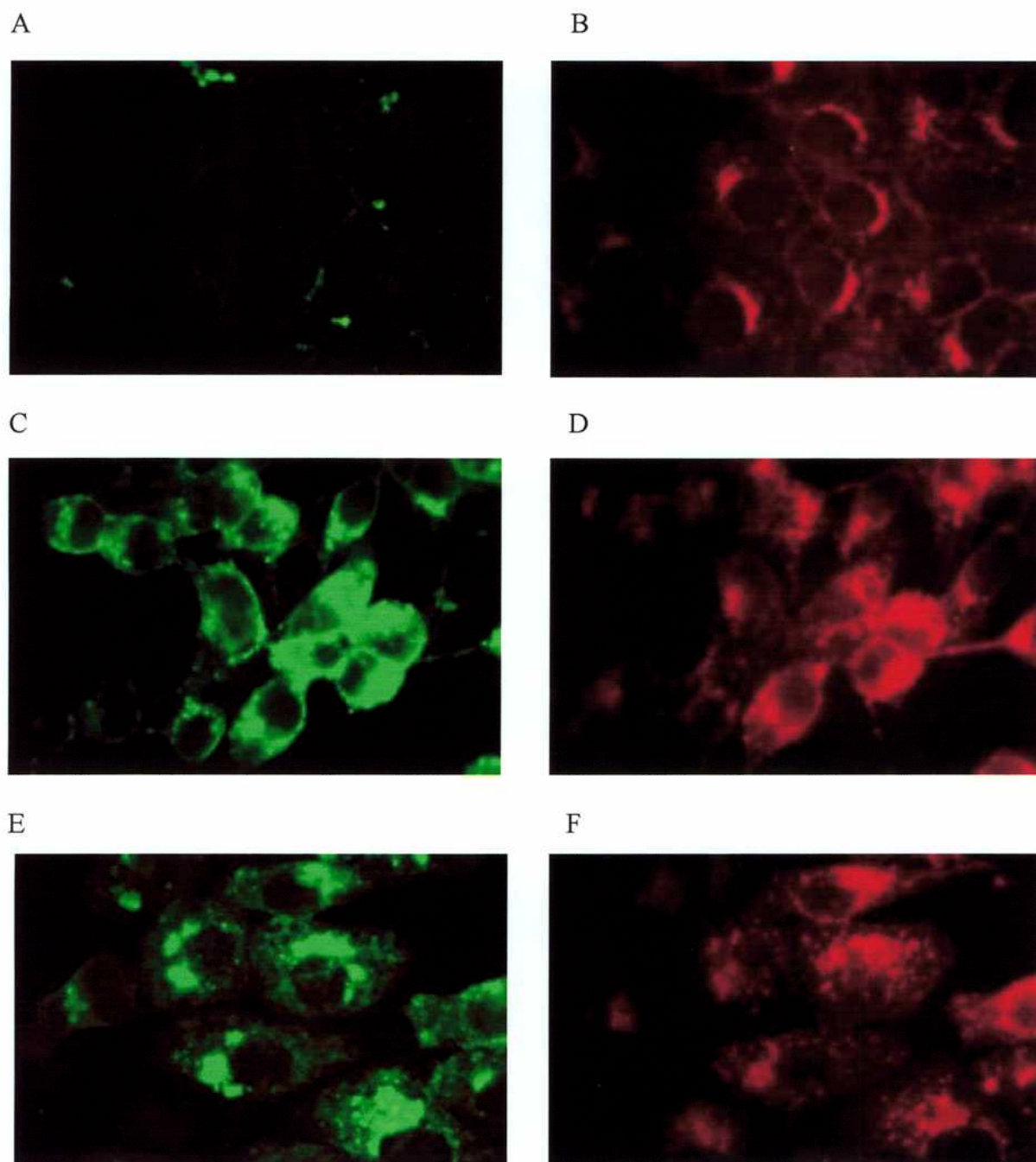


Figura 36. Co-localización intracelular de la proteína G en células tratadas con MA. Células Vero infectadas con VSV se trataron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de MA. A las 6 hs p.i. las células se fijaron con metanol y se realizó una doble marcación incubando los preparados primero, con un anticuerpo anti-G y luego con un conjugado marcado con fluoresceína para revelar el antígeno viral, y con la lectina WGA conjugada a rodamina para evidenciar el aparato de Golgi. A y B, control de células. C y D, control de virus. E y F, células tratadas con MA.

La figura 36 muestra las fotos obtenidas al observar el mismo campo con los filtros correspondientes a cada fluorocromo, en el caso de las células sin infectar ni tratar se observa, como era de esperar, que no hay fluorescencia verde (A) y que la fluorescencia roja aparece principalmente en forma de casquete perinuclear evidenciando la posición del aparato de Golgi (B). En el caso de las células infectadas, además del efecto citopático (ACP), se observa una fluorescencia verde muy intensa en forma de pequeños gránulos cercana al núcleo y una fluorescencia más difusa distribuida en el resto de la célula (C). En cuanto a la WGA-rodamina presenta un patrón de marcación semejante a la fluorescencia verde, particularmente en la zona perinuclear (D).

Por el contrario, las células infectadas y tratadas con MA muestran un grado de ACP mucho menor y un patrón de fluorescencia marcadamente diferente al observado en las células infectadas. Al igual que en la figura 34 la proteína G se detecta principalmente en una región polarizada perinuclear formando grumos de gran tamaño con fluorescencia muy intensa (E). El mismo campo, observado con el filtro para rodamina, muestra un patrón de fluorescencia granular que se distribuye con mayor intensidad, en las zonas perinucleares donde también se detecta la fluorescencia verde y en forma más difusa en el resto del citoplasma (F).

En principio, estos resultados sugieren que en las células tratadas con MA la proteína G de VSV se acumula en una región del citoplasma que podría ser el aparato de Golgi o una estructura muy relacionada al mismo.

Conclusiones parciales.

Los resultados obtenidos en esta segunda parte permiten concluir que cuando MA se agrega luego de la infección viral, la etapa afectada es un paso tardío del ciclo de multiplicación de VSV, relacionado con el procesamiento post-traducciona l de la glicoproteína viral.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permiten explicar cómo el principio antiviral presente en las hojas de *M.azedarach* L (meliacina) puede desencadenar en las células un estado refractario a la infección viral. La interacción de meliacina y la célula huésped resulta en un cambio del pH interno de los endosomas impidiendo que los virus que entran a la célula por el camino endocítico puedan liberar su nucleocápside al citoplasma.

En apoyo de esta hipótesis están los resultados obtenidos con células Vero y BHK-21 pretratadas con meliacina e infectadas con VSV. La ausencia de síntesis de proteínas virales en las células pretratadas (figura 18), indicó que MA estaba afectando un paso temprano del ciclo de multiplicación distinto de la adsorción o internalización viral (figuras 20 y 21).

El desnudamiento es uno de los pasos más difíciles de estudiar en un ciclo de multiplicación por la rapidez con que ocurre y la dificultad de separarlo temporalmente de la internalización (Damonte 1996). Si bien no se realizó un experimento dirigido a medir el desnudamiento en forma directa, el abordaje utilizado en este trabajo lo señala como el paso afectado por meliacina.

La inhibición parcial de la internalización de VSV a 37°C en las células Vero (cuadro 5) por sí misma no alcanza para explicar la ausencia total de síntesis de proteínas virales pero sería una consecuencia del bloqueo del desnudamiento que estaría impidiendo el reciclaje de los receptores virales a la superficie celular. Algo similar ocurre cuando células BHK-21 son infectadas con el virus Semliki forest en presencia de bafilomicina A1 que también inhibe el desnudamiento viral (Schelegel y col.1982a). Posiblemente esto ocurre en forma particular en las células Vero y no en BHK-21 tratadas con MA porque está descripto que, en las primeras, los sitios de unión de VSV a la superficie celular son saturables, mientras que en las otras células no (Pérez y Carrasco). Por otro lado, la reversión parcial observada cuando se induce la entrada de VSV por la membrana plasmática, también permite arribar a la misma conclusión, ya que cuando el virus prescinde del paso afectado, desnudándose a través de otro mecanismo independiente de la vía endocítica, logra evitar la restricción impuesta en las células tratadas sin que otro paso se vea afectado. El efecto no es total porque en esas condiciones tan sólo una proporción de los viriones utiliza la fusión directa, por ejemplo, en el caso de células Vero y a un pH de 5,7 el 10% del virus entra por este mecanismo (Puri y col.). Finalmente, una evidencia más directa es la observación morfológica realizada en la figura 25 donde al no inducir la entrada por la membrana plasmática se ve que la proteína M se

distribuye con un patrón de puntos fluorescentes en las células tratadas, mientras que en los controles de virus y en las tratadas con MA pero incubadas con MEM pH 5, la fluorescencia es más intensa y se distribuye homogéneamente en el citoplasma. Esto se debe justamente a que las partículas virales permanecen en los endosomas sin poder desnudarse aún dos horas después de haber sido internalizadas, porque de lo contrario, la proteína M tendría que estar uniformemente distribuida en el citoplasma. A estas evidencias debemos agregar que hay una correlación entre el tiempo que dura el estado antiviral y el tiempo en que los endosomas permanecen basificados (figura 26 y 27).

Respecto de cómo se establece el estado antiviral, las hipótesis que se plantearon fueron, que MA podía interactuar con un receptor celular activando un camino de transducción de señales que desencadenara un mecanismo antiviral propio de la célula, como en el caso del IFN- α (Goodbourn y col.), o que podía interactuar directamente con proteínas celulares como lo hace la ciclosporina con la ciclofilina (Galat y Metcalve).

Al caracterizar el estado antiviral en función del tiempo de contacto de las células con MA, hay un período durante la inducción que no requiere su presencia en el medio extracelular (figura 8) sugiriendo que unas pocas moléculas podrían estar actuando y es en realidad un segundo mensajero el que amplifica el efecto. Siguiendo entonces, el modelo del IFN, uno de los primeros interrogantes planteados fue si meliacina se unía a algún receptor celular para ejercer su acción. Los intentos de establecer una cinética de desaparición de meliacina del medio de cultivo no arrojaron resultados positivos (datos no presentados), además, los experimentos realizados con una proteasa indicaron que, al menos receptores de naturaleza proteica, no estarían involucrados en su acción (figura 9). Por esta razón y hasta no disponer de meliacina pura marcada para encarar otras estrategias se decidió no proseguir con el tema.

La segunda pregunta planteada fue qué mecanismos de transducción de señales podrían estar involucrados en la inducción del estado antiviral. Los ensayos realizados con inhibidores de la traducción y transcripción de las macromoléculas celulares y con inhibidores de quinasas y fosfatasas de proteínas permitieron obtener algunas conclusiones. Así, los procesos de transcripción y traducción celulares activos no parecen ser necesarios para su establecimiento; la PKR ni ninguna otra quinasa o fosfatasa de Ser/Thr están implicadas en el mecanismo de inducción; mientras que tanto la Act D como el VAN y la TirB46 favorecen el establecimiento del estado antiviral.

Estos últimos compuestos afectan la fosforilación en tirosina actuando sobre las Tyr-fosfatasa y las Tyr-quinasa, respectivamente, sugiriendo que la fosforilación en tirosina participa en la respuesta de la célula a la acción de MA. Para estudiar el patrón de fosforilación en células Vero tratadas con MA se logró poner a punto un “inmunoblotting” con un Mab anti-fosfotirosina encontrando la aparición de varias bandas de PM alrededor de 35 Kda altamente fosforiladas que no estaban presentes en las células no tratadas (datos no mostrados). Se realizaron varios experimentos modificando el tiempo de tratamiento y la concentración de MA pero lamentablemente los resultados no siempre se reprodujeron entre los distintos experimentos. En consecuencia, resultó difícil llegar a una conclusión sobre el rol de la Tyr-fosforilación en este sistema y de los mecanismos por los cuales el VAN y la TirB46 potencian el efecto de MA.

De todos modos, cabe tener en cuenta que, al igual que en el caso de la Act D, al utilizar inhibidores como herramienta para estudiar respuestas biológicas en células intactas, existe una cuota de inespecificidad que radica en la posibilidad que los mismos puedan estar actuando sobre más de una función y que además sean distintas de las observadas in-vitro. Por ejemplo, en el caso del VAN está descripto que además de la acción directa sobre las Tyr-fosfatasa produce un aumento en el pH intracelular y en los niveles de Ca^{2+} , afecta la degradación intracelular de proteínas, el sistema redox y el metabolismo de los fosfoinosítoles, y tiene efectos mitogénicos aumentando la síntesis de ADN (Gordon J.). En el caso de las tirfostinas, análogos sintéticos de la erbstatina, se ha demostrado que puede actuar además como inhibidor de la integrasa de HIV-1 (Mazunder y col.) y de la replicación de retrovirus murinos (Esther y col.). Mas allá de las dificultades que plantean el uso de inhibidores en lugar de la medición directa de las actividades enzimáticas, los experimentos realizados en paralelo analizando células tratadas con meliacina o interferón (cuadro 4) mostraron que en las condiciones usadas todos los inhibidores afectaron funciones específicas. Aunque, como ya se comentó los efectos observados difieren en ambos sistemas.

En la segunda parte de este trabajo se estudió la acción de MA como antiviral ya que si se agrega a los cultivos celulares luego de iniciada la infección, también ejerce un efecto inhibitorio sobre la multiplicación vírica.

En condiciones de varios ciclos de multiplicación en presencia de MA, no sería necesario un blanco de acción diferente al observado con el pretratamiento para ver un efecto inhibitorio. Al no remover el inhibidor, el estado antiviral no se revierte aún después de las 12 horas como ocurre con el pretratamiento (figura 26), en consecuencia, la progenie viral

proveniente del primer ciclo no podrá llevar a cabo una infección productiva. Estas son las condiciones en las que se estableció la curva dosis-respuesta de la figura 28. En cambio, en el experimento de la figura 29 la infección se realizó en condiciones de un solo ciclo y además la adsorción se hizo a 0°C. El ciclo de VSV se completa en aproximadamente seis horas (datos no presentados), por eso, a las tres horas de incubación a 37°C, tanto la internalización como el desnudamiento ya se llevaron a cabo. El agregado de MA entre las 0 - 6 hs y las 3 - 6 hs p.i. produjo una inhibición del orden de un logaritmo en el rendimiento viral. Estos resultados indican que el postratamiento con MA tiene un blanco de acción diferente al descrito para el pretratamiento, y que además, se trataría de un evento tardío en el ciclo de multiplicación.

Al analizar la expresión de las proteínas virales se confirmó que se trataba de un evento tardío, ya que en presencia de MA las cinco proteínas de VSV se sintetizaron, aunque en una proporción levemente inferior respecto de los controles de virus, tanto en las células Vero como en las BHK-21 (figura 30).

La fosforilación de la proteína P es una modificación post-traducciona involucrada en la regulación del pasaje de transcripción a replicación del ARN que debe realizar la ARN polimerasa al final del ciclo (Chen y Banarjee). Para estudiar si MA estaba afectando la fosforilación de P se realizaron distintos ensayos in-vitro e in-vivo cuyos resultados permiten descartar que este sea el blanco de acción del postratamiento (figuras 31, 32 y 33).

Tanto el armado de la partícula como la brotación de la progenie viral, también son dos eventos tardíos relacionados fundamentalmente con la proteína M y la glicoproteína (G) de VSV (ver figura 5). Se planteó entonces que, si bien su síntesis no estaba afectada en las células tratadas con MA (figura 30), lo que podría estar alterado sería su distribución intracelular. Efectivamente, los experimentos de inmunofluorescencia (figuras 34, 35 y 36) mostraron que, en las células tratadas con MA, la glicoproteína G no es transportada a la membrana citoplasmática y se acumula en inclusiones citoplasmáticas perinucleares que co-localizan con el aparato de Golgi.

Los efectos pleiotrópicos manifestados por meliacina sobre el virus VSV tienen un punto en común, la participación de organelas del sistema vacuolar central en los pasos afectados, los endosomas y el complejo de Golgi.

La alteración en el pH ácido de los endosomas interfiere con las diferentes funciones o procesos en los que participan: 1) la endocitosis mediada por receptor, 2) el reciclaje de los receptores a la superficie celular y el pasaje de los ligandos a los lisosomas para su posterior

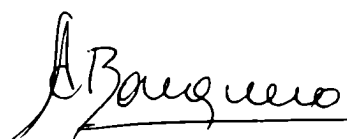
degradación, 3) la formación de vesículas endosomales “carrier” involucradas en el tráfico intracelular, 4) el efecto citotóxico de la toxina diftérica, y 5) la entrada de los virus que utilizan la vía endocítica (Forgac M.). A esta conclusión se arribó utilizando compuestos que por medio de diferentes mecanismos modifican el pH endosomal como los agentes acidotrópicos (cloroquina, cloruro de amonio, amantadina y otras), que son bases débiles que en su forma neutra atraviesan la membrana plasmática, se protonan y quedan retenidos en los compartimentos ácidos (Maheshwari y col.). Los ionóforos como la monensina y la nigericina que disipan el gradiente iónico a través de la membrana plasmática y la bafilomicina A1 que inhibe la ATPasa vacuolar responsable de la acidificación (Sidhu y col.). Todos estos compuestos han sido reportados por su acción inhibitoria sobre los virus que ingresan a la célula por la vía endocítica (Carrasco L.), (Pérez y Carrasco), (Palokangas y col.), (Schlegel y col. 1982b).

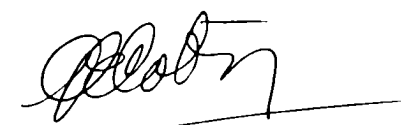
A diferencia de las bases débiles cuyo efecto se establece en forma inmediata así como su reversión, meliacina requiere un tiempo mayor tanto para establecer (2 horas) como para revertir (12 horas) su acción sobre el pH. En este último aspecto, meliacina se asemeja más a la bafilomicina A1 cuyo efecto revierte recién después de un par de horas de su remoción (Ochiai y col.). Con lo cual meliacina se comporta más como un inhibidor de la V-ATPasa que como una base débil.

En relación al pH del sistema de Golgi (incluido el *trans-Golgi network*), no está claro que papel juega en las funciones que desempeña en la célula. Recientemente se ha demostrado que en células BHK-21 la actividad de la V-ATPasa es esencial para que la exocitosis de las glicoproteínas de VSV ocurra normalmente (Palokangas y col.). En presencia de bafilomicina la proteína G queda retenida en el complejo de Golgi, si bien, no se ha podido establecer con certeza en que porción del mismo. El transporte de las glicoproteínas a través del sistema de Golgi se estudia utilizando inhibidores que actúan en distintos pasos de este proceso y diferentes endoglicosidasas. Por ejemplo, la tunicamicina inhibe la oligosacariltransferasa impidiendo la adición del “core” glicano a la proteína causando una alteración en el peso molecular que se traduce como un cambio de movilidad en una corrida electroforética. Mediante un experimento de “pulse - chase” corroboramos que en presencia de MA la G de VSV incorpora el oligosacárido normalmente (datos no mostrados) sugiriendo que su acción sobre G es diferente. La adquisición de resistencia a la endoglicosidasa H indica que las proteínas arribaron al Golgi medio, proceso que es inhibido por la monensina pero no por la bafilomicina A1. La adición y procesamiento de los oligosacáridos es un paso necesario para

el plegamiento correcto de la glicoproteína G (Machamer y Rose). En células tratadas con IFN la proteína G también queda retenida en el Golgi (Sidhu y col.) y ese efecto se atribuye a un efecto del IFN sobre la ATPasa vacuolar. Aunque no disponemos de evidencias directas los experimentos con meliacina parecerían indicar que también la ATPasa vacuolar es el blanco de acción del post-tratamiento indicando que meliacina no tiene un efecto pleiotrópico sino que afectaría a una enzima con actividad múltiple sobre las células. Si así fuera, la acción sinérgica de la actinomicina D en el pretratamiento podría deberse a la inhibición de la transcripción de esta enzima que se sintetiza constantemente. Así también en este modelo se podría explicar el efecto del VAN que como inhibidor de la E-ATPasa podría estar afectando también la actividad de la V-ATPasa incrementando el pH intracelular.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis permiten entender porqué meliacina tiene la propiedad de inhibir la multiplicación de un amplio espectro de virus con diferentes estrategias de replicación pero que utilizan caminos similares para entrar y/o salir de la célula. En particular, para los virus que entran a la célula por la vía endocítica, y para aquéllos que requieren del aparato de Golgi para el procesamiento y transporte de sus glicoproteínas.


Lic. Andrea Barquero


Celia E. Coto

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- Alché, L. E., A. Barquero, N. Sanjuan and C. E. Coto. 2001. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains Herpes simplex virus type 1 propagation. *Phytotherapy Research* . (en prensa).
- Alché, L.E., A. Berra, M.J. Veloso and C.E. Coto. 2000. Treatment with meliacine, a plant derived antiviral, prevents the development of herpetic stromal keratitis in mice. *J. Med. Virol.* 61: 474-480.
- Andrei G.M., A.S. Couto, R.M. Lederkremer, and C.E. Coto. 1994. Purification and partial characterization of an antiviral active peptide from *Melia azedarach* L. *Antiviral Chem. Chemother.* 5: 105-110.
- Andrei G.M., C.E. Coto, and R.A. de Torres. 1985. Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extractos crudos y semipurificados de hojas verdes de *Melia azedarach* L.. *Rev. Arg. Microbiol.* 17: 187-194.
- Andrei G.M., E.B. Damonte, R.A. de Torres, and C.E. Coto. 1988. Induction of a refractory state to viral infection in mammalian cells by a plant inhibitor isolated from leaves of *Melia azedarach* L.. *Antiviral Res.* 9: 221-231.
- Andrei G.M., F.C. Coulombié, M.C. Courrèges, R.A. de Torres, and C.E. Coto. 1990. Meliacine, an antiviral compound from *Melia azedarach* L. inhibits Interferon production. *J. Interferon Res.* 10: 469-475.
- Aoki, H., T. Akaike, K. Abe, M. Kuroda, S. Arai, R-I Okamura, A. Negi and H. Maeda. 1995. Antiviral effect of oryzacystatin, a proteinase inhibitor in rice, against Hepres simplex virus type 1 in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 846-849.
- Balfour, H.H., Jr. 1999. Antiviral drugs. *Drug therapy* 340: 1255-1268.

-
- Balzarini, J., D. Schols, J. Neyts, E. Van Damme, W. Peumans and E. De Clercq. 1991. α -(1-3)- and α -(1-6)-D- mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to Human Immunodeficiency Virus and Cytomegalovirus infections in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35: 410-416.
 - Barik S., and A.K. Banerjee. 1992. Sequential phosphorylation of the phosphoprotein of Vesicular stomatitis virus by cellular and viral protein kinases is essential for transcription activation. *J. Virol.* 66: 1109-1118.
 - Baron S., and F. Dianzani. 1994. The Interferons: a biological system wiht therapeutic potencial in viral infections. *Antiviral Res.* 24: 97-110.
 - Barquero, A. A. y S. M. Villamil. 1997a. Estudio de la acción combinada de meliacina y foscarnet contra distintas cepas del virus Herpes simplex tipo 1 empleando un modelo tridimensional. *Revista Argentina de Microbiología* 28: 32-37.
 - Barquero, A. A., L. E. Alché and C. E. Coto. 1997b. Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase deficient mutant of Herpes simplex virus type 1 alone and in combination with acyclovir. *International Journal of Antimicrobial Agents* 9: 49-55.
 - Beckes, J.D., L.C. Childers and J. Perrault. 1989. Phosphorylation of Vesicular stomatitis virus M protein: evidence for a second virion-associated protein serine kinase activity. *Virology* 169: 161-171.
 - Benencia, F., M.C. Courrèges and F.C. Coulombié. 1997b. Antiviral activity of crude polysaccharides from *Trichilia glabra* leaves. *Fitoterapia* LXVIII: 173-175.
 - Benencia, F., M.C. Courrèges, C.E. Coto and F.C. Coulombié. 1997a. Immunomodulatory activities of *Melia azedarach* L. leaf extracts on human monocytes. *Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants* 5: 7-13.

-
- Benencia, F., M.C. Courrèges, E. Massouh and F.C. Coulombié. 1994. Effect of *Melia azedarach* L. leaf extracts on human complement and polymorphonuclear leukocytes. *J. Ethnopharmacology* 41: 53-57.
 - Benencia, F., M.C. Courrèges, F.C. Coulombié and E. Massouh. 1992. Effect of *Melia azedarach* L. fresh leaf aqueous extract on mice hematological parameters. *Fitoterapia* LXIII: 411-414.
 - Béress, A., O. Wassermann, T. Brhun, L. Béress, E.N. Kraiselburd, L. V. González, G.E. de Motta and P.Y. Chavez. 1993. A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine algae *Fucus vesiculosus*. *J. Nat. Prod.* 56: 478-488.
 - Beutler, J.A., T.C. McKee, R.W. Fuller, M. Tischler, J.H. Cardellina, K.M. Snader, T.G. McCloud and M.R. Boyd. 1993. Frequent occurrence of HIV-inhibitory sulphated polysaccharides in marine invertebrates. *Antiviral Chem. Chemother.* 4: 167-172.
 - Bourgougnon, N., M. Lahaye, J.C. Chermann and J.M. Kornprobst. 1993. Composition and antiviral activities of a sulfated polysaccharide from *Schizymenia dubyi* (Rhodophyta, gigartinales). *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters* 3: 1141-1146.
 - Cardellina, J.H., M.H. Munro, R.W. Fuller, K.P. Manfredi, T.C. McKee, M. Tischler, H.R. Bokesch, K.R. Gustafson, J.A. Beutler and M.R. Boyd. 1993. A Chemical screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural products extracts. *J. Nat. Prod.* 56: 1123-1129.
 - Carlucci, M.J., M. Ciancia, M.C. Matulewicz, A.S. Cerezo and E.B. Damonte. 1999. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral Res.* 43: 93-102.

-
- Carrasco, L. 1994. Entry of animal viruses and macromolecules into cells. FEBS letters 350: 151-145.
 - Castilla, V., A.A. Barquero, S.E. Mersich and C.E. Coto. 1998. In vitro anti-Junín virus activity of a peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. International Journal of Antimicrobial Agents. 10: 67-75.
 - Chang, T. L-Y, C.S. Reiss and A.S. Huang. 1994. Inhibition of Vesicular stomatitis virus RNA synthesis by protein hyperphosphorylation. J. Virol. 68: 4980-4987.
 - Chen, J-L, T. Das and A.Y. Banerjee. 1997. Phosphorylated states of Vesicular stomatitis virus P protein *invitro* and *in vivo*. Virology 228: 200-212.
 - Claus, J., C.E. Coto y R.A. de Torres. 1998. Natural resistance of BALB/c mice to herpes simplex virus type 1 intraperitoneal infection is abrogated by a plant extract with in vitro antiherpes activity. Phytotherapy Res. 12: 1-5.
 - Clinton, G.M., B.W. Burge and A.S. Huang. 1979. Phosphoproteins of Vesicular stomatitis virus: identity and interconversion of phosphorylated forms. Virology 99: 84-94.
 - Coll, J.M. 1995. The glycoprotein G of rhabdoviruses. Arch. Virol. 140: 827-851.
 - Coulombié, F.C., G.M. Andrei, R.P. Laguens, R.A. de Torres, and C.E. Coto. 1992. Partially purified leaf extracts of *Melia azedarach* L. inhibit Tacaribe virus growth in neonatal mice. Phytother Res. 6: 15-19.
 - Courregès, M.C., F. Benencia, C.E. Coto, E. Massouh and F.C. Coulombié. 1994. In vitro antiphagocytic effect of *Melia azedarach* L. leaf extracts on mouse peritoneal exudate cells. J. Ethnopharmacology

-
- Courregès, M.C., F. Benencia, F.C. Coulombié and C.E. Coto. 1998. In-vitro and in-vivo activities of *Melia azedarach* L. aqueous leaf extracts on murine lymphocytes. *Phytomedicine* 5: 47-53.
 - Craig, J., M. Callahan, R.C. Huang and A.L. DeLucia. 2000. Inhibition of human papillomavirus type 16 gene expression by nordihydroguaiaretic acid plant lignan derivatives. *Antiviral Res.* 47: 19-28.
 - Damonte, E. Multiplicación viral. En J.A. Basualdo, C.E. Coto y R. A. de Torres. *Microbiología biomédica*. Ed. Atlante.
 - Damonte, E., J. Neyts, C.A. Pujol, R. Snoeck, G. Andrei, S. Ikeda, M. Witvrouw, D. Reymen, H. Haines, M.C. Matulewicz, A. Cerezo, C.E. Coto and E. De Clercq. 1994. Antiviral activity of a sulfated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Biochem. Pharmacol.* 47: 2187-2191.
 - Darby, G. 1994. A history of antiherpes research. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 5 (supplement 1): 3-9.
 - Darby, G. 1995. In search of the perfect antiviral. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 6 (supplement 1): 54-63.
 - De Clercq Erik. 1995. Antiviral therapy for Human Immunodeficiency Virus infections. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 200-239.
 - De Clercq Erik. 1997. In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 674-693.
 - De Clercq Erik. 1997. Virus replication: target functions and events for virus-specific inhibitors. In Galasso, G.J., R.J. Whitley and T.C. Merigan. *Antiviral agents and human viral diseases*. Lippincott-Raven.

- Descalzo, A. 1991. Propiedades de hongos del género *Alternaria* aislados a partir de hojas de *Melia azedarach* L. Tesis de doctorado de la UBA.
- Descalzo, A. y C.E. Coto. 1989. Inhibición del virus de pseudorrabia (Suid herpesvirus 1) por acción de un antiviral aislado de hojas de *Melia azedarach* L.. Rev. Argen. Microbiol. 21: 133-140.
- Esther, A. S. Iftach and P. Esther. 1994. Inhibition of moloney murine leukemia virus replication by tyrphostins, tyrosine kinase inhibitors. FEBS lett. 341: 99-103.
- Ferran, M.C. and J.M. Lucas-Lenard. 1997. The VSV matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter. J. Virol. 71: 371-377.
- Flint, S.J., L.W. Enquist, R.M. Krug, V.R. Racaniello and A.M. Skalka. 2000. Principles of Virology. Molecular biology, pathogenesis and control. ASM Press. Washington, D.C.
- Forgac, M. 1999. Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. J. Biol. Chem. 274: 12951-12954.
- Fredericksen, B.L. and M.A. Whitt. 1998. Attenuation of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding mutant glycoproteins demonstrate a critical role for maintaining a high pH threshold for membrane fusion in viral fitness. Virology 240: 349-358.
- Fukuchi, K., H. Sakagami, T. Okuda, t. Hatano, S. Tanuma, K. Kitajima, Y. Inoue, S. Inoue, S. Ichikawa, M. Nonoyama and K. Konno. 1989. Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. Antiviral Res. 11: 285-298.
- Galat, A. and S.M. Metcalfe. 1995. Peptidylprolina CIS/TRANS isomerases. Prog. Biophys. Molec. Biol. 63: 67-118.

- García, G.H., R. Campos, R.A. de Torres, A. Broussalis, G. Ferraro, V. Martino and J. Coussio. 1990. Antiherpetic activity of some argentine medicinal plants. *Fitoterapia* LXI (6): 542-546.
- Gaudin, Y., R.W.H. Ruigrok and J. Brunner. 1995. Low-pH induced conformational changes in viral fusion proteins: implications for the fusion mechanism. *J. Gen. Virol.* 76: 1541-1556.
- Goodbown, S. L. Didcock and R.E. Rondale. 2000. Interferons: cellsinalling, immune modulation, antiviral responses and virus conntumeasures. *J. Gen. virol.* 81: 2341-2364.
- Gordon, J. 1991. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods in Enzymology* 201: 477-482.
- Hammond C. and A. Helenius. 1994. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science* 266: 456-458.
- Hamre, D., J. Bernstein and R. Donovan. 1950. Activity of p-aminobenzaldehyde, 3-thiosemicarbazone in the chick embryo and in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 73: 275-278.
- Hasashi, K., H. Nishino, S. Niwayama, K. Shiraki and A. Hiramatsu. 1992. Yucca leaf protein (YLP) stops the protein synthesis in HSV-infected cells and inhibits virus replication. *Antiviral Res.* 17: 323-333.
- Hattori, M., T. Nakabayashi, Y. Lim, H. Miyashiro, M. Kurokawa, K. Shiraki, M. Gupta, M. Correa and U. Pilapitiya. 1995. Inhibitory effects of various Ayurvedic and panamanian medicinal plants on the infection of herpes simples virus –1 in-vitro and in-vivo. *Phytotherapy Res.* 9: 270-276.
- Hay, A.J. 1992. The action of adamantamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *Seminars in Virology* 3: 21-30.

- Hayashi K., T. Hayashi, M. Arisawa and N. Morita. 1993. Antiviral agents of plant origin. Antiherpetic activity of acacetin. *Antiviral Chem. Chemother.* 4: 49-53.
- Helenius, A., M. Kielian, J. Wellsted, I. Mellman, and G. Rudnick. 1985. Effects of monovalent cations on Semliki Forest Virus entry into BHK-21 cells. *J. Biol. Chem.* 260: 5691-5697.
- Hernández, L.D., L.R. Hoffman, T.G. Wolfsberg and J.M. White. 1996. Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 627-661.
- Hirabayashi, K., S. Iwata, M. Ito, S. Shigeta, T. Narui, T. Mori and S. Shibata. 1989. Inhibitory effect of a lichen polysaccharide sulfate, GE-3-S, on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) in-vitro. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 2410-2412.
- Jayakar, H.R., K. Gopal Murti and M.A. Whitt. 2000. Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus M protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release.
- Jones P.S. 1998. Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 9: 283-302.
- Kaptur, P.E., B.J. McCreedy Jr. and D.S. Lyles. 1992. Sites of in-vivo phosphorylation of VSV matrix protein. *J. Virol* 66: 5384-5392.
- Kaptur, P.E., M.O. McKenzie, G.W. Wertz and D.S. Lyles. 1995. Assembly functions of vesicular stomatitis virus matrix protein are not disrupted by mutations at major sites of phosphorylation. *Virology* 206: 894-903.
- Konieczko, E.M., P.A. Whitaker-Dowling, and C.C. Widnell. 1994. Membrane fusion as a determinant of the infectibility of cells by Vesicular Stomatitis Virus. *Virology* 199: 200-211.

- Kurokawa, M., H. Ochiai, K. Nagasaka, M. Neki, H. Xu, S. Kadota, S. Sutardjo, T. Matsumoto, T. Namba and K. Shiraki. 1993. Antiviral traditional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus, and measles virus in vitro and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res.* 22: 175-188.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larner A., and N.C. Reich. 1996. Interferon signal transduction. *Biotherapy* 8: 175-181.
- Larson, A. and B. Oberg. 1981. Selective inhibition of herpesvirus ADN synthesis by foscarnet. *Antiviral Res.* 1: 55-62.
- Levy, D.E. 1995. Interferon induction of gene expression through the Jak-Stat pathway. *Seminars in Virology* 6: 181-189
- Li, Y., L. Luo, M. Schubert, R.R. Wagner and C.Y. Kang. 1993. Viral liposomes released from insect cells infected with recombinant baculovirus expressing the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 67: 4415-4420.
- Lin, T-I, H. Heider and C. Schroeder. 1997. Different modes of inhibition by adamantene amine derivatives and natural polyamines of the functionally reconstituted influenza virus M2 proton channel protein. *J. Gen. Virol.* 78: 767-774.
- Locher, C.P., M.T. Burch, H.F. Mower, J. Berestecky, H. Davis, B. Van Poel, A. Lasure, D.A. Vanden Berghe and A.J. Vlietinck. 1995. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 49: 23-32.
- Machamer, C. and J. Rose. 1988. Vesicular stomatitis virus G proteins with altered glycosylation sites display temperature-sensitive intracellular transport and are subject to aberrant intermolecular disulfide bonding. *J. Biol. Chem.* 263: 5955-5960.

-
- Maheshwari, R.K., G.S. Sidhu, D. Bhartiya and M. Friedman. 1991. Primary amines enhance the antiviral activity of interferon against a membrane virus: role of intracellular pH. *J. Gen. Virol.* 72: 2143-2152.
 - Mantani, N., T. Andoh, H. Kawamata, K. Terasawa and H. Ochiai. 1999. Inhibitory effect of *Ephedrae herba*, an oriental traditional medicine, on the growth of influenza A/PR/8 virus in MDCK cells. *Antiviral Res.* 44: 193-200.
 - Martínez, C.G., R. Guinea, J. Benavente and L. Carrasco. 1996. The entry of reovirus into L cells is dependent on vacuolar proton- ATPase activity. *J. Virol.* 70: 576-579.
 - Matlin, K.S., H. Reggio, A. Helenius, and K. Simons. 1982. Pathway of Vesicular Stomatitis Virus entry leading to infection. *J. Mol. Biol.* 156: 609-631.
 - Mazumder, A. A. Gazit, A. Levitzki, M. Nicklaus, J. Yung, G. Kohlagen and Y. Pommier. 1995. Effects of tyrphostins, protein kinase inhibitors, on human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Biochemistry* 34: 15111-15122.
 - McCormick, J.B., I.J. King, P.A. Webb, C.L. Scribner, R.B. Craven, K.M. Johnson, L.H. Elliot and R. Belmont-Williams. 1986. Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* 314: 20-26.
 - McMahon, J.B., M.J. Currens, R.J. Gulakowski, R.W. Jr. Buckheit, C. Lackman-Smith, Y.F. Hallock and M.R. Boyd. 1995. Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cell killing by at least two distinct mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 484-488.
 - Mellman, I. and K. Simons. 1992. The Golgi complex: in vitro veritas?. *Cell* 68: 829-840.
 - Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63.

-
- Nagai, T., R. Moriguchi, Y. Suzuki, T. Tomimori and H. Yamada. 1995. Mode of action of the anti-influenza virus activity of plant flavonoid, 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis*. *Antiv. Res.* 26: 11-25.
 - Nagata, S., T. Kurata, Y. Ueno, and J. Chiba. 1991. Vesicular Stomatitis Virus-mediated cell fusion subsequent to virus adsorption at different pH values. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 44: 171-180.
 - Nisbet, L.J. and M. Moore. 1997. Will natural products remain an important source of drug research for the future?. *Current Opinion in Biotechnology* 8: 708-712.
 - Ochiai, H. S. Sakai, T. Hirabayashi, Y. Shimizu and K. Terasawa. Inhibitory effect of Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type proton pump, on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells. *Antiviral res.* 27: 425-430.
 - Palokangas, H. K. Metsikkö and K. Väänänen. 1994. Active vacuolar H⁺ATPase is required for both endocytic and exocytic processes during viral infection of BHK-21 cells. *J. Biol. Chem.* 269: 17577-17585.
 - Pérez, L. and Luis Carrasco. 1994. Involvement of the vacuolar H⁺-ATPase in animal virus entry. *J. Gen. Virol.* 75: 2595-2606.
 - Puri, A. J. Winick, R. Lowy, D. Covell, O. Eidelman, A. Walter and R. Blumenthal. 1988. Activation of vesicular stomatitis virus fusion with cells by pretreatment at low pH. *J. Biol. Chem.* 263: 4749-4753.
 - Rigaut, K.D., D.E. Birk, and J. Lenard. 1991. Intracellular distribution of input Vesicular Stomatitis Virus proteins after uncoating. *J. Virol.* 65: 2622-2628.
 - Robinson, C.S. and M.A. Whitt. 2000. The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly. *J. Virol.* 74: 2239-2246.

- Schlegel, R., M.C. Willingham and I. Pastan. 1982a. Saturable binding sites for vesicular stomatitis virus on the surface of Vero cells. *J. Virol.* 43: 871-875.
- Schlegel, R., R.B. Dickson, M.C. Willingham and I. Pastan. 1982b. Amantadine and dansylcadaverine inhibit vesicular stomatitis virus uptake and receptor-mediated endocytosis of α 2-macroglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2291-2295.
- Schlegel, R., T.S. Tralka, M.C. Willingham and I. Pastan. 1983. Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: Is phosphatidylserine a VSV-binding site? *Cell* 32: 639-646.
- Shigeta, S. 1998. Approaches to antiviral chemotherapy for acute respiratory infections. *Antiviral Chem. Chemother.* 9: 93-107.
- Sidhu, G., A. Singh, R.N. Sundarajan, S.V. Sundar and R.K. Maheshwari. 1999. Role of vacuolar H⁺-ATPase in interferon-induced inhibition of viral glycoprotein transport. *J. Interferon and Cytokine Res.* 19: 1297-1303.
- Sidwell, R. 1999. Ribavirin: immunomodulatory effects. *International Antiviral news* 7.2 : 15.
- Simoes, C.M., M. Falkenberg, L. Auler Mentz, E.P. Schenkel and M. Amoroso. 1999. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine* 6: 205-214.
- Stillman, E.A. and M.A. Whitt. 1998. The length and sequence composition of vesicular stomatitis virus intergenic regions affect mRNA levels and the site of transcript initiation. *J. Virol.* 72: 5565-5572.
- Tan G.T., J.M. Pezzuto, A.D. Kinghorn and S.H. Hughes. 1991. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *Journal of Natural Products* 54: 143-154.

- Tartakoff, A.M. and P. Vassalli. 1983. Lectin-binding sites as markers of Golgi subcompartments: proximal-to-distal maturation of oligosaccharides. *J. Cell Biol.* 97: 1243-1248.

- Treanor, J. and A. Falsey. 1999. Respiratory viral infections in the elderly. *Antiviral Res.* 44: 79-102.

- Vaccaro, J.A., K.M. Parnell, S.A. Terezakis and K.S. Anderson. 2000. Mechanism of inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by d4TTP: an equivalent incorporation efficiency relative to the natural substrate dTTP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 217-221.

- Vanden Berghe, D.A., A.J. Vlietinck and L. Van Hoof. 1986. Plant products as potencial antiviral agents. *Bull. Inst. Pasteur* 84: 101-147.

- Villamil, S.M., L.E. Alché, and C.E. Coto. 1995. Inhibition of Herpes simplex type 1 multiplication by meliacine, a peptide of plant origin. *Antiviral Chem. Chemother.* 6: 239-244.

- Wachsman, M.B., and C.E. Coto. 1988. Search for antiviral activity in higher plant extracts. *Fitoterapia* 5 : 422-424.

- Wachsman, M.B., E.B. Damonte, C.E. Coto, and R.A. de Torres. 1987. Antiviral effects of *Melia azedarach* L. leaves extracts on Sindbis virus-infected cells. *Antiviral Res.* 8: 1-12.

- Wachsman, M.B., G. Andrei, M. Daelli y C.E. Coto. 1984. Actividad antiviral asociada a una fracción polipeptídica obtenida de extractos de *Melia azedarach* L. *Acta Farm. Bonaerense* 3: 27-31.

- Wachsman, M.B., V. Castilla and C.E. Coto. 1998. Inhibition of foot and mouth disease virus (FMDV) uncoating by a plant-derived peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. *Archives of Virology* 143: 581-590.

-
- Wachsman, M.B., V. Martino, G.O. Gutkind, J.D. Coussio, C.E. Coto, and R.A. de Torres. 1982. Antiviral activity of a *Melia azedarach* L. plant extract. *Fitoterapia* 53: 167-170.
 - Wagner, R.R. and J.K. Rose. 1996. *Rhabdoviridae: the viruses and their replication*. In Fields, B.N, D.M. Knipe and P.M. Howley. *Fundamental Virology*. Lippincott-Raven.
 - Whitley, R.J. and J.W. Gnann, Jr. 1993. Antiviral therapy. In, B. Roizman, R.J. Whitley and C. Lopez. *The human herpesviruses*. Raven Press, New York.
 - Williams Bryan. 1995. The role of the dsRNA-activated kinase, PKR, in signal transduction. *Sem. in Virol.* 6: 191-202.
 - Witvrouw, M., J.A. Este, M.Q. Mateu, D. Reyman, G. Andrei, R. Snoeck, S. Ikeda, R. Pauwels, N.V. Bianchini, J. Desmyter and E. De Clercq. 1994. Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghadhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Antiviral Chem. Chemother.* 5: 297-303.
 - Woods, J.M., R.C. Bethell, J.A.V. Coates, N. Healy, S.A. Hiscox, B.A. Pearson, D.M. Ryan, J. Ticehurst, J. Tilling, S.M. Walcott and C.R. Penn. 1993. 4-guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-actylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and growth of a wide range of Influenza A and B viruses in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37: 1473-1479.
 - Yoshimori, T., A. Yamamoto, Y. Moriyama, M. Futai and Y. Tashiro. 1991. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* 266: 17707-17712.
 - Yukawa, T.A., M. Kurokawa, H. Sato, Y. Yoshida, S. Kageyama, T. Hasegawa, T. Namba, M. Imakita, T. Hozumi and K. Shiraki. 1996. Prophylactic treatment of cytomegalovirus infection with traditional herbs. *Antiviral Res.* 32: 63-70.