

Tesis Doctoral

# Acción dual de meliacina, un compuesto aislado de *Melia azedarach* L., como agente antiherpético e inductor de citoquinas

Petrera, Erina

2007

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Petrera, Erina. (2007). Acción dual de meliacina, un compuesto aislado de *Melia azedarach* L., como agente antiherpético e inductor de citoquinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Petrera, Erina. "Acción dual de meliacina, un compuesto aislado de *Melia azedarach* L., como agente antiherpético e inductor de citoquinas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2007.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

**ACCIÓN DUAL DE MELIACINA, UN COMPUESTO AISLADO DE *MELIA AZEDARACH* L., COMO AGENTE ANTIHERPÉTICO E INDUCTOR DE CITOQUINAS**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

**Lic. Erina Petrera**

**Director de Tesis: Dra. Celia E. Coto**

**Consejero de Estudios: Dra. Celia E. Coto**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Buenos Aires, 2007

## RESUMEN

### **Acción dual de meliacina, un compuesto aislado de *Melia azedarach* L., como agente antieherpético e inductor de citoquinas**

Meliacina (MA), un limonoide presente en las hojas de la planta *Melia azedarach* L., es capaz de inhibir *in vitro* la replicación de un amplio espectro de virus y actuar también como un potencial inmunomodulador.

En este trabajo de tesis se demuestra la efectividad de meliacina como antiviral contra el patógeno HSV-2, ya sea inhibiendo la replicación del virus en cultivos celulares o por su efecto terapéutico administrado en forma tópica en un modelo de infección genital en ratones. Se confirma, además, su actividad como inmunomodulador por su efecto sobre macrófagos peritoneales murinos cultivados *in vitro*. MA aumenta la producción de citoquinas, en especial el TNF- $\alpha$ , cuando es administrada sola o en combinación con distintos inductores y este aumento está relacionado con la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

Por otro lado, MA inhibe la replicación del virus HSV-2 en células Vero suministrada sola o en forma aditiva en combinación con IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o los dos juntos indicando que aumenta la acción de ambas citoquinas.

Estos resultados en conjunto sugieren que MA puede ejercer distintos efectos dependiendo del tipo celular sobre el que actúa: como antiviral en células epiteliales y como modulador de la producción de citoquinas en los macrófagos. A estas acciones combinadas podría deberse el efecto terapéutico ejercido en el modelo *in vivo*.

Palabras clave: meliacina, HSV-2, *M. azedarach* L., antiviral, citoquinas, inmunomodulador

## SUMMARY

### **Dual action of meliacine, a *Melia azedarach* L. derived compound, as antiherpetic agent and cytokine inducer**

Meliacine (MA), a limonoid present in leaf extracts of *Melia azedarach* L., exhibits a broad range of virus inhibition *in vitro* and is able to act as a potential immunomodulator.

In this work we demonstrate meliacine effectiveness as antiviral against HSV-2, inhibiting virus replication in cell cultures or due to the therapeutic effect exerted on murine genital infection. The immunomodulator activity of meliacine was confirmed, studying its action on peritoneal macrophages *in vitro* cultured. MA enhances cytokine production, especially TNF- $\alpha$ , when is administered alone or in combination with different inductors. This increase is associated with transcription factor NF- $\kappa$ B activation.

On the other hand, MA inhibits HSV-2 replication and enhances IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  inhibition on epithelial cells. In addition, MA increases, in an additive way, the synergistic inhibition produced by IFN combination. These results suggest that meliacine improves interferon action.

These results together suggest that meliacine is able to exert different effects depending on the cellular type which is acting on: as antiviral on epithelial cells and a cytokine modulator on macrophages. The therapeutic effect exhibited on *in vivo* infection could be due to these combined actions.

Key words: meliacine, HSV-2, *M. azedarach* L., antiviral, cytokines, immunomodulator

## AGRADECIMIENTOS

GRACIAS CELIA. Gracias por enseñarme a investigar con pasión. Por las ganas contagiosas de aprender, descubrir, enseñar e investigar. Por darme la oportunidad de soñar, hacer y repetir. Por las charlas amenas y las discusiones interminables sobre resultados. Gracias por guiarme y permitirme compartir su pasión por la literatura, además de todos sus libros. Gracias.

A cada uno de los integrantes del laboratorio de Virología:

Gracias Laura, por apoyarme, por tus consejos valiosos y por confiar en mí. Ojala que podamos trabajar juntas.

Gracias Andre, por dar todo sin esperar nada, por ayudarme siempre, por tu romanticismo crónico y por ser la hermana mayor que nunca tuve!

Gracias Nelly, Vivi y Luis, por ocuparse siempre de mí, sin importar lo que estuvieran haciendo. Gracias por ser tan generosos.

A las chichis: Andre, Cybele, San, Pau, Jose, gracias por convertirse en mis “amigas” además de compañeras del laboratorio. Gracias totales y... ¡Brindemooooos!

A los chicos del laboratorio: Flavia, Laurita, Carlitos, Diego, Clau, Flor, Guada, Pablito, Eliana, gracias por la buena onda.

A Mónica, Susana, Elsa, Carlos, Diana por estar siempre que los necesité.

Gracias Isa y Guille por ayudarme, por juntar miles de hojas y purificar la meliacina para mis experimentos.

Gracias Poli por avisarme que necesitaban a alguien en Viro, por los buenos momentos y los ratones compartidos.

A los integrantes del laboratorio de Inmunología, gracias por ayudarme con algunos protocolos y a los de Genética Bacteriana por los almuerzos compartidos.

Gracias Mario, Lu y Vale, por ayudarme tanto.

A la Dra. Patricia Cabeza Mecker por ayudarme gentilmente con los cortes de tejido.

A la gente de la empresa BIOCIENTÍFICA por ser tan amables conmigo y permitirme trabajar en horarios compatibles con el desarrollo de mi trabajo de investigación.

Gracias Roberto, Jaime, Héctor, Fernando, Gabriel, Mónica, y a todo el personal por los buenos momentos compartidos y por todo lo que aprendí de ustedes.

Gracias a Nico, mis padres, hermanas, familiares y amigos por su apoyo incondicional.

Esta tesis fue posible gracias a los siguientes subsidios:

**CONICET. Subsidio PIP N°: 022336.** Título del Proyecto: "Compuestos antivirales de origen natural: actividad in vitro e in vivo". Directora: Dra. Celia Coto.

Res. 1234 del 17/12/2003.

**Universidad de Buenos Aires. Programación científica 2004 – 2007.** Título del Proyecto: "Efecto antiviral e inmunomodulador de compuestos naturales y sintéticos en condiciones in-vitro e in-vivo". Período 2004 – 2007. Directora: Dra. Celia E. Coto.

**PICT 2005 N°38260.** Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Título del Proyecto: "Nuevos compuestos de origen natural como agentes antivirales y antiinflamatorios para controlar las infecciones herpéticas". Directora: Dra. Laura Alché.

**A NICO**

**A MAMÁ, PAPÁ, ROSALÍA Y LUCÍA**

**“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,  
la electricidad y la energía atómica: la voluntad.”**

**Albert Einstein**



## ABREVIATURAS

**ACV:** aciclovir

**CC:** control de células

**CDM:** 1-cinamoil-3, 11-dihidroxi meliacarpina

**CXH:** cicloheximida

**HSV-1:** herpes simplex tipo 1

**HSV-2:** herpes simplex tipo 2

**i.p.:** intra peritoneal

**i.v.:** intra vaginal

**IFI:** inmunofluorescencia indirecta

**IFN:** interferón

**IL-10:** interleuquina 10

**IL-6:** interleuquina 6

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible

**LPS:** lipopolisacárido

**MAS:** meliacina

**moi:** multiplicidad de infección

**MyD88:** proteína adaptadora dependiente de mieloide

**NO:** óxido nítrico

**p.i.:** post infección

**PBS:** buffer fosfato salino

**TLR:** receptor tipo *toll*

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**TRIF:** adaptador de IFN- $\beta$  contiene dominio TIR

**UFP:** unidad formadora de placa

**UI:** unidades internacionales

**V-ATPasa:** ATPasa vacuolar

**VSV:** virus de la estomatitis vesicular

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	13
<b>Plantas medicinales</b>	14
Actividad antiviral de extractos de plantas	15
Actividad inmunomoduladora en extractos de plantas	16
Meliáceas	17
Características de la familia <i>Meliaceae</i>	18
Estudios realizados en nuestro laboratorio con meliáceas	20
<i>Melia azedarach</i> L	21
Compuestos bioactivos aislados de <i>Melia azedarach</i> L	23
Actividad antiviral de Meliacina	24
Actividad inmunomoduladora de Meliacina	26
Principio activo de Meliacina	27
<b>Virus Herpes Simplex tipo 2</b>	28
Generalidades de la familia <i>Herpesviridae</i>	28
Componentes estructurales	29
Ciclo de replicación	31
Adsorción y penetración	31
Síntesis de ADN	33
Ensamblado	34
Brotación	37
Latencia	38
Diferencias con HSV-1	39
Importancia médica	40
Tratamiento de las infecciones herpéticas	41
Acción de Meliacina sobre herpes	43
Modelo animal	44
<b>Macrófagos y citoquinas en la defensa contra herpes simplex</b>	46
Interferones (IFN)	47
Factor de necrosis tumoral (TNF)	49
Interleuquina 6 (IL-6)	50
Interleuquina 10 (IL-10)	51
Interleuquina 12 (IL-12)	51
Óxido nítrico (NO)	52
Acción contra herpes mediada por macrófagos	53
Otras funciones de los macrófagos	56
Mecanismos de degradación	56
Respuesta de los macrófagos al LPS bacteriano	57
Vías de activación del factor NF- $\kappa$ B	58
<b>OBJETIVOS</b>	61
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	62
Virus	63
Células	64

Animales	65
Reactivos	65
Protocolo de preparación de meliacina	65
Determinación de viabilidad por MTT	66
Ensayo con naranja de acridina	67
Titulación de la infectividad viral por el método de UFP	67
Ensayo de inhibición del rendimiento viral	67
Ensayo de inhibición de la acción citopática	68
Inactivación viral por luz UV	68
Ensayos con animales	68
Infección de los animales por vía intravaginal	68
Lavados vaginales	69
Titulación de HSV-2 en cerebro	69
Obtención de cortes histológicos de vagina	69
Procesamiento de las muestras para obtener cortes de parafina	70
Tinción con hematoxilina-eosina de los cortes de tejido	70
Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cortes de tejido	71
Determinación de citoquinas	71
Medición de la actividad citotóxica de TNF- $\alpha$	71
Neutralización de TNF- $\alpha$	71
ELISA para la medición de IFN- $\gamma$ murino	72
ELISA para la medición de IL-6 murina	72
ELISA para la medición de IL-10 murina	73
Determinación de nitritos por Griess	74
Detección del factor NF-kB por IFI	74
Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	75
Western blot	75
Análisis de imágenes	75
Análisis estadístico	76
<b>RESULTADOS</b>	<b>77</b>
<b>Acción de meliacina sobre la evolución de la infección genital de ratones hembras adultas con HSV-2</b>	<b>78</b>
Introducción	79
Acción antiviral de meliacina en células Vero infectadas con HSV-2	79
Puesta a punto del modelo de infección herpética genital	81
Modelo de infección con HSV-2 cepa G	82
Modelo de infección con HSV-2 MS	84
Acción de meliacina sobre la infección genital con HSV-2	87
Efecto del tratamiento con meliacina formulada en ungüento sobre la infección genital de ratones hembra	91
HSV-2 cepa G	91
HSV-2 cepa MS	93
Detección de citoquinas en los fluidos vaginales	98

<b>Interacción de meliacina con la actividad antiviral de IFN-<math>\alpha</math> e IFN-<math>\gamma</math> en células Vero infectadas con HSV-1 y HSV-2</b>	100
Introducción	101
Efecto antiviral de IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ y su combinación sobre la formación de placas de HSV-2	102
Puesta a punto del modelo	102
Determinación de la moi adecuada	102
Efecto de IFN $\alpha$ y $\gamma$ sobre la formación de placas de HSV en células Vero	104
Efecto de IFN $\alpha$ y $\gamma$ sobre el rendimiento viral de HSV en células Vero	106
Efecto protector de IFN $\alpha$ y $\gamma$ sobre la acción citopática de HSV en células Vero	109
Acción de meliacina sobre el efecto antiviral de IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ y su combinación	111
Acción de CDM sobre el efecto antiviral de IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ y su combinación	116
Acción de CDM bajo diferentes condiciones sobre el efecto antiviral de IFN	119
<b>Efecto de meliacina sobre la producción de citoquinas inducidas en macrófagos cultivados <i>in vitro</i></b>	124
Introducción	125
Actividad antiviral de meliacina en macrófagos	125
Sistema modelo de VSV	125
<b>Producción de TNF-<math>\alpha</math></b>	126
Inductor LPS	126
Respuesta de la línea celular continua de macrófagos J774 A.1	126
Diferencias en la respuesta de macrófagos obtenidos de ratones machos respecto de las hembras	127
Citotoxicidad de MAS para los macrófagos	128
Cinética de producción de TNF- $\alpha$ en cultivos de macrófagos inducidos por LPS. Acción de MAS	129
Actividad moduladora comparada de fracciones obtenidas en el proceso de purificación del principio activo (CDM) a partir de hojas de <i>M. azedarach</i> L	130
Virus HSV-2 como inductor	132
Respuesta de los macrófagos al tratamiento con MAS	132
Replicación de HSV-2 en cultivos de macrófagos peritoneales	133
Efecto de MAS sobre la inducción de TNF- $\alpha$ por HSV-2	135
Inductor IFN- $\gamma$	137
Inducción con IFN- $\gamma$ y HSV-2	138
<b>Síntesis de citoquinas</b>	140
Inductor LPS	140

Efecto modulador de MAS sobre la síntesis de citoquinas en macrófagos inducidos con LPS	140
IL-6 e IFN- $\gamma$	140
Óxido nítrico	141
IL-10	143
Inductor HSV-2	144
Acción de MAS sobre la síntesis de citoquinas en macrófagos peritoneales	144
<b>Efecto de meliacina sobre la translocación del factor de transcripción NF-<math>\kappa</math>B en macrófagos peritoneales</b>	147
Introducción	148
MAS como inductor de la translocación del factor NF- $\kappa$ B	148
Acción de MAS sobre la translocación del NF- $\kappa$ B inducida por LPS	150
Acción de MAS sobre la translocación del factor NF- $\kappa$ B producida por el TNF- $\alpha$	151
Acción de MAS sobre la translocación del NF- $\kappa$ B producida por el IFN- $\gamma$	160
HSV-2 MS como inductor de la translocación	164
<b>DISCUSIÓN</b>	167
<b>CONCLUSIONES</b>	176
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	179

# **INTRODUCCIÓN**

## **Introducción**

### **Plantas medicinales**

Desde la antigüedad, las plantas medicinales han sido usadas para el tratamiento de muchas enfermedades, y en la mayoría de los casos sin pruebas científicas previas que certificaran su utilización. Si tenemos en cuenta que más del 80% de la población mundial utiliza plantas como fuente primaria de agentes medicinales (Farnsworth y col, 1985), no debería sorprendernos encontrar en países de oriente un sistema de medicina tradicional basado en el uso de las plantas como ocurre en la China o en la medicina Ayurveda de la India. También las poblaciones indígenas de América, en especial en la región del Altiplano, utilizan las plantas como única medicina. Según un informe de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2002), el número de países que está trabajando para regular el uso de las plantas medicinales aumentó desde 52 en 1994 a 64 en el 2000 (Figura 1). Dada la enorme variedad y cantidad de especies vegetales existentes en las que se ha encontrado algún principio farmacológico, sólo nos concentraremos en las plantas con actividad antiviral y/ o inmunomoduladora. En los últimos años se ha acentuado dramáticamente el interés en encontrar nuevos productos naturales así como también en determinar la base científica y racional para el uso de preparaciones con plantas medicinales. Habitualmente se trabaja en dos niveles, con extractos crudos o procurando aislar y caracterizar él o los principios activos. El paso del extracto crudo al principio activo es un camino arduo que demanda mucho esfuerzo, no siempre con resultados positivos.

Hay una serie de requerimientos a respetar para lograr un estudio farmacológico exitoso. En primer lugar, es muy importante realizar correctamente la elección de la especie, así como también las partes de la planta a utilizar, la forma de almacenarlas y el solvente que mejor conserve al principio activo. Generalmente se obtienen extractos de distintas partes de la planta a estudiar, tales como raíz, tallo, semillas, hojas y en algunos casos flores, con los que se realizan ensayos para determinar las propiedades de la planta. Aún con la restricción de mencionar solo plantas con actividad antiviral y /o inmunomoduladora, el tema es tan vasto que nos limitaremos a mencionar algunos de los trabajos publicados durante los últimos diez años.

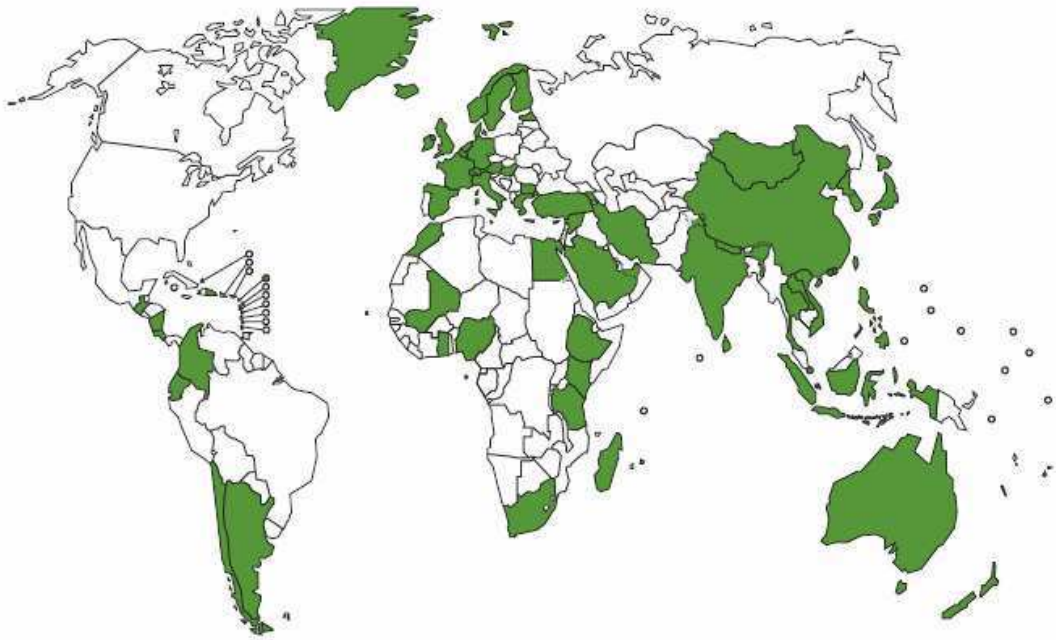


Figura 1. Países que están regulando el uso de las plantas medicinales según un informe de la Organización Mundial de la Salud del año 2000.

### Actividad antiviral de extractos de plantas

Se han realizado muchos estudios con el fin de evaluar la actividad antiviral de extractos vegetales provenientes de plantas muy variadas. Presentaremos aquí los resultados de algunos de los trabajos realizados hasta el presente.

Si tenemos en cuenta los estudios con virus cuyo genoma es ARN, podemos nombrar varios extractos vegetales que pueden inhibir su multiplicación. Por ejemplo, se encontró que los extractos de la planta aromática *Salvia miltiorrhiza* inhiben la multiplicación de enterovirus (Wu y col, 2007) y que extractos obtenidos de la raíz de *Mahonia bealei* o de la hierba venenosa *Trollius chinensis Bunge* tienen actividad antiviral contra el virus de la influenza (Zeng y col, 2006; Cai y col, 2006). Por otro lado, extractos de *Lippia alba*, una planta de los bosques tropicales de Brasil, inhiben la replicación del poliovirus tipo 2 (Andrighetti-Fröhner y col, 2005). Además, compuestos aislados de las hojas y del tallo de la magnolia *Schisandra lancifolia* exhiben actividad contra el retrovirus HIV-1 (Xiao y col, 2006).

En cuanto a extractos que producen la inhibición de la multiplicación de virus con genoma de ADN podemos mencionar al obtenido de la raíz de *Boehmeria nivea*, una



planta originaria de China que inhibe la multiplicación del virus de la hepatitis B (Huang y col, 2006). Este virus también es inhibido por los extractos de la cucurbitácea *Herpetospermum caudigerum* (Yuan y col, 2006). Por otro lado, extractos acuosos de las plantas *Boussingaultia gracilis* var. *pseudobaselloides*, *Serissa japonica*, *Ardisia squamulosa* y *Artemisai princeps* var. *orientalis* utilizadas medicinalmente en Taiwán, demostraron tener actividad antiviral contra adenovirus (Chiang y col, 2003). Estudios realizados con extractos acuosos de la familia *Laminaceae* arrojaron muy buenos resultados. Así, por ejemplo, las especies *Melissa officinalis* (melisa), *Mentha piperita* (peperina), *Prunella vulgaris* (prunella), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Salvia officinalis* (salvia) y *Thymus vulgaris* (tomillo) presentaron actividad virucida contra herpes simplex tipo 1 y 2 (Nolkemper y col, 2006). Extractos etanólicos de la corteza del árbol africano *Brackenridgea zanguebarica* y de la hierba asiática *Andrographis paniculata* nees también tienen actividad virucida contra HSV-1 (Moller y col, 2006; Wiart y col, 2005). Preparaciones realizadas con la raíz de *Carissa edulis*, un árbol pequeño originario de África inhiben la replicación de ambos tipos de HSV (Tolo y col, 2006). Los extractos etanólicos de la hierba china *Nelumbo nucifera* ejercen su actividad antiherpética inhibiendo los transcriptos inmediatamente tempranos de HSV-1 (Kuo y col, 2005). Por otro lado, extractos de las plantas medicinales *Cuphea carthagenensis* y *Tillandsia usneoides* inhiben la replicación de HSV-1 (Andrighetti-Fröhner y col, 2005) y los extractos acuosos de *Boussingaultia gracilis* var. *pseudobaselloides* y *Serissa japonica* poseen actividad antiviral tanto contra HSV-1 como contra HSV-2 (Chiang y col, 2003)

También se han registrado casos de extractos con actividad antiviral contra virus de distinto tipo como son los extractos acuosos del árbol chileno *Quillaja saponaria*, que demostraron tener actividad contra seis virus distintos, vaccinia, HSV-1, varicela zoster, HIV-1 y HIV-2 y reovirus (Roner y col, 2007)

### **Actividad inmunomoduladora en extractos de plantas**

Si bien las propiedades inmunomoduladoras que se han encontrado en las plantas son muchas, en la mayoría de los casos se trata de extractos que tienen la capacidad de inducir la producción de citoquinas así como también la de estimular la proliferación celular.

Estudios realizados con extractos acuosos de la leguminosa *Aspalathus linearis* generalmente utilizada en África para preparar infusiones, demostraron que el té así obtenido tiene propiedades inmunomoduladoras. Los extractos de esta planta aumentan la producción de IL-10 así como también la cantidad de IgM anti-ovoalbúmina en esplenocitos murinos estimulados *in vitro* (Ichiyama y col, 2007). Algunos polisacáridos extraídos del líquen *Thamnolia vermicularis* variedad *Subuliformis*, pueden estimular la proliferación de células de bazo de rata y aumentar la producción de IL-10 en estas células, además estimulan la secreción de TNF- $\alpha$  en macrófagos peritoneales (Omarsdottir y col, 2007)

El fruto de la planta *Evodia rutaecarpa*, perteneciente a la familia de las rutáceas, ha sido utilizado ampliamente en Corea, China y Japón por la medicina tradicional para curar enfermedades inflamatorias. Al evaluar el efecto antialérgico se encontró que los extractos inhiben la reacción anafiláctica en ratones y también la expresión de las proteínas TNF- $\alpha$  e IL-4 en células RBL-2H3 inducidas por el complejo antígeno-IgE (Shin y col, 2007). Otros extractos que presentan actividad anti-inflamatoria son los obtenidos de la leche de coco de la planta *Semecarpus anacardium* LINN, los cuales reducen la elevación de los niveles de TNF- $\alpha$ , óxido nítrico y mieloperoxidasa en un modelo de artritis inducida en animales (Ramprasath y col, 2006). Por otro lado, los extractos metanólicos de la raíz de *Epimedium alpinum* aumentan la proliferación de esplenocitos y timocitos de rata inducida por concanavalina A regulando positivamente la expresión del receptor para IL-2 (Kovacevic y col, 2006)

## **Meliáceas**

Hace más de veinte años que el grupo de investigación liderado por la Dra. Celia E. Coto en el laboratorio de Virología del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, se embarcó en la búsqueda de actividad antiviral en productos naturales. Como resultado de un primer muestreo de extractos de plantas utilizadas en medicina popular se encontró que un extracto de raíz de la planta *Melia azedarach* L resultaba activo frente a varios virus (Wachsman y col, 1982). Estudios posteriores permitieron establecer que la actividad antiviral también estaba presente en extractos hidroalcohólicos de las hojas lo que facilitaba la recolección de la materia prima (Wachsman y col., 1984). Finalmente se demostró que

la actividad estaba presente también en extractos acuosos de hojas verdes los que resultaron tener un amplio espectro de acción antiviral por pre y post tratamiento (Wachsman y col, 1982). Hallazgo que definió el material de partida de todos los estudios posteriores. Con el reconocimiento de actividad antiviral en *Melia azedarach* se procedió a investigar si se trataba de una actividad presente en otros miembros de la familia de las meliáceas cultivadas en nuestro país. Las especies seleccionadas fueron *Cedrela lilloi*, *Cedrela tubiflora*, *Trichilia glabra* y *Trichilia elegans*.

### **Características de la familia *Meliaceae***

La familia *Meliaceae* está constituida principalmente por árboles y arbustos con hojas alternas, frecuentemente pinadas, sin estípulas. Poseen inflorescencias axilares o terminales, con flores hermafroditas agrupadas en cimas. Tienen de 3 a 5 sépalos libres o unidos, 3 a 5 pétalos libres o unidos en la base y 5 a 10 estambres con los filamentos unidos en un tubo en la mayoría de los casos. Presentan frutos en cápsula, drupa o baya, rara vez una nuez. Las semillas a veces son aladas, de número variable y con muy poco albumen. Esta familia incluye unos 50 géneros y alrededor de 550 especies distribuidas principalmente en los trópicos y sub-trópicos (Figura 2). Es una familia de plantas con importancia económica, principalmente por la producción de madera (caobas).

Algunas de las especies con importancia económica y su ubicación geográfica son:

- *Azadirachta indica* (India)
- *Carapa procera* (Sudamérica y África)
- *Cedrela odorata* (América del Sur y Central)
- *Entandrophragma cylindricum* (África tropical)
- *Entandrophragma utile* (África tropical)
- *Guarea cedrata* (África)
- *Guarea thompsonii* (África)
- *Khaya ivorensis* (África tropical)
- *Khaya senegalensis* (África tropical)
- *Melia azedarach* (India, Sureste de China, América del Sur y Central)
- *Swietenia species* (América tropical)
- *Toona australis* (Australia)
- *Toona ciliata* (India, Sureste de Asia y Este de Australia)

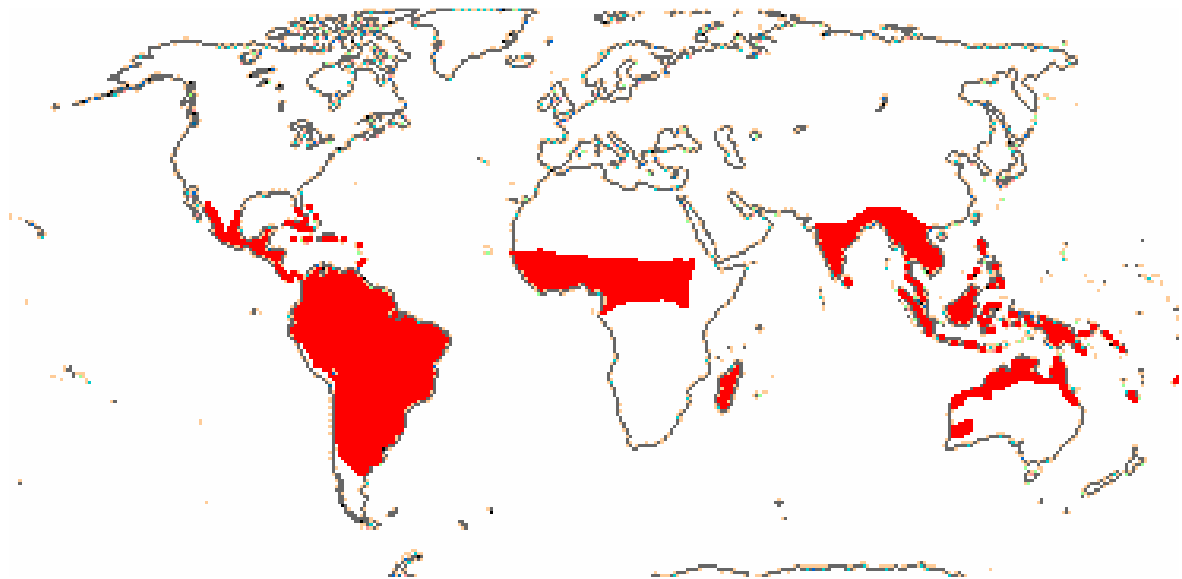


Figura 2. Ubicación geográfica mundial de las meliáceas

Una de las especies más representativas de la familia es la *Azadirachta indica*, árbol conocido comúnmente como margosa o paraíso de la India en español y como *neem* en inglés e hindi. Es un árbol de tamaño mediano a grande, caracterizado por su tronco corto y recto, una corteza arrugada de color marrón oscuro a gris y una copa densa y redondeada con hojas pinadas. Nativa del sur de Asia, la margosa se planta y naturaliza extensamente en las áreas semiáridas a través de Asia y África, en donde se la cultiva más que nada para sombra, combustible y numerosos productos no madereros que se obtienen de las hojas, la fruta y la corteza. Entre éstos se encuentran agentes medicinales e insecticidas. La margosa es uno de los árboles mejores conocidos y más apreciados en el sur de Asia, en donde se le considera como sagrado por los hindúes debido a sus propiedades para prevenir enfermedades. La margosa es una fuente importante para las preparaciones medicinales tradicionales dentro de los sistemas medicinales ayurvédico y otros. Se ha reportado que varias partes del árbol poseen efecto analgésico, antihelmíntico, antipirético, antiséptico, antisifilítico, astringente, demulcente, diurético, emenagogo, emoliente, y purgante. Además, las preparaciones medicinales hechas con componentes procedentes de la margosa han sido usadas para tratar forúnculos, eczema, enfermedades oculares, dolores de cabeza, hepatitis, lepra, malaria, reumatismo, escrófula y úlceras. Se ha

demostrado que los extractos de la margosa poseen propiedades antibacterianas, antidiabéticas, antifúngicas y antivirales (Parrota y Chaturvedi, 1994).

Algunas de las especies de la familia *Meliaceae* presentes en la Argentina son: *Cabralea oblongifoliola*, *Guarea pohlii*, *Trichilia mollis*, *Trichilia glabra*, *Trichilia elegans*, *Cedrela tubiflora*, *Cedrela balansae*, *Melia azedarach* L, *Azadirachta indica* y otras meliáceas.

### Estudios realizados en nuestro laboratorio con meliáceas

Se investigaron algunas especies de los géneros: *Cedrela*, *Trichilia* y *Melia*. Los trabajos con *Melia* se detallan más adelante. Estudios realizados en cultivos celulares en busca de actividad antiviral, citotóxica e inmunomoduladora de extractos obtenidos de las hojas de las especies *Cedrela lilloi*, *Cedrela tubiflora*, *Trichilia glabra* y *Trichilia elegans* se muestran en el Cuadro 1.

También se estudiaron otros extractos de meliáceas como *M. azedarach* variedad *gigantea*, *M. azedarach* variedad *variegada*, *M. toona*, *M. toosedans* y *M. caoba* para determinar la presencia de actividad antiviral o anti-fagocítica, pero no se encontraron actividades importantes en estos extractos y algunos de ellos, como los de *M. toona* y *M. toosedans* fueron muy tóxicos para las células (Coto y de Torres, 1998).

Cuadro 1. Bioactividades detectadas en extractos de hojas de meliáceas nativas

Espece	Actividad	Referencia
<i>Cedrela tubiflora</i>	-Actividad virucida contra HSV, PrV y VSV. -Interfiere con funciones del complemento humano: a) actividad hemolítica; b) proliferación de los linfocitos T; c) capacidad fagocítica y metabolismo de los monocitos y leucocitos polimorfonucleares en ratones -Inhibe la actividad del complemento murino y la fagocitosis por exudados peritoneales de ratón.	Córdoba y col, 1991  Benencia y col, 1995  Benencia y col, 1996
<i>Cedrela lilloi</i>	-Actividad anticomplementaria. -Inhibición de la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales y la activación de su metabolismo oxidativo por zimosán opsonizado.	Nores y col, 1997
<i>Trichilia glabra</i>	-Actividad antiviral contra HSV y VSV.	Benencia y col, 1997
<i>Trichilia elegans</i>	-Actividad anticomplementaria. -Inhibición de la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales y la activación de su metabolismo oxidativo por zimosán opsonizado	Nores y col, 1997

## ***Melia azedarach* L**

La mayoría de las investigaciones llevadas a cabo por nuestro grupo de trabajo se realizaron con extractos de hojas del árbol *Melia azedarach* L obtenidas de la zonas de Palermo y Ciudad Universitaria de la ciudad de Buenos Aires, Olivos y otras localidades de la provincia. Este árbol es oriundo de Asia, de la región Himalaya y su denominación proviene de dos vocablos griegos *melia* (cedro) y *azedarach* (árbol noble). En nuestro país es conocido vulgarmente como paraíso aunque su nombre en español es cinamomo. A mediados del siglo XIX se difundió como árbol ornamental en Sudáfrica y América, donde se naturalizó con rapidez convirtiéndose en una especie invasora que desplazó a otras autóctonas. Se cultiva para decoración y sombra, sobre todo por su ancha y frondosa copa. Es el género tipo de la familia *Meliaceae* que se caracterizan por ser árboles caducifolios de 10-12 m de altura, de copa frondosa y aparasolada y tronco generalmente corto, con la corteza oscura y lisa, fisurada por los años (Figura 3). Poseen hojas alternas bipinadas, pinaticompuestas alternas o raramente simples. Hacia fines de la primavera florece y sus flores son fragantes, pequeñas de color lila-azulado, con el tubo estaminal púrpura. Los frutos son venenosos y tienen forma capsular, baciforme o drupácea (Figura 4). Este árbol es aconsejado para reforestación, ya que crece bien y rápidamente en terrenos ordinarios y secos; su propagación es fácil por semillas y otros medios además de tener buen rebrote. En algunos países se lo cultiva como especie maderable con fines industriales, en la India se lo utiliza para la fabricación de papel.

Como vimos anteriormente para *Azadirachta indica*, a *M. azedarach* L también se le atribuyen una gran variedad de acciones farmacológicas tales como: emético, antipirético, antihelmíntico, emenagogo, anti-inflamatorio, desobstruyente, inhibidor de la alimentación de algunos insectos, astringente, anti-parasitario, antiviral y tónico amargo (Keys y col, 1976; Khan y col, 2001; Khory y col, 1981).

*M. azedarach* ha sido el blanco de muchas investigaciones. Principalmente, aquellas dirigidas a entender las propiedades tóxicas de estas plantas, que permitirían utilizarla como pesticida, insecticida, pediculicida, etc.

Mencionaremos las realizadas por otros grupos de investigación fuera del ámbito del laboratorio de Virología.



Figura 3. Árbol *Melia azedarach* L

Extractos de frutos, semillas y hojas de *M. azedarach* L se han utilizado para estudiar su potencial actividad anti-fúngica contra hongos fitopatógenos. Tanto los extractos obtenidos usando hexano o etanol como solvente demostraron tener actividad fungistática contra *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y otras especies (Carpinella y col, 2003). Por otro lado, los extractos clorofórmicos de las hojas muestran un marcado poder inhibitorio sobre el crecimiento de los epimastigotes de *Tripanosoma cruzi* (Yanes y col, 2004). Extractos florales de *Melia azedarach* L tienen actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* en conejos (Saleem y col, 2002).



Figura 4. Flores y frutos de *Melia azedarach* L

Es sabido que los frutos del paraíso son venenosos, por ese motivo algunos investigadores han centrado sus investigaciones en ellos. Extractos y aceites obtenidos de los frutos de *Melia azedarach* L fueron evaluados como pediculicidas y mostraron ser altamente mortales para las liendres adultas. Si bien los estudios no fueron concluyentes, abren la posibilidad de utilizar *M. azedarach* como piojicida (Carpinella y col, 2007). Por otro lado, se comprobó que los componentes lipídicos de los frutos tienen efecto antiulceroso en ratas con úlceras gástricas agudas inducidas previamente por estrés. Los tratamientos con distintos extractos lograron una reducción considerable de la úlcera (Hanifa y col, 1984). A pesar de estar caratulados como venenosos, extractos de flores y frutos de *M. azedarach* no resultaron tóxicos, administrados oralmente a ratas y ratones, hasta una concentración de 1500 mg/kg. Lo mismo pasó cuando la administración se realizó por vía endovenosa, donde la DL50 fue de 395, 580 mg/kg (extractos florales) y 700, 925 mg/kg (extractos frutales) para los ratones y las ratas respectivamente (Zakir-ur-Rahman y col 1991). Además, los extractos de los frutos parecen ser letales contra larvas de *Aedes aegypty*, el mosquito vector del dengue (Wandscheer y col, 2004); así como también tienen actividad anti-helmíntica contra algunos gusanos como tenia, anquilostoma y lombrices (Szewczuk y col, 2006). En algunos de estos casos ya se ha caracterizado el principio activo.

### Compuestos bioactivos aislados de *Melia azedarach* L

Cuando se comenzaron a aislar los compuestos responsables de las actividades biológicas encontradas en los extractos de *M. azedarach*, se encontró en distintos laboratorios del mundo, que se trataba de tetranortriterpenoides también llamados limonoides (Figura 5). Los limonoides son triterpenos altamente oxigenados y cuando son encontrados en plantas de la familia *Meliaceae* se conocen como meliacinas.

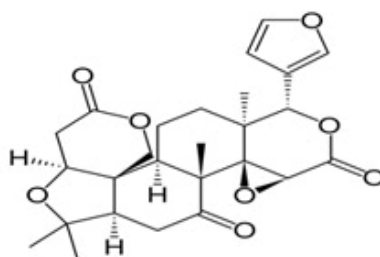


Figura 5. Estructura química de la limonina, el limonoide más abundante



Hasta la fecha, se han encontrado aproximadamente 300 limonoides, de los cuales un tercio pertenecen únicamente a las especies *Azadirachta indica* y *Melia azedarach*. (Roy y Saraf, 2006)

Uno de los compuestos aislados de los frutos de *M. azedarach* es el 28-diacetilsendanina (28-DAS) que presenta actividad antiviral contra el virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) en cultivos de células Vero (Kim y col, 1999).

El fraccionamiento sistemático de un extracto de frutos de *M. azedarach* L llevó al aislamiento de meliartenina, un limonoide que inhibe fuertemente la alimentación de la larva del insecto *Epilachna paenulata* Germ (Carpinella y col, 2002)

La variedad de propiedades biológicas exhibidas por los limonoides es tal que ha llevado a los científicos a focalizar sus estudios en el uso de los mismos contra el cáncer (Tada y col, 1999), bacterias (Abdelgaleil y col, 2004), virus (Sunthitikawinsakul y col, 2003) y hongos.

### **Actividad antiviral de Meliacina**

Una vez determinada la presencia de actividad antiviral en extractos acuosos de hojas de *M. azedarach* L se intensificaron los estudios con el fin de determinar su principio activo. La purificación parcial de los extractos de *M. azedarach* L permitió obtener una fracción con actividad antiviral que se denominó meliacina (Andrei y col. 1988; Villamil y col., 1995).

Los estudios realizados hasta la fecha, y que detallaremos a continuación, han permitido diferenciar en meliacina distintas actividades que nos han llevado a pensar que se trata de un compuesto con características pleiotrópicas.

Por un lado, meliacina ejerce su actividad antiviral de distinta manera dependiendo del tipo de tratamiento realizado, si es pre o post tratamiento; pero además, actúa como inmunomodulador.

En cuanto a la actividad antiviral de meliacina podemos decir que ensayos realizados para determinar cuál era su efecto, demostraron que induce un estado refractario a la infección al ser administrada antes del inóculo viral. La observación de que MA induce en las células un estado antiviral similar al provocado por el interferón, llevó a profundizar los estudios sobre este fenómeno. De esta manera, se pudo establecer que MA induce el estado antiviral en distintos tipos de cultivos celulares,

tanto en cultivos primarios de embriones de pollo como en cultivos continuos (células Vero, BHK-21, HEp-2, HeLa, L929, RK-13). Este estado refractario se produce sólo a temperatura fisiológica, llega a su máxima acción con 2 h de incubación, se mantiene al menos por 15 h y se reestablece con un nuevo pulso de MA. Además, el estado antiviral no se transfiere por fluidos extracelulares ni por contacto directo entre las células tratadas (Andrei y col., 1988).

Si bien en un principio se manejó la hipótesis de que MA podía actuar de la misma manera que el IFN, ésta se descartó al observar que tanto en células L929 como en cultivos primarios de embrión de pollo infectados con el virus de Newcastle, el tratamiento con MA disminuye tanto la síntesis de IFN como la de las enzimas involucradas en el sistema antiviral del IFN (Andrei y col., 1990).

Por otro lado, los resultados obtenidos al poner en contacto directo las partículas virales con meliacina demostraron claramente que ésta no ejerce una acción virucida sobre los virus ensayados.

Meliacina resultó ser un antiviral de amplio espectro, que inhibe la multiplicación de virus pertenecientes a distintas familias. Se ha demostrado que el pre-tratamiento de células BHK-21 con MA inhibe la síntesis del ARN y de las proteínas virales del virus Sindbis, pero no afecta ni la adsorción ni la penetración del mismo (Wachsman y col., 1987).

En células BHK-21 infectadas con virus aftoso cepa campos el agregado de MA afecta el desnudamiento del virus (Wachsman y col., 1998).

Meliacina también inhibe la multiplicación del virus Junín en células Vero y BHK-21, y lo hace tanto por pre como por postratamiento. En el pretratamiento, el compuesto interfiere con el desnudamiento de las partículas virales y, en el postratamiento hay un bloqueo de la liberación de las partículas al medio extracelular, aún cuando el transporte de las glicoproteínas virales a la membrana celular ocurra normalmente (Castilla y col., 1998).

Una posible explicación de la acción de meliacina sobre virus que ingresan a la célula a causa de endocitosis mediada por receptor (Junín, VSV, Sindbis y Aftosa), podría ser el hecho de que meliacina, al igual que los compuestos lisosomotrópicos, produce la basificación de los endosomas. Este efecto fue demostrado mediante la tinción con naranja de acridina, sólo se observa a 37 °C, requiere de un contacto

mínimo de 10 minutos entre MA y las células y persiste hasta 8 h luego de la remoción del antiviral (Wachsman y col. 1998). La alteración del pH endosomal no permitiría la fusión del virus con la célula inhibiendo de esta manera etapas tempranas de la infección con virus cuya entrada es dependiente del pH (tesis de Andrea Barquero).

Teniendo en cuenta el amplio espectro antiviral de meliacina en cultivos celulares, se procedió a evaluar su potencial efecto antiviral en modelos animales. Por un lado, se estudió la acción de MA en el modelo de encefalitis en ratones neonatos infectados por la vía intra-peritoneal (i.p.) con el arnavirus Tacaribe. La administración de MA en el agua de bebida de las crías o de sus madres, protegió a los ratones lactantes de la muerte por encefalitis así como disminuyó también el título de virus en cerebro y su propagación a órganos periféricos como riñón e hígado (Coulombié y col. 1992).

Como veremos más adelante, Meliacina también es activa contra el virus herpes simplex tipo 1 tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*.

### **Actividad inmunomoduladora de Meliacina**

A partir de resultados *in vivo* donde la administración de MA aceleraba el desarrollo de la enfermedad, se diseñaron distintos ensayos dirigidos a investigar la potencial acción de MA sobre algún parámetro de la respuesta inmune.

Meliacina inhibe la producción de IFN- $\alpha$  en células L929 y en fibroblastos primarios de ratón inducidos con virus de Newcastle o con poli I: poli C agregada antes, junto con o inmediatamente después. Además, se observó que la aplicación i.p. de MA disminuyó la cantidad de IFN- $\alpha/\beta$  circulante en suero de ratones expuestos a distintos inductores (Andrei y col., 1990). Además, la administración i.p. de MA a ratones produjo una alteración en los parámetros hematológicos aumentando en forma transiente el volumen de los glóbulos rojos, la concentración de hemoglobina y el número de neutrófilos (Benencia y col., 1992).

Meliacina mostró una fuerte actividad anti-complementaria principalmente de la vía clásica y no inhibió la fagocitosis de partículas de zimosán opsonizadas ni el estallido respiratorio en leucocitos polimorfonucleares (Benencia y col., 1994). En cambio, MA inhibió la fagocitosis de eritrocitos de oveja opsonizados y el estallido respiratorio producido por un éster de forbol en monocitos humanos (Benencia y col.,

1997), así como también la actividad fagocítica y el metabolismo oxidativo de exudados peritoneales de ratón (Courrèges y col., 1994)

Por otro lado se observó una inhibición en la proliferación de linfocitos T aislados de bazo o ganglio de ratones cuando fueron estimulados con Concanavalina A o LPS y tratados con MA. El tratamiento de ratones con MA afectó ligeramente la producción de anticuerpos anti-glóbulos rojos e inhibió en forma dosis dependiente la reacción de rechazo de trasplante de linfocitos así como también la reacción de hipersensibilidad retardada (Courrèges y col., 1998).

Se observó que la administración de MA 96 h antes de la infección ocular con HSV-1 previene el desarrollo de la queratitis ocular lo cual sugiere que meliacina estaría actuando como un inmunomodulador (Pifarré y col., 2002).

### Principio activo de Meliacina

Luego de realizar una purificación extensiva de meliacina, se aisló el tetranortriterpenoide 1-cinamoil-3, 11-dihidroxi meliacarpina denominado CDM (Figura 6) (Alché y col, 2003). Este compuesto es uno de los tantos limonoides que se han encontrado en distintas plantas de la familia *Meliaceae* (Huang y col., 1996; Nakatani y col. 1998).

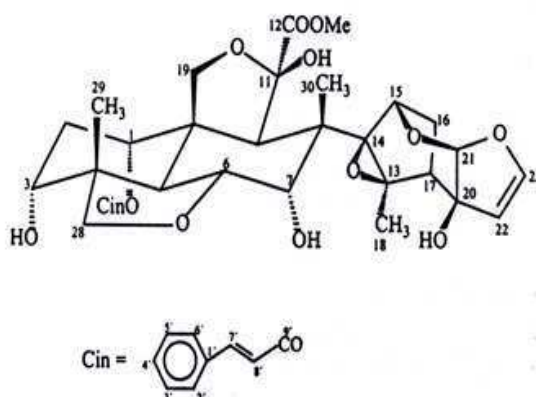


Figura 6. Estructura química de 1-cinamoil-3, 11-dihidroxi meliacarpina (CDM)

Se ha comprobado que CDM es la molécula responsable de la actividad antiviral de MA, ya que inhibe la replicación de VSV y HSV-1 *in vitro* al ser agregada luego de la infección con muy baja citotoxicidad (Alché y col, 2003).

En cuanto al mecanismo de acción, se descubrió que CDM ejerce su acción antiviral contra VSV sobre la vía endocítica, basificando los endosomas e impidiendo el

desnudamiento de las nucleocápsides, cuando las células son pre-tratadas. Además, cuando CDM es agregado luego de la infección, actúa sobre la vía exocítica, confinando la proteína G viral al aparato de Golgi (Barquero y col., 2004). Por otro lado, las glicoproteínas de HSV-1 también quedan atrapadas en el aparato de Golgi independientemente del tipo celular (Barquero y col., 2006)

CDM es capaz de impedir la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en células de conjuntiva infectadas con HSV-1 y además lleva a la acumulación en el citoplasma de la sub-unidad p65 de NF- $\kappa$ B en células Vero sin infectar (Barquero y col., 2006). Estos hechos demuestran que CDM es un compuesto pleiotrópico que, además de inhibir la multiplicación de virus de ADN o ARN modula el camino de señal del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, lo cual podría estar directa o indirectamente relacionado con la actividad inmunomoduladora de meliacina previamente descrita.

## **Virus Herpes Simplex tipo 2**

### **Generalidades de la familia *Herpesviridae***

El virus herpes simplex tipo 2 (HSV-2) pertenece a la familia *Herpesviridae*, por tener un *core* conteniendo ADN de cadena doble, una cápside icosadeltahédrica de 100 a 110 nm formada por 162 capsómeros, tegumento rodeando la cápside y una envoltura conteniendo glicoproteínas virales en forma de espículas en su superficie (Figuras 7 y 8). Está clasificado dentro de la subfamilia *Alphaherpesvirinae*, género *Simplexvirus* por presentar un espectro variable de hospedador, ciclo reproductivo corto, diseminación rápida en cultivo, destrucción eficiente de las células infectadas y capacidad de establecer infecciones latentes generalmente en ganglios sensoriales.

Familia:

### ***Herpesviridae***

Subfamilias:

***Alphaherpesvirinae*** Géneros: *Simplexvirus* (HSV-1), *Varicellovirus* (VZV), virus de la enfermedad de *Marek*, virus de la laringotraqueitis infecciosa

***Betaherpesvirinae*** Géneros: *Cytomegalovirus* (HCMV), *Muromegalovirus* (citomegalovirus murino), *Roseolovirus* (HHV-7)

***Gammaherpesvirinae*** Géneros: *Lymphocryptovirus* (EBV), *Rhadinovirus* (SaHV-2)

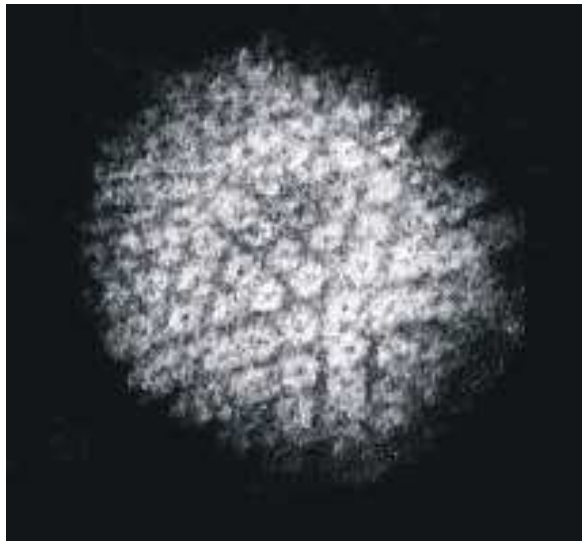


Figura 7. Microfotografía electrónica de HSV

### Componentes estructurales

El “core” de un virión maduro contiene el ADN viral de doble cadena en forma de toroide, aun no se sabe como es la organización precisa del ADN en esta estructura (Figura 8).

La cápside mide 100 nm de diámetro y está compuesta por 162 capsómeros, los cuales tienen un canal central que corre desde la parte externa hasta el interior de la cápside.

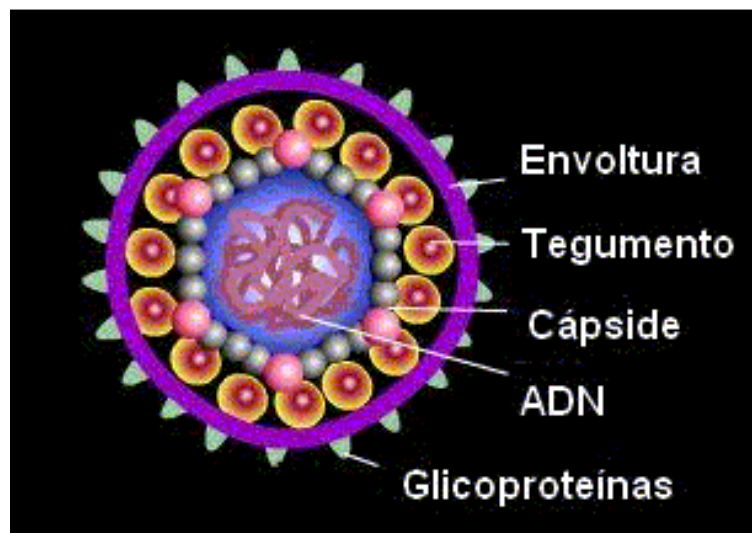


Figura 8. Esquema de los componentes estructurales de HSV

El tegumento es la estructura presente entre la cápside y la envoltura, está formado por proteínas virales involucradas en las fases iniciales de la infección viral y la replicación y su visualización mediante microscopía electrónica indica que se trata una estructura ordenada.

La envoltura tiene una apariencia trilaminar que parece derivar de parches de la membrana celular, está formada por una bicapa lipídica y contiene al menos diez protuberancias glicoproteicas en la superficie y dos proteínas no glicosiladas.

El virión tiene un tamaño que varía entre 120 y 300 nm. Esta variación puede deberse al grosor del tegumento o al estado de la envoltura. Se estima que los viriones contienen entre 30 y 84 polipéptidos.

El ADN es lineal y de doble cadena, pero se vuelve circular inmediatamente cuando se libera de la cápside dentro del núcleo de las células infectadas. Tiene un tamaño de 150 kpb y un contenido de G + C de 69%. El genoma consiste de un segmento largo único ( $U_L$ ) y uno corto ( $U_S$ ) que están unidos covalentemente (Figura 9). Las secuencias terminales están repetidas en orientación invertida y yuxtapuestas internamente, dividiendo el genoma en dos componentes que consisten en una región de secuencia única flanqueada por repeticiones invertidas. Ambos componentes pueden invertirse con relación al otro, por lo tanto el ADN extraído de viriones o de células infectadas estará formado por cuatro poblaciones equimoleculares que difieren en la orientación relativa de los dos componentes.

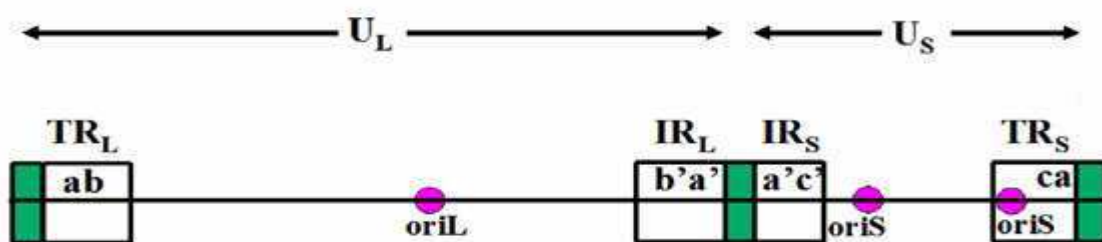


Figura 9. Esquema de los genes de HSV. Genoma doble cadena formado por un segmento largo ( $U_L$ ) y uno corto ( $U_S$ ) Flanqueado por secuencias repetidas terminales (TR) o internas (IR). Hay diferentes orígenes de replicación ( $ori_S$  y  $ori_L$ )

## Ciclo de replicación

Los HSV fueron los primeros Herpesvirus humanos en ser descubiertos y a partir de entonces son unos de los más estudiados debido a sus particularidades. El nombre de Herpes procedería del griego *herpei* que significa entre otras acepciones hormigueo. Pueden causar distintos tipos de infección o mantenerse latentes en el huésped durante toda su vida y ser reactivados a causa de lesiones en/o cerca del sitio de la infección inicial. Los virus herpes simplex cuando son cultivados in vitro pueden producir distintos efectos citopáticos. Por un lado pueden lisar la célula huésped debido a la gran cantidad de progenie producida o también originar la formación de sincicios que son células multinucleadas debido a la fusión de dos o más membranas celulares.

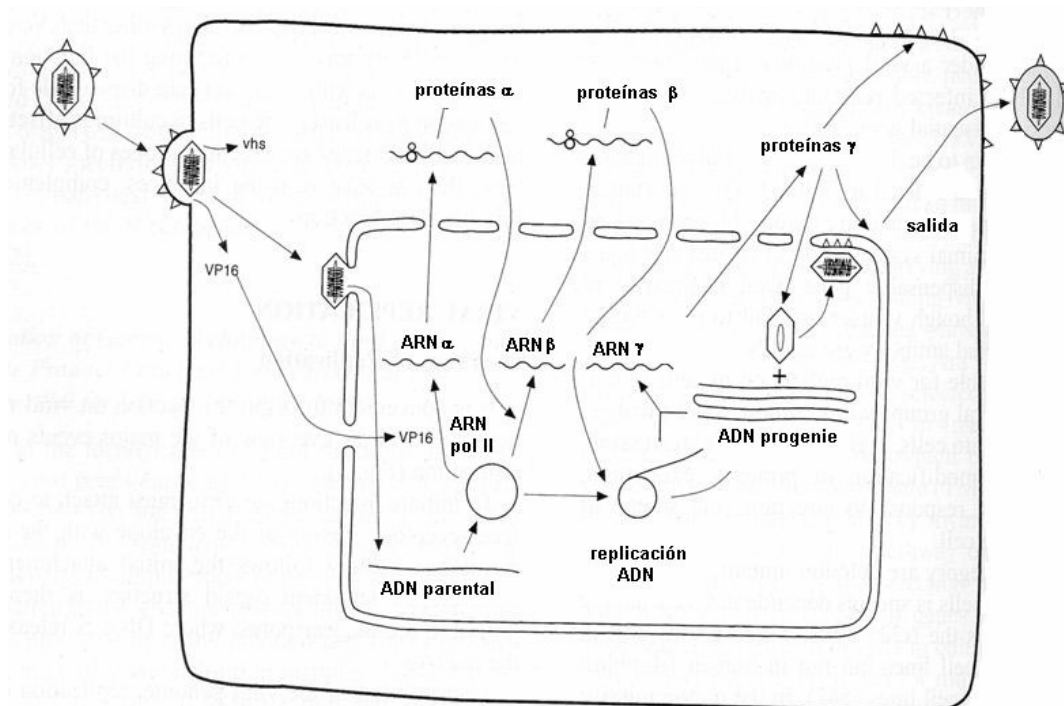


Figura 10. Esquema del ciclo de replicación de HSV

## Adsorción y penetración

La infección se inicia por la adsorción de la partícula viral por interacción de las glicoproteínas gB y gC y los receptores celulares, los cuales son cadenas de heparán sulfato de los proteoglicanos celulares (Figura 11). El paso crucial es conducido por la glico-proteína D (gD) del virión que se une a un receptor de entrada del cual se han descrito tres tipos. El primero que ha sido caracterizado es un miembro de la familia de



receptores del factor de necrosis tumoral llamado mediador de la entrada del virus herpes (HVEM, ahora denominado HveA), lo siguen las nectina-1 (HveC) y nectina-2 (HveB) ambos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y los sitios heparán sulfato modificados por la enzima 3-O-sulfotransferasa. El uso diferencial de estos receptores permite que HSV-2 entre en tipos celulares diferentes, por ejemplo la presencia de nectina-1 es importante para la infección con herpes en la mucosa vaginal (Linehan y col., 2004).

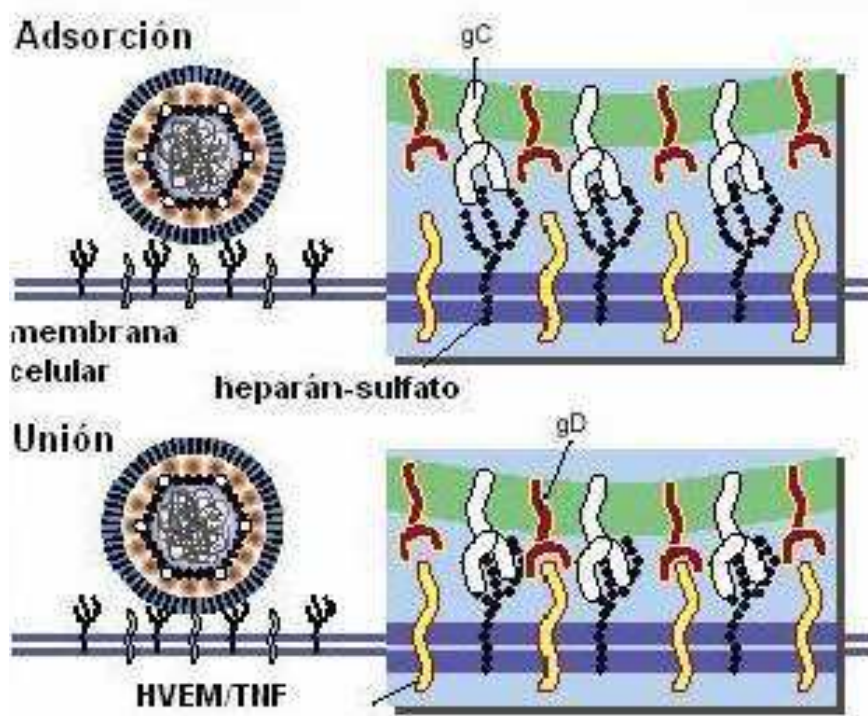


Figura 11. Esquema de la etapa de adsorción de HSV

Una vez producida la unión, gD sufre cambios conformacionales que le permiten interactuar con gB y otras glicoproteínas lo cual resulta en la fusión de la envoltura del virión con la de la célula liberando la cápside y las proteínas del tegumento al citoplasma (Figura 12). Las proteínas que forman el tegumento desempeñan un rol clave creando un ambiente propicio para la replicación de los genes virales, protegiéndolos de las condiciones hostiles dentro de la célula hospedadora. Una proteína del tegumento, la VP16 al entrar al citoplasma se une a una proteína celular (HCF) que la transporta al núcleo donde forma parte del complejo de iniciación de la transcripción viral.

Por su parte, la nucleocápside es transportada mediante la red de microtúbulos al poro nuclear donde se asocia con los complejos del poro y libera el ADN dentro del núcleo quedando la cápside vacía en el citoplasma

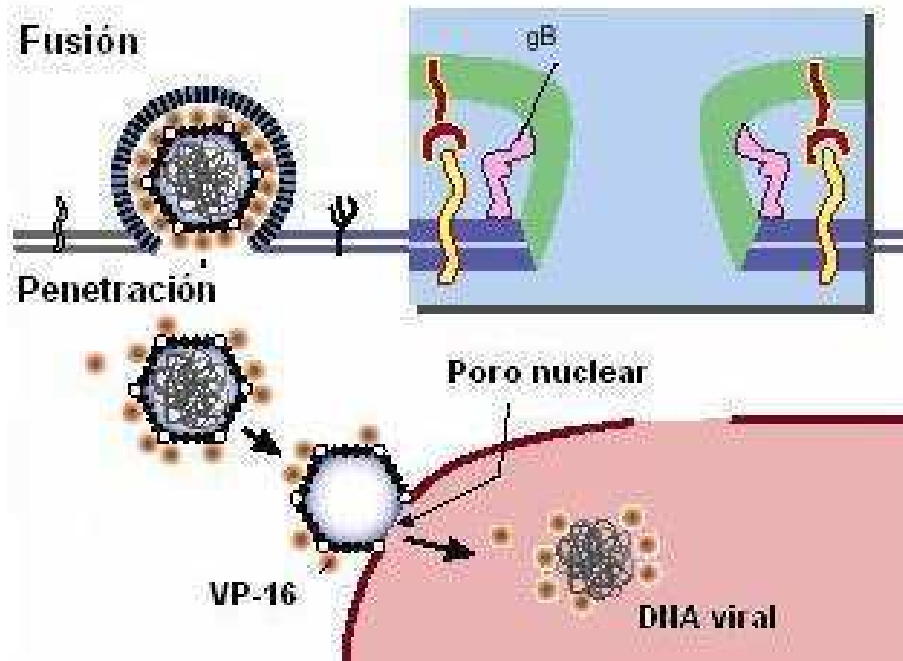


Figura 12. Esquema penetración de HSV

### Síntesis de ADN

La infección con HSV inhibe la transcripción, el *splicing* y el transporte del ARN mensajero, así como también la síntesis de proteínas del huésped, facilitando la transición de la expresión génica celular a la viral. La síntesis de los productos génicos virales es altamente regulada: se sintetizan más de 80 proteínas virales de manera organizada y ordenada secuencialmente en forma de cascada (Cuadro 2). Los genes se transcriben en grupos clasificados como  $\alpha$  o inmediatamente temprano (IE, del inglés *immediate early*),  $\beta$  o temprano (E, del inglés *early*) y  $\gamma$  o tardío (L, del inglés *late*) (Figura 12). El ADN viral se circulariza inmediatamente luego de entrar al núcleo sin la necesidad de síntesis de nuevas proteínas virales y a través del modelo de círculo rodante es transcrito en el núcleo (Figura 13), entre 2 y 4 h p.i., por la ARN polimerasa II del huésped para dar lugar a la síntesis citoplasmática de las proteínas IE, estas proteínas se designan: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 Y U<sub>S</sub>1.5. La mayoría de las proteínas de HSV sufren modificaciones post traduccionales, estas modificaciones incluyen clivaje, miristilación, fosforilación, glicosilación, etc., y en su mayoría son

realizadas por proteínas celulares. Cinco de las seis proteínas IE actúan regulando la expresión de los genes virales en el núcleo transcribiendo las proteínas E. Las proteínas E (ICP8, ICP6), cuyo máximo aparece entre las 4 y las 8 h p.i., están involucradas en la replicación de la molécula de ADN viral, esta replicación estimula la síntesis de las proteínas tardías. Las proteínas L (ICP5, gD, gB, ICP34.5, gC) se expresan en grandes cantidades para ensamblar las partículas virales.

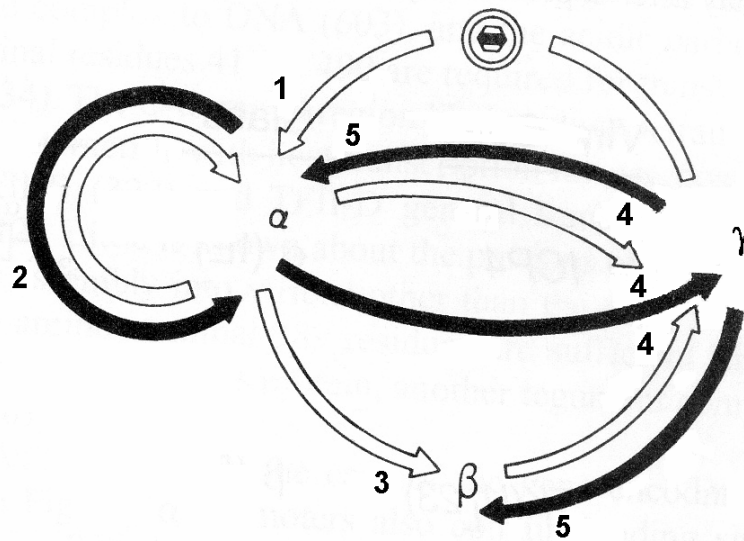


Figura 13. Esquema de la regulación génica de HSV. Las flechas blancas y negras representan los eventos de encendido y apagado de la expresión génica respectivamente. **1.** Encendido de genes  $\alpha$ . **2.** Autorregulación de la expresión de genes  $\alpha$ . **3.** Encendido de genes  $\beta$ . **4.** Encendido de genes  $\gamma$  por los productos  $\alpha$  y  $\beta$ . **5.** Apagado de genes  $\alpha$  y  $\beta$  por los productos de los genes  $\gamma$ .

## Ensamblado

La primer parte del proceso de ensamblado ocurre en el citoplasma, donde las proteínas de la cápside VP25, VP26 y VP23 se unen y son transportadas al núcleo. Dentro del núcleo el ADN viral es empaquetado y encapsidado, este proceso requiere de los productos génicos virales U<sub>L</sub>6, U<sub>L</sub>15, U<sub>L</sub>25, U<sub>L</sub>28, U<sub>L</sub>32, U<sub>L</sub>33, U<sub>L</sub>36 y U<sub>L</sub>37 aunque todavía no ha sido dilucidado.

Cuadro 2. Proteínas del virus herpes simplex

<b>Nombre</b>	<b>Tipo</b>	<b>Función</b>
<b>“a”</b>		Clivaje del genoma, señal empaquetamiento
<b>α0</b>	IE	Regulador de la transcripción IE
<b>gL (U<sub>L</sub>1)</b>	E	Entrada viral,
<b>U<sub>L</sub>2</b>	E	Uracil ADN glicosilasa, reparación del ADN
<b>U<sub>L</sub>3</b>	L	Proteína asociada a la membrana
<b>U<sub>L</sub>4</b>	E	Proteína del tegumento, función desconocida
<b>Helicasa/primasa (U<sub>L</sub>5)</b>	E	Replicación del ADN
<b>U<sub>L</sub>6</b>	L	Proteína de la cápside, maduración de cápside, empaquetamiento de ADN
<b>Helicasa/primasa (U<sub>L</sub>8)</b>	E	Replicación ADN
<b>Proteína de unión al Ori (U<sub>L</sub>9)</b>	E	Replicación ADN
<b>gM (U<sub>L</sub>10)</b>	L	Glicoproteína, función desconocida
<b>U<sub>L</sub>11</b>	L	Proteína del tegumento, egreso y envoltura de la cápside
<b>Exonucleasa alcalina (U<sub>L</sub>12)</b>	E	Empaquetado del ADN, egreso de la cápside
<b>Proteína quinasa (U<sub>L</sub>13)</b>	L	Asociada a tegmento
<b>U<sub>L</sub>14</b>	L	Desconocida
<b>U<sub>L</sub>15</b>	L	Empaquetado del ADN, “splicing” ARNm
<b>U<sub>L</sub>16</b>	L	Desconocida
<b>U<sub>L</sub>17</b>	L	Clivaje y empaquetado del ADN
<b>Cápside (U<sub>L</sub>19)</b>	L	Proteína de la cápside
<b>U<sub>L</sub>20</b>	L	Asociada a membrana, egreso del virión
<b>U<sub>L</sub>21</b>	L	Tegumento
<b>gH (U<sub>L</sub>22)</b>	L	Entrada viral
<b>U<sub>L</sub>23</b>	E	Timidita quinasa
<b>U<sub>L</sub>25</b>	L	Proteína del tegumento, maduración de la cápside, empaquetado del ADN
<b>U<sub>L</sub>26</b>	E	Proteasa madurativa
<b>U<sub>L</sub>26.5</b>	E	Proteína plegadora
<b>gB (U<sub>L</sub>27)</b>	E	Glicoproteína para entrada viral
<b>U<sub>L</sub>28</b>	E	Maduración de cápside, empaquetado del ADN
<b>U<sub>L</sub>29</b>	E	Proteína unión al ADN simple cadena, replicación ADN
<b>ADN pol (U<sub>L</sub>30)</b>	E	Replicación ADN
<b>U<sub>L</sub>31</b>	L	Fosfoproteína nuclear, egreso nuclear
<b>U<sub>L</sub>32</b>	L	Maduración cápside, empaquetado ADN
<b>U<sub>L</sub>33</b>	L	Maduración de cápside, empaquetado ADN
<b>U<sub>L</sub>34</b>	L	Fosfoproteína de membrana, egreso nuclear
<b>U<sub>L</sub>35</b>	L	Proteína cápside

Nombre	Tipo	Función
<b>U<sub>L</sub>36</b>		ICP1/2, proteína de tegumento
<b>U<sub>L</sub>37</b>	L	Fosfoproteína tegumento
<b>U<sub>L</sub>38</b>	L	Proteína cápside
<b>U<sub>L</sub>39</b>	E	Subunidad grande ribonucleótido reductasa
<b>U<sub>L</sub>40</b>	E	Subunidad chica ribonucleótido reductasa
<b>U<sub>L</sub>41</b>	L	Proteína asociada al <i>shut off</i> celular
<b>U<sub>L</sub>42</b>	L	Proteína accesoria polimerasa, replicación ADN
<b>U<sub>L</sub>43</b>	L	Desconocida
<b>gC (U<sub>L</sub>44)</b>	L	Etapas inicial asociación virus-célula
<b>U<sub>L</sub>45</b>	L	Asociada a membrana
<b>U<sub>L</sub>46</b>	E	Asociada a tegumento, modula a $\alpha$ -TIF
<b>U<sub>L</sub>47</b>	E	Asociada a tegumento, modula a $\alpha$ -TIF
<b><math>\alpha</math>-TIF (U<sub>L</sub>48)</b>		Activador transcripcional asociado al virión, activa la transcripción IE
<b>U<sub>L</sub>49</b>	E	Proteína de tegumento
<b>U<sub>L</sub>49.5</b>	L	Desconocida
<b>dUTPasa (U<sub>L</sub>50)</b>	E	Metabolismo nucleótidos
<b>U<sub>L</sub>51</b>	L	Desconocida
<b>Helicasa/primasa (U<sub>L</sub>52)</b>	E	Replicación ADN
<b>gK (U<sub>L</sub>53)</b>	L	Egreso virión
<b><math>\alpha</math> 27 (U<sub>L</sub>54)</b>	IE	Proteína reguladora IE, inhibe "splicing"
<b>U<sub>L</sub>55</b>	E	Desconocida
<b>U<sub>L</sub>56</b>	L	Proteína tegumento, afecta patogénesis
<b><math>\alpha</math>4</b>	IE	Activador transcripcional IE
<b><math>\alpha</math>22 (U<sub>S</sub>1)</b>	IE	Proteína IE, afecta la habilidad del virus de infectar determinadas células
<b>U<sub>S</sub>2</b>	E	Desconocida
<b>U<sub>S</sub>3</b>	E	Proteína quinasa asociada al tegumento
<b>gG (U<sub>S</sub>4)</b>	E	Glicoproteína de función desconocida
<b>gJ (U<sub>S</sub>5)</b>	L	Glicoproteína de función desconocida
<b>gD (U<sub>S</sub>6)</b>	L	Entrada del virus, se une a HVEM
<b>gI (U<sub>S</sub>7)</b>	E	Glicoproteína que actúa con gE, se une a IgG y aumenta la dispersión del virus de célula a célula
<b>gE (U<sub>S</sub>8)</b>	E	Glicoproteína que actúa con gI, tiene influencia sobre la dispersión viral
<b>U<sub>S</sub>9</b>	E	Fosfoproteína asociada al tegumento
<b>U<sub>S</sub>10</b>	E	Proteína asociada al tegumento
<b>U<sub>S</sub>11</b>	E	Fosfoproteína asociada al tegumento, unión al ARN, regulación post traduccional
<b><math>\alpha</math>47 (U<sub>S</sub>12)</b>	IE	Proteína IE, inhibe la presentación antigénica MHC I en células humanas y de primate

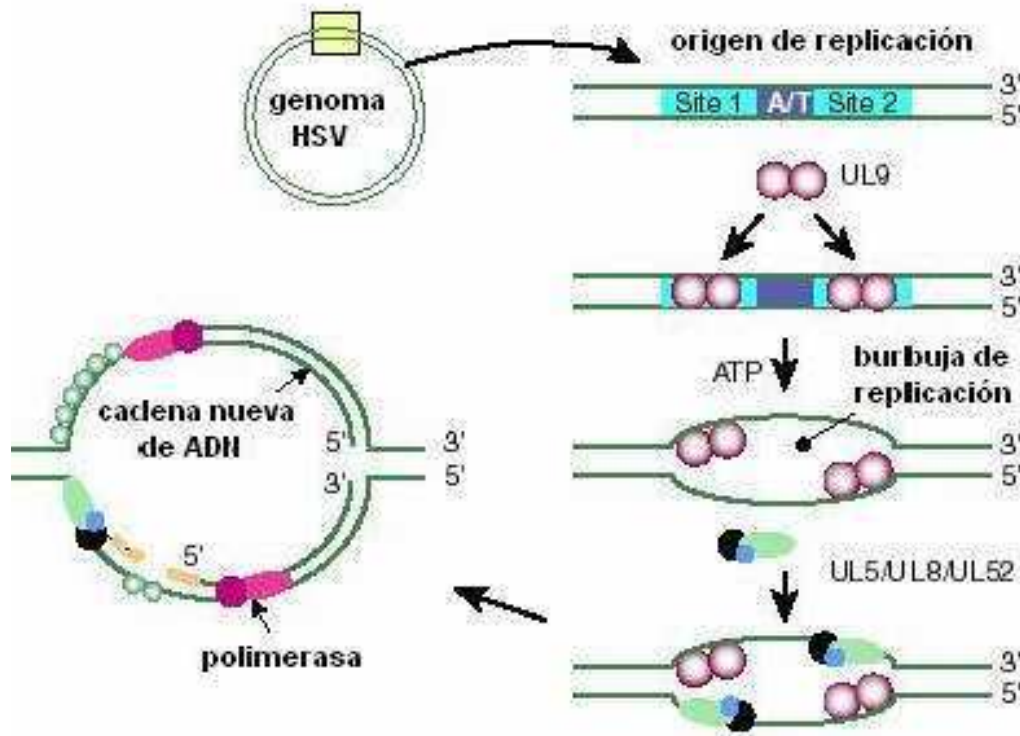


Figura 14. Modelo de transcripción círculo rodante

## Brotación

Luego de la encapsidación de las moléculas de ADN genómico, las nucleocápsides son capaces de brotar de la membrana nuclear y las proteínas del tegumento VP16 y VP22 parecen estar involucradas en este proceso. La ruta de egreso de la partícula viral desde el espacio entre la membrana interna del núcleo y el exterior de la célula infectada es un tanto controvertida.

La Figura 14 presenta las diferentes hipótesis sobre dos vías posibles: A- Vía de la reenvoltura. La partícula envuelta se fusiona con la membrana externa del núcleo y de esta manera se desnuda, luego entra en trans-Golgi y la partícula es reenvuelta y liberada a través de vesículas secretorias. B- Vía del lumen. La partícula envuelta se mueve a través del citoplasma en el lumen del retículo endoplásmico o en vesículas hacia el trans-Golgi o Golgi, donde ocurre la maduración final de las glico-proteínas virales.

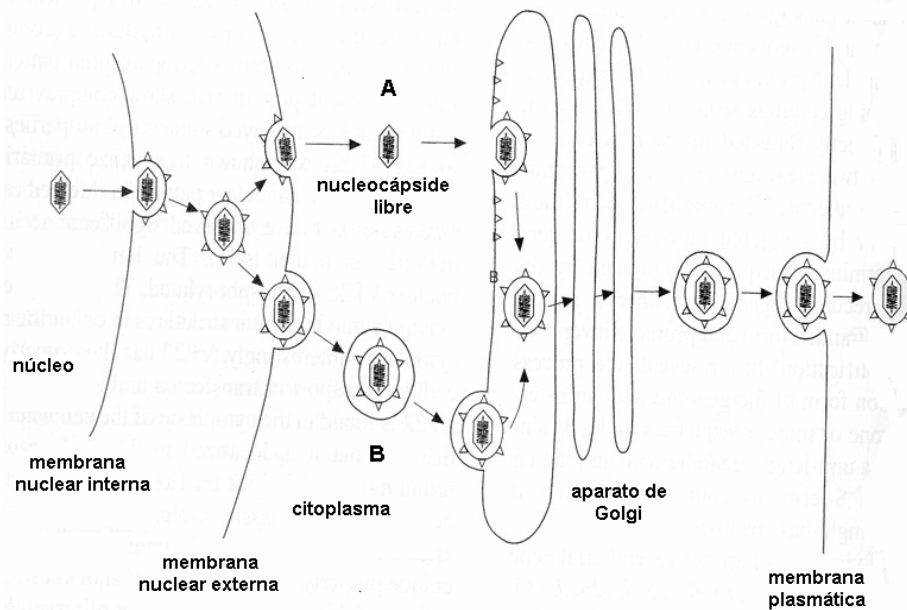


Figura 15. Esquema de la brotación de HSV. A- Vía de la reenvoltura, B- Vía del lumen.

Además de la propagación de una célula a la siguiente a través del espacio extracelular, HSV puede pasar directamente de una célula a la otra por las conexiones celulares, en este proceso estarían involucradas las glico-proteínas gE y gI que mediarían el movimiento de los viriones a través de las uniones. En cultivos permisivos el ciclo completo de replicación de HSV tarda de 18 a 20 horas.

## Latencia

Luego de producida la infección primaria del epitelio, HSV-2 entra en las terminales nerviosas sensoriales y asciende en forma retrógrada a las células neuronales que enervan el epitelio de la mucosa (Figura 15). La neurona productivamente infectada transmite el virus a través de la sinapsis. Una consecuencia de la infección en los ganglios es el establecimiento de latencia en algunas neuronas. En las neuronas infectadas en forma latente el genoma viral se vuelve circular y no hay replicación, aparecen algunos transcritos de ARN denominados LAT (del inglés *latency-associated transcript*) cuya función no ha sido establecida. Se cree que los LAT junto con otros genes virales y celulares están implicados en la reactivación periódica del virus que viaja por transporte axonal, generalmente a las células vecinas al sitio de la infección inicial (Aurelian, 2004). Dependiendo de distintos factores, incluyendo el

estado del sistema inmune, la reactivación puede ser asintomática o producir lesiones recurrentes cuya severidad puede variar considerablemente.

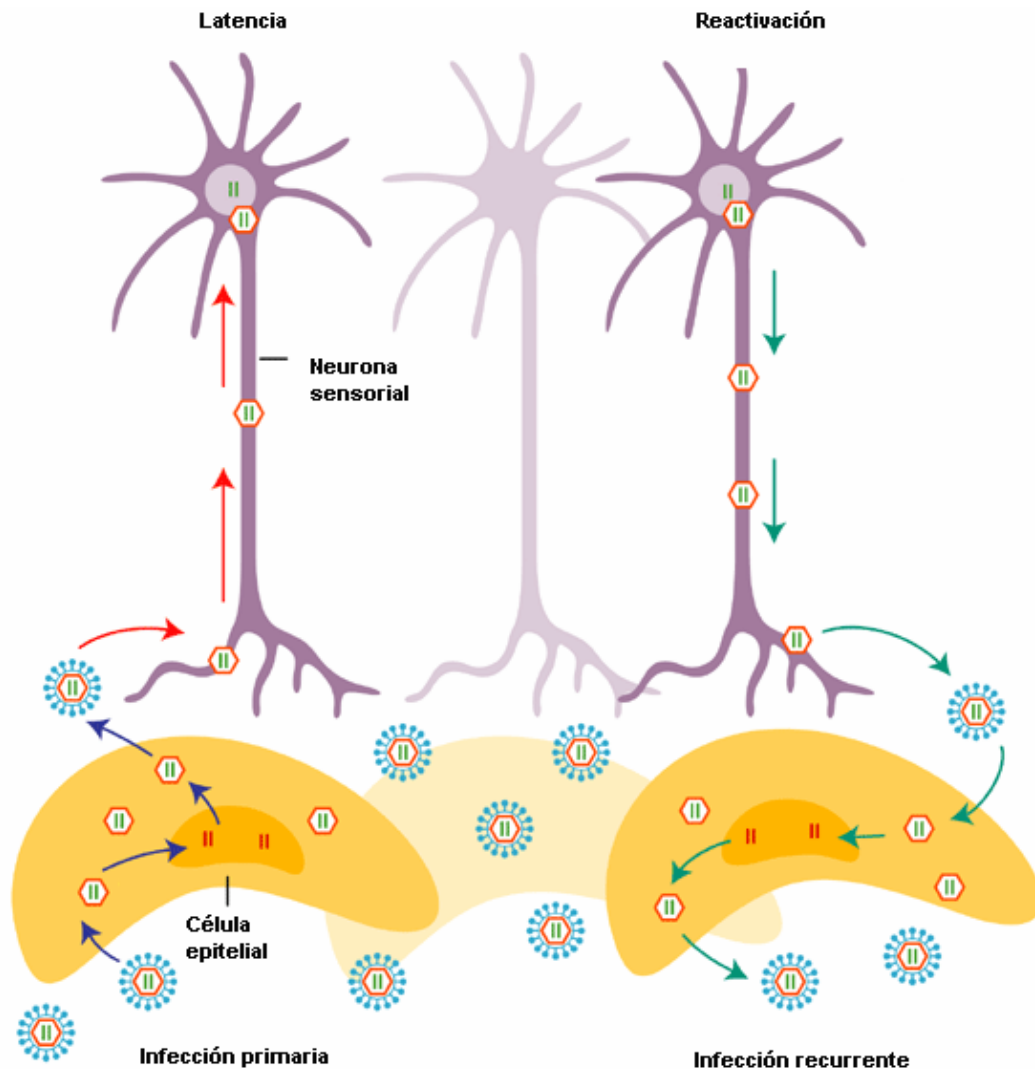


Figura 16. Esquema de latencia y reactivación

### Diferencias con HSV-1

Si bien HSV-1 y HSV-2 son muy similares, presentan algunas diferencias que mencionaremos a continuación.

HSV-1 y HSV-2 están cercanamente relacionados tienen una homología a nivel de ADN del 83% en las regiones que codifican proteínas y algo menor en las regiones no codificantes (Dolan y col., 1998) El mapa genético de los dos HSV es co-lineal y los genomas son de aproximadamente el mismo tamaño, HSV-1 de 152 kpb. y HSV-2 155 kpb. (McGeoch y col., 1988). La menor variación en la secuencia origina diferentes



sitios de corte los cuales han sido ampliamente utilizados como una herramienta epidemiológica importante (Hayward y col., 1975) El contenido de G + C en la secuencia de HSV-1 es del 68%, en cambio para HSV-2 es del 69 %. HSV-2 presenta una tasa de mutación mayor a la de HSV-1 (Sarisky y col, 2001)

Ambos virus difieren en su interacción con heparán sulfato, con respecto a la cantidad de cadenas de heparán sulfato que unen. Por otro lado, la unión de HSV-1 es menos sensible a las preparaciones de heparina O-desulfatada que HSV-2 (Trybala y col., 2000).

Generalmente los casos de encefalitis en humanos son causados por infección con HSV-1 mientras que HSV-2 produce meningitis.

La vía de transmisión es distinta, HSV-1 se transmite principalmente por secreciones orofaríngeas mientras que HSV-2 lo hace por contacto sexual.

Presentan distintos determinantes antigénicos, lo que hace posible diferenciar la producción de anticuerpos y de esta manera hacer estudios epidemiológicos.

### **Importancia médica**

Las infecciones herpéticas en humanos han sido documentadas desde los tiempos de la Grecia antigua, prácticamente el virus herpes y los humanos han evolucionado juntos. Esta co-evolución ha creado virus que están bien adaptados al hospedador humano y al ambiente.

Los datos sobre la prevalencia de herpes genital en el mundo, son extraídos principalmente de los análisis de enfermedades de transmisión sexual tratadas en la clínica y provienen principalmente de Estados Unidos, Inglaterra y Suecia (Beilby y col, 1968; Josey y col., 1972; Nahmias y col, 1973). Esto se debe a que en países en desarrollo no se realizan estudios de seroprevalencia para herpes por tratarse de un virus que si bien produce morbilidad no presenta una tasa alta de mortalidad. Se estima que en USA el número de casos nuevos por año de herpes genital es de aproximadamente 500.000-800.000 (Lycke y col, 1988).

Las infecciones con HSV-2 son adquiridas usualmente mediante contacto sexual aunque una proporción considerable de las infecciones genitales se debe a HSV-1 y son notablemente menos severas. En algunas áreas del mundo la proporción de herpes genital causada por HSV-1 permanece baja (4-20%) (Solomon y col., 2003)

pero en otras está aumentando. Este cambio en la etiología podría deberse a cambios en el comportamiento sexual.

La prevalencia de HSV-2 difiere en distintos países y entre poblaciones sociales y étnicas. (Strutt y col., 2003; Cowan y col., 2003; Suligoj y col., 2004; Roest y col., 2001). En los países en desarrollo puede variar entre el 2 y el 74%. En Costa Rica, Kenia y Méjico más del 40% de las mujeres entre 15 y 19 años están infectadas con HSV-2.

Se ha observado una caída en la prevalencia de HSV en distintos países europeos la cual se cree podría deberse a las mejoras en las condiciones socioeconómicas (Nahmias y col., 1990; Whitley y col., 1994)

HSV-2 puede excretarse en ausencia de síntomas durante la infección primaria o recurrente facilitando así la transmisión del virus. Los factores que tienen influencia sobre la adquisición del virus incluyen género (mayor en mujeres que en hombres) (Tran y col., 2004; Engelberg y col., 2003), raza (más frecuente en afro-americanos que en blancos), estado marital (mayor en divorciados que en solteros o casados) y el lugar de residencia (mayor en la ciudad que en los pueblos). El número de acompañantes sexuales aumenta la probabilidad de adquisición de la infección. (Rawls y Gardner, 1972; Rawls y col, 1971). Estos datos son similares en el caso de los homosexuales (Nahmias y col., 1990).

Las infecciones herpéticas son la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en el mundo y debido a que la infección con HSV-2 es de naturaleza ulcerosa, se la ha relacionado con la adquisición de HIV. Estudios realizados en distintas ciudades de Estados Unidos así como en África demostraron que el índice de riesgo está aumentado de 1,5 a 2 veces, tanto en heterosexuales como en homosexuales (Chen y col., 2000; Holmberg y col., 1988; Hook y col., 1992).

La infección genital herpética en mujeres embarazadas es tan frecuente como en las mujeres no embarazadas de la misma edad, pero estos casos deben ser considerados especialmente por el peligro que corre el feto o el recién nacido. Durante el embarazo, el virus puede diseminarse hacia distintos órganos, llevando en algunos casos a una hepatitis necrotizante, leucopenia, coagulopatía intravascular diseminada y encefalitis (Flewtt y col., 1969; Hillard y col., 1982; Linnemann y col., 1976). La tasa de mortalidad entre mujeres embarazadas infectadas llegaba al 50% en la década del 70

así como también la muerte del feto. Con el avance de la medicina antiviral hoy en día estos casos son controlados sin poner en riesgo la vida de la madre o del recién nacido (Kimberlin y col., 2001). De todas maneras, se pueden producir abortos dependiendo en que momento del embarazo se produce la infección primaria.

### **Tratamiento de las infecciones herpéticas**

Los virus son patógenos intracelulares que dependen de la célula hospedadora para su replicación y supervivencia, por lo tanto es importante que el tratamiento contra el virus sea mínimamente invasivo para las células o los órganos del individuo infectado. Teniendo en cuenta esto se han desarrollado diferentes agentes antivirales que, con mínimos efectos colaterales, interfieren con la entrada del virus a la célula, con su replicación, la síntesis de proteínas y su liberación. Generalmente la terapia antiviral se lleva a cabo sobre virus que replican activamente o sobre enfermedades virales activas. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos o recipientes de transplantes donde el riesgo de infección es alto se puede utilizar al antiviral en forma profiláctica y preventiva.

En el tratamiento estándar de las infecciones herpéticas se ha considerado al aciclovir como la droga de elección debido a su alto poder inhibitorio. El aciclovir es un análogo de la guanosina, actúa a nivel de la polimerasa viral afectando la replicación ya que la cadena de ADN no puede elongarse una vez que éste ha sido incluido. La especificidad se debe a que los análogos de nucleósidos como el ACV deben ser fosforilados previamente y esta fosforilación es más eficiente por la timidina quinasa de HSV que por las quinasas celulares. Sin embargo, el aciclovir presenta una baja biodisponibilidad oral y corta vida media intracelular, lo que ocasiona problemas terapéuticos en pacientes con infecciones generalizadas o infecciones del SNC. Para superar estos inconvenientes se han diseñado derivados del aciclovir como el famciclovir, el valaciclovir y otros (Abdel-Haq y col, 2006). Si bien los problemas de biodisponibilidad se han solucionado, la acción terapéutica de estos análogos de nucleósidos está limitada por la aparición de mutaciones en los genes virales de las enzimas timidina quinasa y/o polimerasa (Alrabiah y Sacks, 1996). En estos casos la droga no es activa, por lo tanto es necesario encontrar compuestos terapéuticos con distinto mecanismo de acción.

Una de las estrategias utilizadas como profilaxis contra HSV-2 es el uso de microbicidas tópicos para bloquear la unión o prevenir la transmisión viral (Zeitlin y Whaley, 2002). Sin embargo, los microbicidas requieren de un alto acatamiento de los pacientes y pueden tener efectos anticonceptivos no deseados, además pueden ser tóxicos o proinflamatorios y su uso frecuente puede producir llagas en el epitelio vaginal aumentando el riesgo de transmisión de HIV (Van Damme y col, 2002).

La prevención ideal contra la infección con herpes sería una vacuna que genere inmunidad adaptativa específica contra HSV-2. Mientras los estudios preclínicos de vacunación contra HSV-2 fueron esperanzadores, los resultados de los ensayos de la vacuna realizados en humanos han sido decepcionantes debido a que los anticuerpos neutralizantes no proveen protección (Stanberry y col, 2002).

Una alternativa para el tratamiento de la infección herpética crónica puede ser el uso de inmunomoduladores aplicados directamente en el sitio de infección. Esta aplicación puede provocar la respuesta inmune innata para proveer el control inmediato de la replicación viral, o también la inducción de la respuesta inmune adaptativa si el antígeno viral está presente ayudando al control de las reactivaciones subsecuentes y proveyendo un control de largo término. En medicina dermatológica y genitourinaria se ha introducido un nuevo compuesto sintético de bajo peso molecular denominado Imiquimoid, el cual es un modulador de la respuesta inmune de uso tópico. Este compuesto activa las células del sistema inmune y estimula la liberación de citoquinas y quemoquinas que refuerzan la respuesta inmune antiviral (McCluskie y col., 2006). Si bien la aplicación tópica de Imiquimoid fue efectiva en algunos casos con lesiones herpéticas, su uso es controvertido. De todas maneras es importante aclarar que este tipo novedoso de antiviral se utiliza en la clínica médica para el tratamiento de lesiones producidas por HPV (Tyring y col, 1998).

### **Acción de Meliacina sobre herpes**

En cuanto a la acción de meliacina contra la infección producida por el virus herpes, se encontró que ni la adsorción ni la penetración del virus de la pseudorrabia están afectadas en su presencia, con lo cual la inhibición debería producirse en un paso posterior (Descalzo y col., 1989). Por otro lado, en cultivos de células Vero infectados con HSV-1 el tratamiento con MA inhibe la síntesis de determinadas

proteínas tardías que participan en la replicación del genoma y en el ensamblaje de la partícula viral (Villamil y col., 1995). Se ha comprobado que tanto la síntesis de ADN como la propagación viral están afectadas por meliacina ya que estudios de microscopía electrónica revelaron una gran acumulación de partículas virales en el citoplasma de células tratadas y una menor proporción de partículas maduras incluidas en vesículas citoplasmáticas. Este hecho contrasta con lo observado en las células sin tratar, donde hay partículas desnudas en el núcleo y se observan partículas maduras en el espacio intercelular (Alché y col., 2002). Por otro lado, MA es capaz de potenciar la acción anti-herpética producida por el aciclovir y el foscarnet. La combinación de MA con estas drogas inhibe la replicación de una cepa HSV-1 salvaje tanto como la de una cepa TK<sup>-</sup>, sugiriendo que el mecanismo de acción de meliacina difiere del de los dos antivirales ensayados (Barquero y col., 1997 a y b).

Se obtuvieron resultados alentadores al administrar MA por vía i.p. en el modelo de infección intra-cerebral con HSV-1, pero dada la rapidez con que se enfermaban los animales, se decidió infectar por vía i.p. En este caso los resultados no fueron los esperados, ya que los animales infectados y tratados con MA i.p. presentaron un período de incubación menor y una muerte más rápida que los controles (Claus y col., 1998). Por el contrario, la administración tópica de MA en el modelo de queratitis herpética estromal en ratones adultos infectados con HSV-1, redujo la multiplicación del virus en el ojo y disminuyó significativamente la aparición de los síntomas de la enfermedad (Alché y col., 2000; Pifarré y col. 2002)

### **Modelo animal**

A pesar de que los ensayos en cultivos de tejido son valiosos para determinar la actividad de un compuesto contra un virus determinado, no pueden utilizarse como indicadores de la respuesta en humanos, para ello se utilizan los modelos animales. Si bien la mayoría de las infecciones en estos modelos no son idénticas a las enfermedades del humano, se puede demostrar que un compuesto tiene actividad en un sistema *in vivo*, teniendo en cuenta su actividad antiviral, distribución en tejidos, toxicidad, así como también la respuesta del huésped a la infección y la interacción entre su respuesta inmune y el agente terapéutico.

Se ha establecido un modelo de infección herpética genital en ratones en el cual el grado de patogenia desarrollado depende de la cepa de virus utilizada (Walz y col., 1977; Richards y col., 1981; Smee y col., 1983). Generalmente la infección experimental por la ruta intra-vaginal produce enrojecimiento, inflamación y ulceración del área genital, seguida de parálisis en las patas traseras, terminando con la muerte del animal debido a enfermedad neurológica.

Las grandes diferencias entre la infección en humanos y el modelo en ratones es que durante la infección en humanos, el cuadro viral incluye lesiones epiteliales primarias y recurrentes y a pesar de que HSV-2 puede encontrarse latente en los ganglios sensoriales, la infección sintomática del SNC es inusual. En adultos, la infección está asociada generalmente con meningitis aséptica (Sclesinger y col., 1995) la cual puede ser recurrente; en casos de infección peri-natal o en individuos inmunocomprometidos la encefalitis puede ser significativa. En cambio, en los ratones las lesiones no son recurrentes y el punto final de la infección con HSV-2 es la destrucción del tejido del sistema nervioso central y en la mayoría de los casos esta destrucción está relacionada con la multiplicación del virus en este tejido y su efecto citopático. Si bien en humanos esta replicación no es tan marcada, utilizando un modelo animal se puede calcular la virulencia en términos de la cantidad de virus necesaria para alcanzar un nivel determinado de mortalidad (se calcula el 50% o el 90% de muerte entre los animales inoculados). Otro atributo de la virulencia es la invasión, la facilidad de alcanzar un órgano blanco desde el portal de entrada, ya que para diseminarse al órgano blanco el virus necesita multiplicar en sitios periféricos. En los sistemas experimentales de infección herpética genital, la virulencia está compuesta por: multiplicación periférica, invasión del SNC y crecimiento en el SNC.

La patología de la infección herpética es mayormente causada por el efecto citopático directo del virus, que resulta en la lisis celular y en la aparición de focos necróticos en el área infectada (Boddingius y col., 1987). En tejidos que pueden regenerarse, las lesiones no destruyen totalmente el órgano durante la infección, en el cerebro donde la capacidad de regeneración es muy poca, la necrosis inducida por la infección viral puede llevar a secuelas que duran toda la vida (Kimberlin y col., 2004). Existe un delicado balance entre la patología producida directamente por HSV y la

inmunopatología inducida por las reacciones inmunes contra el virus y los efectos colaterales tanto tóxicos como funcionales de éstas.(Skoldenberg y col., 1996)

### **Macrófagos y citoquinas en la defensa contra herpes simplex**

Las interacciones virus-huésped son cruciales para el resultado de la infección, los virus utilizan distintas estrategias para esquivar los obstáculos que le presenta el hospedador. Para que el virus tenga éxito, estas estrategias evasivas deben estar balanceadas con la patología inducida y las posibilidades de transmisión a nuevos individuos susceptibles. Los mamíferos utilizan mecanismos de defensa antivirales ubicuos y redundantes. Esta redundancia asegura que otro sistema esté listo para funcionar en caso de que uno de ellos falle. El resultado final de una infección viral depende de la regulación delicada y de la coordinación temporal de esos mecanismos antivirales en respuesta al virus invasor.

El control de la replicación y la diseminación viral durante los primeros días de una infección con HSV parece ser vital para el resultado final. Los mecanismos involucrados en la defensa natural han sido analizados intensamente y parecen demostrar que la actividad antiviral de los macrófagos junto a las células *natural killer* y al sistema interferón juega un rol importante en la resistencia a la infección.

Los macrófagos son miembros del sistema de los fagocitos mononucleares, el cual fue definido como una familia de células que comprende los progenitores provenientes de la médula ósea, monocitos de la sangre y macrófagos de tejidos (van Furth y col., 1968). Los macrófagos se originan en la médula ósea a partir de promonocitos que se convierten en monocitos que entran al torrente sanguíneo. Luego de estar en circulación los monocitos sanguíneos migran a los tejidos donde se diferencian en macrófagos con características determinadas por el tejido en cuestión. Los macrófagos están representados por las células de Kupffer en el hígado, macrófagos alveolares e intersticiales en los pulmones, macrófagos del nódulo linfático sinusoidal y esplénico, microglía en el cerebro, osteoclastos en huesos y células de Langerhans en la piel. Los macrófagos de distintos tejidos tienen distintas características y distintas capacidades funcionales.

Las células NK son linfocitos que derivan de precursores de la médula ósea, lisan células infectadas con virus y secretan citoquinas, mayormente IFN- $\gamma$ . La

activación de NK está regulada por el balance entre señales generadas por receptores activadores y receptores inhibidores. Son activadas por células recubiertas de anticuerpos, células infectadas por virus o bacterias intracelulares o células que no presentan moléculas de MHC I. Además, las NK son estimuladas por las citoquinas IL-15 e IL-12.

Una de las características de los macrófagos y las células NK es que son la principal fuente de citoquinas.

Las citoquinas sirven para comunicar la información entre las células inflamatorias y entre éstas y las células del tejido respondedor, tales como las células endoteliales vasculares. Las citoquinas involucradas en la inmunidad innata pueden actuar: controlando la infección viral (IFN- $\alpha/\beta$ ), mediando la inflamación local (IL-1, TNF- $\alpha$  y quemoquinas); estimulando la proliferación y actividad de NK (IL-15 e IL-12); activando macrófagos (especialmente IFN- $\gamma$  derivado de NK) y limitando la inflamación local (especialmente IL-10 y TGF- $\beta$ ), además algunas citoquinas como IL-6 actúan incrementando la producción de neutrófilos en la médula ósea.

### **Interferones (IFN)**

Los interferones fueron las primeras citoquinas descritas en detalle y deben su nombre al hecho de que estaban involucrados en la interferencia producida por un virus sobre la replicación de otro virus no relacionado. Están divididos en grupos, los dos grupos originales se denominan tipo I o IFN no inmune y tipo II o IFN inmune. Los IFN de tipo I pueden ser producidos por algunos tipos celulares en respuesta a estímulos que no son específicos, en cambio el IFN- $\gamma$  (tipo II) es producido en grandes cantidades como parte específica de una reacción inmune.

Los IFN de tipo I son un grupo diverso de citoquinas formado por el IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\xi$ /limitina. (Pestka y col., 2004; Oritani y Tomiyama, 2004) Los cinco primeros se expresan en humanos y su producción depende del estímulo y del tipo celular en cuestión. A diferencia del IFN- $\beta$  que consiste en una única especie, la familia del IFN- $\alpha$  está formada por múltiples especies, aunque se desconoce aún cual es su importancia funcional. (van PV y col., 2004)

Los IFN- $\alpha$  y  $\beta$  tienen un peso molecular de 19-26 kDa y la mayoría de las especies son estables a pH 2. Todos los interferones de tipo I se unen a un receptor



común compuesto por dos subunidades, IFN- $\alpha$  R1 e IFN- $\alpha$  R2. El receptor de IFN- $\alpha/\beta$  (IFNAR) está acoplado a la cascada de señal de JAK/STAT.

Generalmente los IFN de tipo I exhiben un amplio rango de efectos biológicos tales como actividad antiviral y anti-proliferativa, estimulación de células inmunes como las células T, células NK, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Además aumentan la expresión de MHC I, activan los genes pro-apoptóticos e inhiben los mecanismos anti-apoptóticos, modulan la diferenciación celular e inhiben la angiogénesis (Pestka y col., 2004). El IFN- $\xi$ , descubierto recientemente, interactúa con el receptor de IFN- $\alpha/\beta$  mostrando actividad antiviral contra distintos virus entre los que se encuentra HSV, además de efectos inmunomoduladores y antitumorales.

El tipo II de IFN está representado por un único miembro, el IFN- $\gamma$ . Estructuralmente, el IFN- $\gamma$  es diferente de los interferones de tipo I y genera otras señales uniéndose a distintos receptores. Es expresado por tipos celulares como células T, NK, macrófagos, células B y células presentadoras de antígeno (Bancroft y col., 1987). La inducción y producción de IFN- $\gamma$  en células presentadoras de antígeno y en NK parece ser vital para la respuesta inespecífica a las infecciones. Esta producción es inducida por citoquinas, especialmente IL-12, en forma sinérgica con otras citoquinas pro-inflamatorias mayormente producidas por fagocitos mononucleares.

El receptor de IFN- $\gamma$  (IFNGR) está compuesto por dos sub-unidades, IFN- $\gamma$  R1 e IFN- $\gamma$  R2. Al igual que el receptor de IFN- $\alpha/\beta$ , el IFNGR está acoplado a la cascada de señal JAK/STAT induciendo la producción de factores de transcripción, entre ellos los factores reguladores de IFN (IRFs) que participan en la regulación de la respuesta celular producida por IFN- $\gamma$  (Taniguchi y col., 2001; Ramana y col., 2002; Braunstein y col., 2003).

El efecto más importante ejercido por el IFN- $\gamma$ , además de su marcada actividad antiviral, parece ser el de activar los macrófagos, las células presentadoras de antígeno y las NK, también produce la inhibición de la respuesta T *helper* de tipo 2 (Th2)

Además de los dos grupos tradicionales de IFN, se ha descubierto un tercer grupo formado por distintas especies a las cuales se ha denominado IL-28A (IFN- $\lambda$ 2),

IL-28B (IFN- $\lambda$ 3) e IL-29 (IFN- $\lambda$ 1) (Pestka y col, 2004). Estas citoquinas son proteínas con efectos antivirales similares a los IFN de tipo I.

### **Factor de necrosis tumoral (TNF)**

El factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la linfotoxina (TNF- $\beta$ ) son prototipos de ligandos de la superfamilia de receptores de TNF (TNFSF2). Estos factores son sintetizados como una pro-proteína de transmembrana de 26 kDa, primeramente localizada en las membranas del aparato de Golgi, para luego ser escindidas por una metaloproteasa que libera la porción extracelular de la molécula. El TNF es producido por la mayoría de los tipos celulares de origen inmune, mayormente por fagocitos mononucleares, neutrófilos, células T y NK y tiene diversos efectos sobre los diferentes tipos celulares. Tanto el TNF unido a membrana como el soluble interactúan con dos tipos diferentes de receptores, el p55TNFR1 y el p75TNFR2. El TNFR1 está involucrado en el camino pro-apoptótico, como la mayoría de los receptores de esta familia, y es expresado en todos los tipos celulares excepto en los eritrocitos. En cambio, el TNFR2 es mayormente expresado en células endoteliales y en células derivadas de la médula ósea. Este receptor activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B mediante la degradación de su inhibidor I $\kappa$ B regulada por proteínas quinasa (IKK), permitiendo de esta manera la translocación del factor al núcleo donde induce la expresión, entre otros genes, de los correspondientes a citoquinas proinflamatorias (Figura 17). El TNFR1, además de producir apoptosis, activa al NF- $\kappa$ B que actúa en el camino pro-inflamatorio (Cao y col, 2006). Por lo tanto la cascada de señal producida por la familia de receptores de TNF induce a un balance delicado entre la vida y la muerte celular. Por otro lado, ambos receptores pueden sufrir una ruptura proteolítica que los solubiliza y les confiere la capacidad de competir con sus mismos receptores anclados en la membrana. (Moller y col., 1996).

La superfamilia del TNF- $\alpha$  parece haber evolucionado en los vertebrados con el sistema inmune y es crucial para el desarrollo embrionario del tejido linfoide. Además, el TNF- $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria involucrada en la activación de muchas células inmunes y es un factor importante tanto en la respuesta inmune específica como en la inespecífica. Su importancia en la defensa antiviral se destaca por el hecho

de que diferentes virus presentan mecanismos para interferir con casi todos los pasos de este sistema (Herbein y O'Brien, 2000).

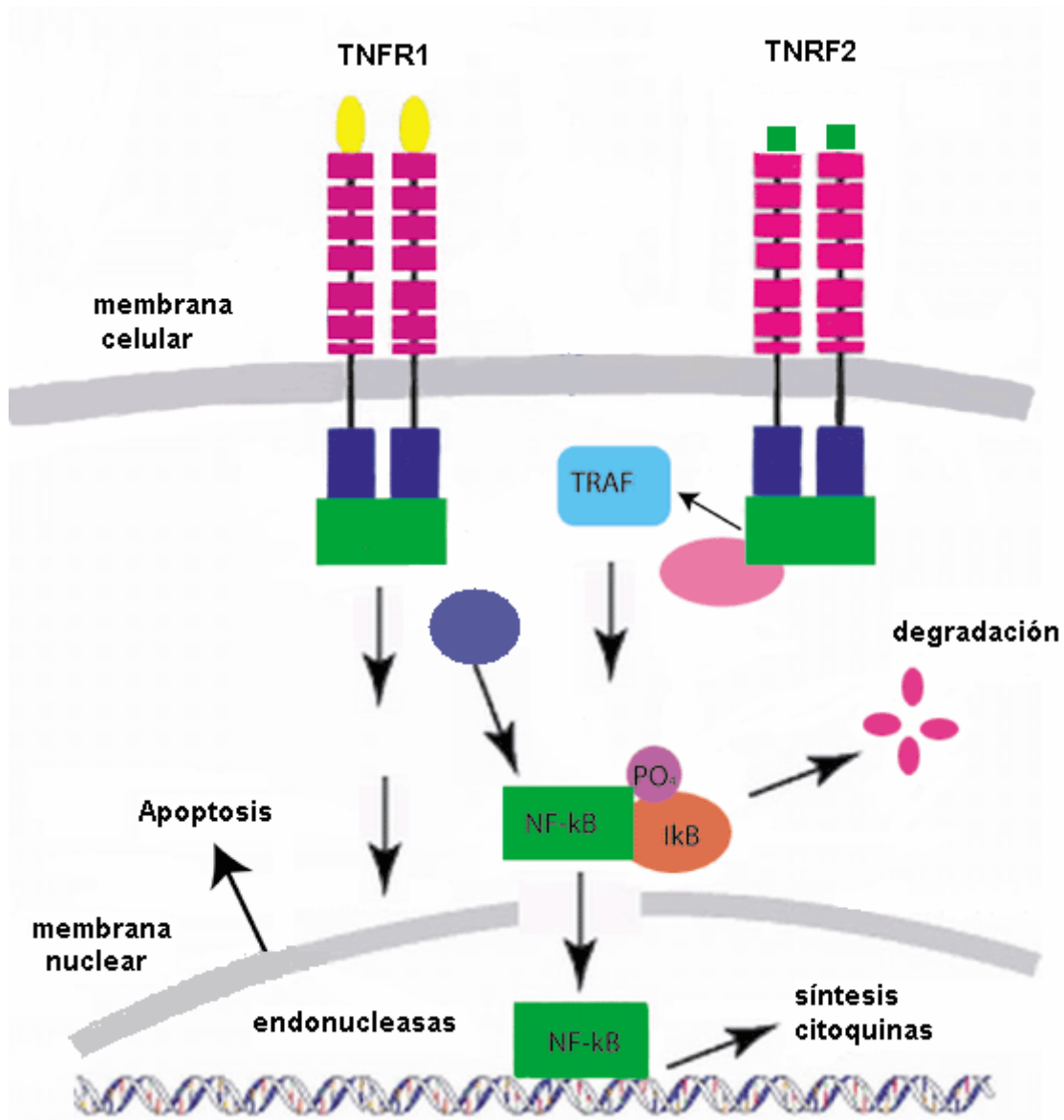


Figura 17. Esquema simplificado de las vías de inducción de apoptosis y translocación del factor de transcripción NF-κB producidas por TNF-α.

### Interleuquina 6 (IL-6)

La interleuquina 6 es una glicoproteína de entre 21 y 30 kDa, funciona tanto en la respuesta innata como en la adaptativa. Es sintetizada por los fagocitos mononucleares, células endoteliales, células T activadas y fibroblastos en respuesta a microorganismos y a otras citoquinas especialmente IL-1 y TNF. La forma funcional de la interleuquina es un homodímero con cada subunidad formando un dominio globular

alfa hélice. El receptor para IL-6 pertenece a los receptores de citoquinas de tipo I, se denomina receptor de IL-6  $\alpha$  (IL-6R $\alpha$ ) y activa el camino de señal JAK/STAT.

En la inmunidad innata, la IL-6 estimula la síntesis de las proteínas de la fase aguda en los hepatocitos contribuyendo a los efectos sistémicos de la inflamación, lo que comúnmente se denomina respuesta de fase aguda.

### **Interleuquina 10 (IL-10)**

La interleuquina 10 está formada por 4 dominios globulares  $\alpha$ -hélice y se une a los receptores de citoquinas de tipo II. Es producida mayormente por los macrófagos aunque los linfocitos también la secretan. Los efectos biológicos de la IL-10 resultan de su habilidad para inhibir la mayoría de las funciones de los macrófagos activados permitiendo que el sistema vuelva a su estado de reposo. Por este motivo, la IL-10 es un muy buen ejemplo de un regulador negativo. Uno de los efectos de esta interleuquina es inhibir la producción de IL-12 y TNF- $\alpha$ . Como la IL-12 induce la secreción de IFN- $\gamma$ , la IL-10 inhibe indirectamente la producción de IFN- $\gamma$ . Por otro lado, la IL-10 produce la inactivación de las células T y termina las reacciones inmunes mediadas por células mediante la inducción de apoptosis (Bailey y col, 2006). Se ha comprobado que ratones *knockout* para el gen de la IL-10 presentan inflamaciones excesivas.

### **Interleuquina 12 (IL-12)**

La interleuquina 12 (IL-12) es el principal miembro de un grupo pequeño de citoquinas heterodiméricas que tienen la capacidad de inducir la producción de IFN- $\gamma$  en distintos tipos celulares. Esta citoquina está compuesta por una subunidad p40 y otra p35 unidas covalentemente (Kobayashi y col., 1989). La subunidad p35 tiene homología con la IL-6 y p40 es homóloga al dominio extracelular de la familia del receptor de hematopoyetina. Estas subunidades están codificadas por diferentes genes que deben ser inducidos coordinadamente para la secreción del heterodímero IL-12 p70 con actividad biológica. La IL-12 es producida por monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células B (D'Andrea y col., 1992). A pesar de que en estudios *in vivo* la respuesta inicial a la producción de IL-12 está dada principalmente por las células dendríticas, se ha observado que en cultivos de macrófagos infectados con

HSV-2 *in vitro*, hay producción de IL-12 p40 mediante la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Malmgaard y col., 2000). El receptor de IL-12 se encuentra en las células NK, células T y células dendríticas, está formado por dos subunidades ( $\beta$ 1 y  $\beta$ 2) y sigue el camino de señal de JAK/STAT. El efecto primario de la IL-12 es inducir la producción de IFN- $\gamma$  en células NK y en células T. Luego, los macrófagos y las células NK son estimulados por el IFN- $\gamma$  lo que resulta en un aumento considerable de la capacidad microbicida (Leist y col., 1988). La IL-12 y el IFN- $\gamma$  conjuntamente son los responsables de activar la respuesta Th1 e inhibir la respuesta Th2. El IFN- $\gamma$  inducido por la IL-12 produce un ciclo de retroalimentación positiva, en el cual el IFN- $\gamma$  a su vez induce la producción de IL-12.

Las citoquinas que poseen actividad anti-inflamatoria como la IL-10 inhiben la producción acelerada y potencialmente peligrosa del IFN- $\gamma$ . Una acción regulatoria muy importante en la restricción de los daños inducidos por los mecanismos de defensa descontrolados, es la fagocitosis de las células apoptóticas llevada a cabo por los macrófagos que inhibe la producción de IL-12 (Kim y col., 2004).

### **Óxido nítrico (NO)**

El óxido nítrico es un radical libre gaseoso que actúa como mediador de funciones fisiológicas vitales, entre ellas la defensa del hospedador a las infecciones microbianas o virales. El NO es producido mediante la conversión enzimática de la L-arginina a L-citrulina catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). En células de mamíferos se han identificado tres tipos de NOS, mientras los tipos I y III están presentes constitutivamente en las células, el tipo II es expresado únicamente luego de la exposición a estimulantes específicos tales como citoquinas, LPS e ionóforos de calcio. Esta enzima es la llamada óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que en los macrófagos se expresa en respuesta a LPS e IFN- $\gamma$ . Ambos inductores aumentan la producción de NO induciendo factores de transcripción que activan el promotor de iNOS, el LPS activa al NF- $\kappa$ B y el IFN- $\gamma$  actúa a través del mecanismo dependiente del factor regulatorio de interferón (IRF-1). Una vez expresada, iNOS genera grandes cantidades de NO que es conocido como un mediador importante de las inflamaciones crónicas y agudas. Las fuentes celulares productoras de NO mejor caracterizadas son las neuronas, las células endoteliales y los macrófagos.

### **Acción contra herpes mediada por macrófagos**

En el caso de las infecciones con HSV, la respuesta natural está dada principalmente por la producción de diferentes citoquinas entre las cuales se encuentran: la IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha/\beta$  y el IFN- $\gamma$  (Ellerman-Eriksen, 1993; Ghanekar y col., 1996, Walev y col., 1995).

El sistema IFN es fundamental en la respuesta contra el virus, ya que inhibe la replicación viral, protege a las células vecinas de la infección secundaria y estimula al sistema inmune activando las células NK, los macrófagos y los linfocitos. A pesar de que las células infectadas producen una mezcla de IFN característicos del tipo celular, generalmente los fibroblastos y las células endoteliales sintetizan IFN- $\beta$ , mientras que los leucocitos, los macrófagos y las células dendríticas expresan IFN- $\alpha$ . La regulación de la inducción de los IFN  $\alpha/\beta$  está dada en parte por la activación de los factores de transcripción IRF-3 e IRF-7, los cuales son inducidos a su vez por IFN  $\alpha/\beta$  con lo cual se genera una retroalimentación positiva (Dai y col., 2004; Steward y col., 1972). Otro factor de transcripción involucrado es el NF- $\kappa$ B, cuyo inductor es el TNF producido por los macrófagos, éste es otro camino de inducción de IFN  $\alpha/\beta$  que no está regulado por sí mismo (Ellermann-Eriksen, 1993; Paludan y col., 1998; Paludan y Mogensen, 2001).

Durante la infección con HSV los macrófagos son activados incrementándose de esta manera su potencial antiviral. La actividad antiviral de los macrófagos se ha descrito como intrínseca o extrínseca. Los macrófagos en reposo poseen un alto grado de actividad intrínseca contra HSV, generalmente siendo no permisivos a la replicación viral, con lo cual pueden proteger a otras células de la infección. La actividad antiviral extrínseca se refiere a la habilidad del macrófago de inactivar al virus fuera de sí mismo o la de inhibir su replicación en otras células (Morahan y col., 1980).

Tanto la producción de IFN  $\alpha/\beta$  como la de TNF tienen lugar durante las primeras 6 a 12 horas de la infección herpética, un poco más tarde son producidas otras citoquinas como la IL-12, IL-18 y el IFN- $\gamma$ . El efecto directo sobre la replicación de HSV producido por el IFN- $\alpha/\beta$ , se ve incrementado en forma sinérgica con el IFN- $\gamma$  (Sainz y Halford, 2002). También se ha observado que hay sinergismo sobre la replicación de HSV entre el IFN- $\gamma$  y el TNF a través de la producción de IFN- $\beta$  (Feduchi y Carrasco, 1991).

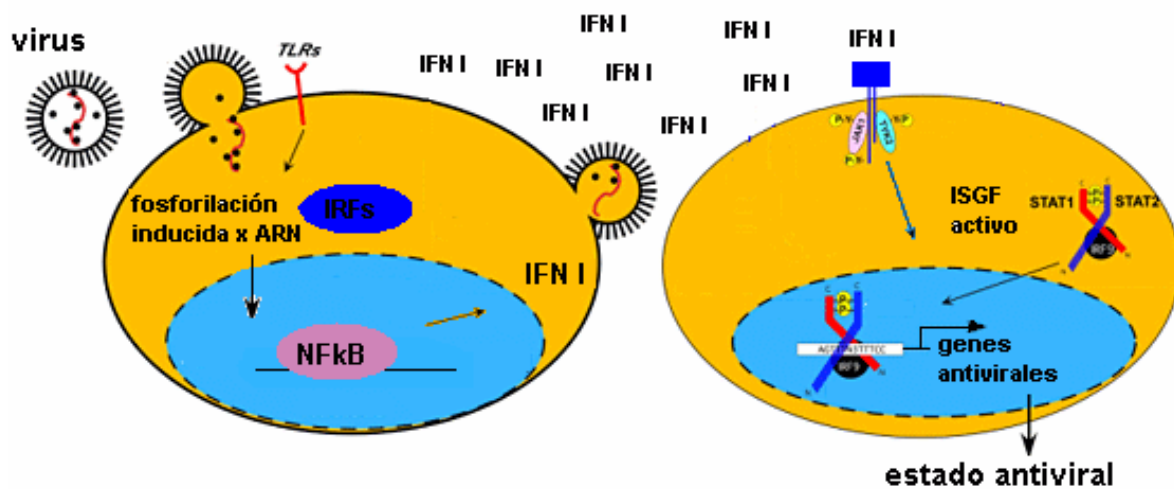


Figura 18. Esquema de la inducción del estado antiviral producido por los IFN de tipo I. La célula de la izquierda es infectada por un virus, cuyo ARN induce la fosforilación de proteínas que llevan a la inducción del factor de transcripción NF- $\kappa$ B con la concomitante expresión de IFN. El IFN es excretado de la célula y actúa sobre las células vecinas activando la expresión de genes antivirales, de esta manera logra producir el estado antiviral.

Las células NK y NKT productoras de IFN- $\gamma$ , así como la IL-15 y el factor de transcripción T-bet, que son cruciales para la diferenciación y la función de estos tipos celulares, parecen ser decisivos para el control temprano de la infección herpética (Gill y col, 2005; Ashkar y Rosenthal, 2003; Svensson y col., 2005).

La infección con HSV lleva también a la producción de otras citoquinas a través de distintos mecanismos con cinéticas más lentas, por ejemplo la producción de IL-6 e IL-12 (Kanangat y col., 1996; Malmgaard y col., 2000) aunque no se sabe aún cual es el componente viral involucrado. Luego de 8 a 12 horas de comenzada la infección, los macrófagos y otras células inflamatorias reaccionan al HSV produciendo IL-12. La transcripción del gen de IL-12 requiere síntesis *de novo*, es por eso que tarda tanto en producirse, y utiliza el sistema de señal del NF- $\kappa$ B (Malmgaard y col, 2000). El TNF inhibe la producción de la IL-12 y ésta, estimula la expresión del TNF- $\alpha$  lo que sugiere que el TNF estaría participando en la retroalimentación negativa de la regulación de la IL-12 (Hodge y col., 1998). Por otro lado, se ha comprobado que el IFN  $\alpha/\beta$  también inhibe la producción de IL-12. Por otro lado, la inducción de IL-12 se ve influenciada por el IFN- $\gamma$ , el cual activa su transcripción mediante la unión de los sitios IRF-1, 2 y 8 a la región promotora de la citoquina. El IFN- $\gamma$  es producido como parte de la respuesta

inespecífica al HSV y se ha demostrado que hay un marcado sinergismo entre el virus y esta citoquina en la inducción de IL-12 (Figura 19).

Durante la infección con HSV, la producción de IFN- $\gamma$  es inducida por la acción concertada de muchos factores. En células NK, el IFN- $\alpha/\beta$  es un inductor débil, pero tiene un efecto sinérgico con la IL-12. En macrófagos peritoneales, la cooperación de la IL-12, el IFN- $\alpha/\beta$  y la IL-18 causa la inducción eficiente del IFN- $\gamma$  (Malmgaard y Paludan, 2003). Además de estos factores, se ha determinado que el TNF- $\alpha$  y la IL-1 actúan de manera sinérgica en la inducción del IFN- $\gamma$  y viceversa, el IFN- $\gamma$  sinergiza con el HSV induciendo la producción de TNF- $\alpha$  (Paludan y col., 1998).

La infección de células peritoneales (macrófagos, linfocitos, células NK, etc) con HSV induce a la enzima iNOS con la consecuente producción de NO. En los macrófagos hay un marcado sinergismo entre el HSV y el IFN- $\gamma$  en la producción de NO que parece ser mediado por la secreción autócrina de TNF- $\alpha$  (Paludan y col., 1998). La producción de esta sustancia relativamente tóxica forma parte de la segunda etapa del mecanismo de defensa innato, y al ser una reacción lenta no puede medirse antes de las 18 horas p.i. La producción retardada de NO y el requerimiento de dos o más señales para la inducción de iNOS son lógicas considerando la toxicidad del NO y las consecuencias potencialmente dañinas para el huésped. En macrófagos infectados con HSV y expuestos a IFN- $\gamma$ , la expresión de iNOS es inducida a través de la activación del NF- $\kappa$ B producida por el TNF- $\alpha$  (Paludan y col, 1998).

La ausencia de NO en animales infectados produce un aumento en el título viral así como un incremento en las respuestas inflamatorias, síntomas de infección y mortalidad (Gamba y col, 2004). Los efectos de NO sobre la infección herpética parecen oscilar entre el efecto antiviral y el efecto tóxico, el resultado final depende de la regulación del tiempo, de la dosis infecciosa y del tejido involucrado. El NO producido en la fase temprana de la infección es uno de los mecanismos efectores de la respuesta inmune innata que inhibe la replicación viral. Sin embargo, se ha comprobado que altas concentraciones de NO causan daños en el ADN, en proteínas, lípidos y en algunos tejidos pudiendo ser deletéreas para el huésped. La regulación negativa de la inducción del gen de iNOS está dada por la IL-4 y la IL-13 (Paludan y col., 1997). La producción de la IL-4 en la infección con HSV aparece luego del día 2



p.i. y se incrementa en los siguientes días, de esta manera se regula la producción del NO.

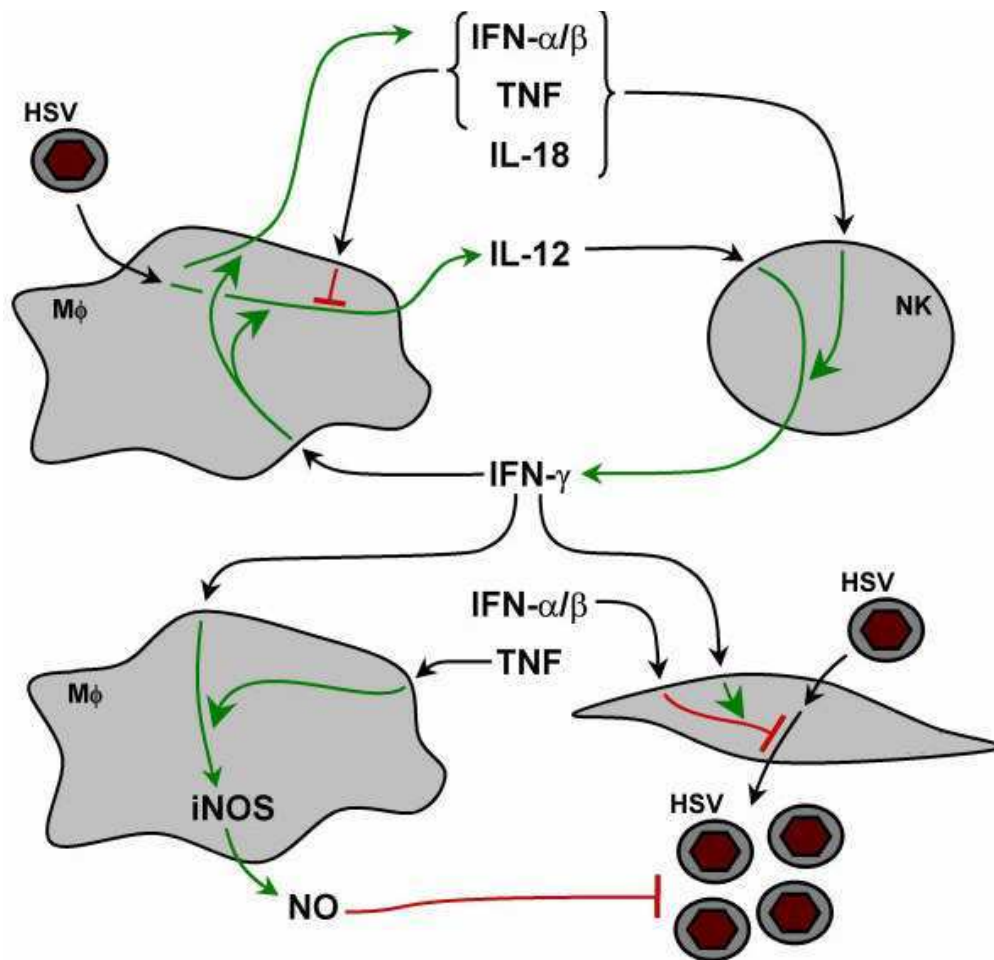


Figura 19. Acción de macrófagos (M $\phi$ ), NK y células estromales sobre la producción de citoquinas en respuesta a la infección con HSV. Las vías estimulatorias están señaladas con flechas verdes, las inhibitorias con rojo. (Ellermann-Eriksen, 2005)

## Otras funciones de los macrófagos

### Mecanismos de degradación

Los macrófagos ingieren microorganismos en vesículas donde son destruidos. Los lisosomas de estas células se fusionan con los fagosomas donde las enzimas proteolíticas ácidas se ponen en contacto con los microorganismos y los degradan (Figura 20).

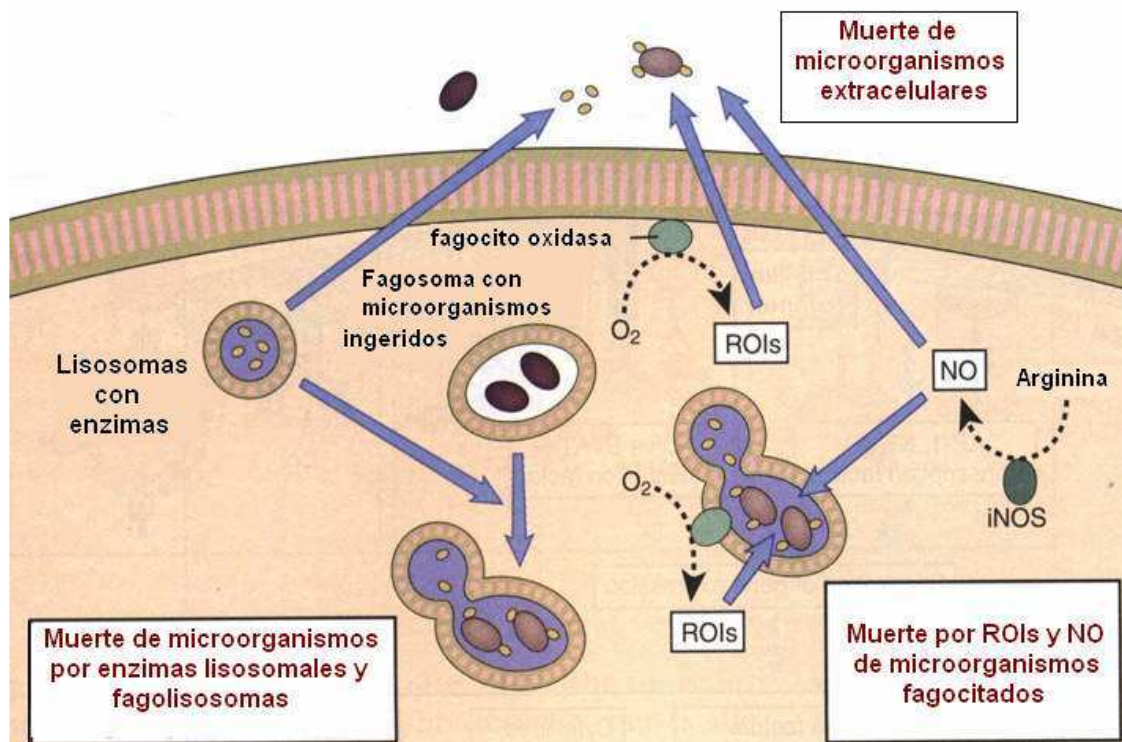


Figura 20. Mecanismos de degradación utilizados por los macrófagos para destruir los microorganismos

Otro mecanismo de degradación es la conversión catalítica del oxígeno molecular a radicales libres que son agentes altamente oxidantes que destruyen los microorganismos. La enzima fagocito oxidasa reduce el oxígeno molecular a intermediarios de oxígeno reactivo (ROI) tales como radicales superóxido. Este proceso es el denominado estallido respiratorio. Cuando los neutrófilos y los macrófagos son fuertemente activados pueden injuriar el tejido normal por la liberación de ROI, NO y enzimas lisosomales.

### Respuesta de los macrófagos al LPS bacteriano.

El LPS bacteriano se une a un receptor del macrófago y además de estimular la respuesta anti-microbiana estimula la producción de citoquinas. El sistema sensor de LPS consta de tres partes: una proteína plasmática llamada proteína de unión a LPS (LBP), un receptor de la superficie celular llamado CD14 y una subunidad traductora de la señal llamada TLR4 (Figura 21).

El LPS se une a LBP y luego es unido a CD14 en la superficie del macrófago, la señal es disparada por el receptor TLR, se activan quinasas citoplasmáticas las cuales llevan a la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B. Estos factores de

transcripción activan genes que codifican para citoquinas y enzimas del estallido respiratorio. Los macrófagos activados por el LPS producen TNF- $\alpha$  que es el mediador de la injuria producida por LPS. La interleuquina 12 (IL-12) y el IFN- $\gamma$  contribuyen a la injuria porque la IL-12 estimula a las NK y a las células T a producir IFN- $\gamma$  y éste aumenta la secreción de TNF- $\alpha$  en los macrófagos activados por LPS.

### **Vías de activación del factor NF- $\kappa$ B**

Se han descrito dos caminos de señal del NF- $\kappa$ B distintos y evolutivamente conservados, que difieren principalmente en el complejo de proteínas quinasa que regulan la degradación de las proteínas I $\kappa$ B. Son los denominados caminos de señal canónico (natural) y no canónico, ambos juegan roles importantes en el funcionamiento del sistema inmune, y sus roles son sorprendentemente distintos. Mientras el camino canónico es responsable de la regulación de la inflamación y del control de la proliferación y la apoptosis de las células linfoides durante la respuesta inmune, la vía no canónica está asociada con el desarrollo de órganos linfoides (organogénesis) que aseguren el montaje de una respuesta inmune efectiva. Estas vías tienen características funcionales distintas, la canónica es de acción rápida responde en minutos y es reversible debido a factores de regulación negativa; mientras que la no canónica responde más lentamente, de horas a días, proveyendo una actividad de NF- $\kappa$ B de larga duración (Hoffmann y Baltimore, 2006).

El TNF- $\alpha$  actúa sobre el receptor TNFR2, este receptor activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B mediante la degradación de su inhibidor I $\kappa$ B regulada por proteínas quinasa (IKK), permitiendo de esta manera la translocación del factor al núcleo donde induce la expresión, entre otros genes, de los correspondientes a citoquinas proinflamatorias. Las interacciones de IKK, de las isoformas de I $\kappa$ B y de NF- $\kappa$ B pueden ser pensadas como un módulo de transducción de señal con retroalimentación negativa, que recibe señales de caminos que provienen de receptores de la superficie celular y transmite señales a complejos de proteínas unidos a promotores que regulan la expresión génica. En un sistema con regulación negativa, la respuesta a la estimulación persistente puede variar desde oscilaciones continuas a oscilaciones menores a un aumento monótono hasta un nivel plató. La activación del NF- $\kappa$ B en

respuesta a la estimulación con TNF- $\alpha$  tiene dos fases, el grado y el tiempo de atenuación post-inducción son variables. El perfil característico de activación de NF- $\kappa$ B está generado por la síntesis, localización y degradación coordinada de las tres isoformas de I $\kappa$ B, lo que constituye un patrón oscilatorio.

La inducción producida por el LPS bacteriano se lleva a cabo a través de la unión al receptor celular TLR4, el cual se cree que puede activar dos caminos de señal cada uno de los cuales activaría directamente al NF- $\kappa$ B (Barton y Medzhitov, 2003). Uno es el camino dependiente de MyD88 (proteína adaptadora dependiente de mieloides) que recluta a las quinasas asociadas al receptor de IL-1 (IRAK1) las cuales fosforilan al factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6), llevando a la activación del complejo IKK. El otro es un camino independiente de MyD88, que depende de la molécula adaptadora TRIF (adaptador del IFN- $\beta$  que contiene el dominio TIR) y otras proteínas, que como resultado final llevan a la degradación del I $\kappa$ B con la consecuente translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo.

El IFN- $\gamma$  no parece activar directamente al NF- $\kappa$ B. La mayoría de los tipos celulares expresan receptores para IFN- $\gamma$ , cuando este se une activa STAT1 la cual transloca como dímero al núcleo activando distintos genes, entre ellos al factor de transcripción IRF-1 que induce a su vez a la transcripción de otros genes incluyendo aquellos que median la acción antiviral del IFN. Se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  aumenta la actividad transcripcional del IFN- $\gamma$  induciendo la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Nguyen y Benveniste, 2002; Hurgin y col., 2007), y que la producción de citoquinas proinflamatorias se ve aumentada de manera sinérgica en presencia del factor (Paludan, 2000).

El virus HSV puede activar al NF- $\kappa$ B de distintas maneras, las glicoproteínas interactúan con TLR2 y también con los heterodímeros TLR1/2 y TLR2/6. Los motivos CpG de HSV-2 estimulan al TLR9 que se encuentra en las vesículas intracelulares. Las interacciones del ARN de HSV son a través de TLR3 y TLR7/8. Por lo tanto la activación del NF- $\kappa$ B puede darse a través de la replicación del virus en la célula o sólo por medio de la unión de sus glicoproteínas a los receptores correspondientes (Herbst-Kralovetz y Pyles, 2006).

En la Figura 21 están representadas las diferentes vías, con su correspondiente inductor, mediante las cuales se produce la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual activa la expresión de distintos genes.

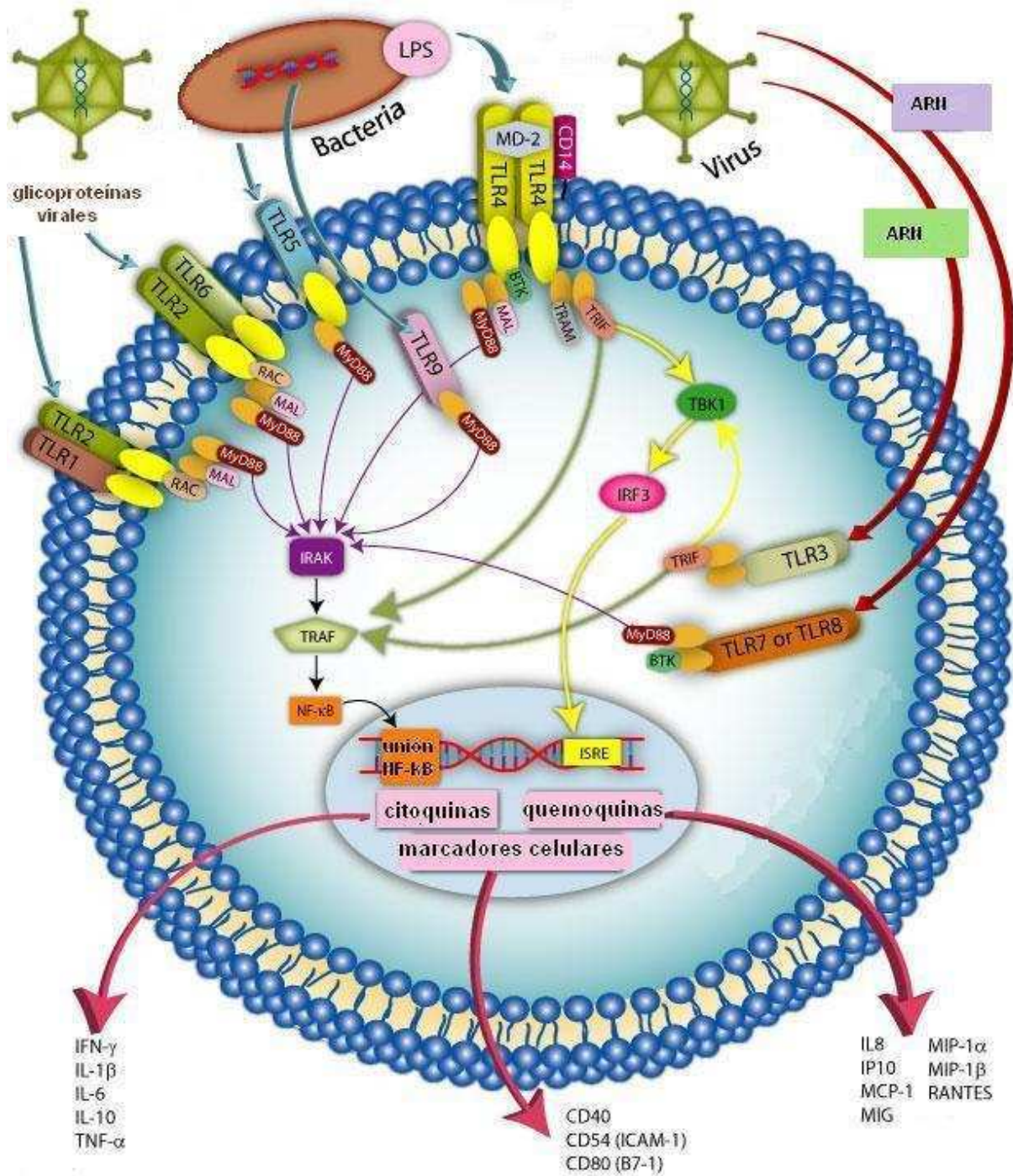


Figura 21. Esquema de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B por distintas vías dependiendo del inductor.

## **OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

- 1 Evaluar la acción de meliacina/CDM sobre la infección genital de ratones hembra con HSV-2.**
  
- 2 Estudiar la acción de meliacina/CDM sobre la producción y efecto de citoquinas en células cultivadas *in vitro*: macrófagos y células Vero.**
  - 2.1 Evaluar la capacidad de meliacina/CDM de modular la producción de citoquinas en macrófagos.**
  - 2.2 Determinar el efecto de meliacina/CDM sobre la inhibición de la replicación de HSV-2 ejercida por IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en células Vero.**

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **Materiales y Métodos.**

### **Virus**

Se utilizaron las cepas G y MS del Virus Herpes Simplex tipo 2 (HSV-2) y las cepas F y KOS del virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1). Las cepas MS, G y F fueron obtenidas de American Type Culture Collection y la cepa KOS fue gentilmente donada por el Dr Erik De Clercq (Rega Institute, Leuven, Belgium). Además se trabajó con la cepa Indiana de VSV. Los stocks de trabajo se obtuvieron infectando células Vero con una multiplicidad de infección de 0,1 UFP/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 h a 37° C para la obtención de VSV y 48 h para HSV. Transcurrido este periodo se realizaron dos ciclos de congelación y descongelación, se clarificó centrifugando 15 minutos a 10000 rpm y se fraccionó y almacenó el sobrenadante a -75°C.

### **Células**

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Células Vero provenientes de riñón de mono verde africano (obtenidas de ATCC) fueron crecidas en medio esencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado con 5% de suero de ternera inactivado (MEM 5%) y 50 µg/ml de gentamicina e incubadas a 37° C y 4 % CO<sub>2</sub> y mantenidas luego de alcanzar la monocapa en MEM suplementado con 1,5% de suero de ternera inactivado (MEM 1,5%)
- La línea celular J774 A.1 de macrófagos de ratón fue cultivada a 37°C y 4% de CO<sub>2</sub> con medio Iscove (Dulbecco modificado) (IMDM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) (IMDM 10% SFB) y 50 µg/ml de gentamicina.
- Células L929 provenientes de ratón fueron cultivadas a 37°C y 4% de CO<sub>2</sub> con medio IMDM 10% SFB y 50 µg/ml de gentamicina .
- Cultivos primarios de macrófagos peritoneales fueron obtenidos de ratones BALB/c previamente inyectados intraperitonealmente con 3 ml de caldo tioglicolato estéril. Las células del exudado peritoneal fueron cosechadas mediante el lavado de la cavidad peritoneal con 5 ml de medio de cultivo IMDM. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos y las células fueron resuspendidas en medio de cultivo IMDM 10% SFB y 50 µg/ml de gentamicina. Se contaron las células

con hemocitómetro y se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad aproximada de  $5 \times 10^5$  células por pocillo. Se incubaron a 37° C y 4% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para permitir la adhesión de los macrófagos a la placa. Una vez terminada la incubación se realizaron lavados con medio de cultivo IMDM para remover las células no adheridas.

### **Animales**

Se utilizaron ratones BALB/c hembras y machos de 6 a 8 semanas de edad provenientes del I.N.T.A Castelar. Los animales fueron mantenidos con comida y agua provista *ad libitum* y fueron manipulados de acuerdo con la resolución del uso de animales en investigación The Animal Care Guidelines from The National Institute of Health (USA)

### **Reactivos**

LPS de *E. coli* serotipo 055: B5 (Sigma), TNF- $\alpha$  recombinante de ratón expresado en *E. coli* (Sigma), antisuero anti- TNF- $\alpha$  de ratón (Sigma), Actinomicina D (Merk), Concanamicina A (Sigma), Medroxiprogesterona (Gador), gelatina (Sigma), aciclovir pomada (GlaxoWellcome), IFN-alfa-2 b humano recombinante (Sidus), IFN-gamma-1B humano recombinante (Boehringer Ingelheim), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) (Sigma), ácido pícrico, caldo tioglicolato (Britania), PBS, cicloheximida (Sigma), naranja de acridina, azul tripán (Sigma).

### **Protocolo de preparación de meliacina**

Hojas verdes de *Melia azedarach* L fueron recogidas en la zonas de Palermo y Ciudad Universitaria de la ciudad de Buenos Aires, Olivos y otras localidades de la provincia, lavadas con agua destilada y almacenadas a -20°C. Luego de descongeladas, fueron licuadas en buffer fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7,2, conteniendo 0,35 M de KCl (1 g de hojas por mililitro). La preparación cruda fue filtrada y centrifugada a 10000 x g durante 45 min. Los sobrenadantes fueron liofilizados y extraídos con acetato de etilo. La fase orgánica fue cromatografiada por absorción molecular sobre sílica gel (230-400 mesh) (E. Merck, Darmstadt, Alemania). Dos fracciones de 20 ml cada una fueron eluidas primero con cloroformo y luego con cloroformo/metanol. La actividad antiviral de todas las fracciones se siguió mediante la medición de su acción contra la

multiplicación del virus de la estomatitis vesicular bovina (VSV). Las fracciones bioactivas eluidas con cloroformo metanol 95:5, fueron reunidas, evaporadas y luego solubilizadas en PBS a una concentración final de 1 mg/ml y mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (MAS). Para una posterior purificación, MAS fue sujeta a cromatografía de capa delgada usando una mezcla de solvente (cloroformo/metanol 90:10). Bajo la iluminación con luz UV, se observaron tres bandas y dos de ellas, denominadas arbitrariamente MAB1 y MAB2, con actividad antiviral, se recolectaron y resuspendieron en metanol.

El principio activo CDM (1-cinnamoil-3,11-dihidroxiymeliacarpina) fue purificado en nuestro laboratorio como describe Alché y col., 2003.

### **Determinación de viabilidad por MTT**

Células Vero cultivadas en placas de 96 pocillos a una densidad aproximada de  $2 \times 10^4$  células/pocillo fueron tratadas con concentraciones decrecientes de la droga a ensayar durante distintos tiempos. Al cabo del período establecido, se observó la morfología celular utilizando un microscopio de luz y se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro] descrito previamente por Mosmann con algunas modificaciones. Brevemente, al cabo de la incubación, se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de una solución de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo y se incubó por 2 hs a  $37^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente se descartaron los sobrenadantes y los cristales azules formados por la enzima succinato dehidrogenasa se disolvieron con 200  $\mu\text{l}$  de etanol. Se determinó la densidad óptica en un lector de microplacas (Eurogenetics MPR-A4I) a 570 y 630 nm.

En el caso que así se indique, el número de células supervivientes se determinó mediante la interpolación en una curva de calibración estándar que correlaciona los valores de densidad óptica con el número de células viables determinado por el conteo con un hemocitómetro.

### **Ensayo con naranja de acridina**

Macrófagos peritoneales cultivados sobre cubreobjetos se trataron con IMDM solo o 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAS en IMDM sin suero durante 2 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego de la incubación se descartó el medio de cultivo y las células se incubaron con 5  $\mu\text{g/ml}$  de naranja de

acridina en IMDM 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 con epifluorescencia.

### **Titulación de la infectividad viral por el método de UFP**

Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades, fueron infectadas por duplicado con diluciones al décimo de las muestras a titular usando un volumen de inóculo de 100 µl. Se adsorbió el virus durante 1 hora a 37°C, luego se retiró el inóculo y se agregó medio semisólido (MEM 2x suplementado con 4% de suero de ternera y 100 µg/ml de gentamicina, y metilcelulosa 1,4% en partes iguales). Las microplacas se incubaron a 37°C y 4% de CO<sub>2</sub> durante 48 h, momento en el cual se fijaron las células mediante el agregado de formol 10% durante 20 minutos. Una vez fijadas, las células se colorearon con cristal violeta al 1%. Se contó el número de placas de lisis producidas por el virus y se determinó el título viral utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/ml} = \frac{\text{promedio del número de placas de lisis}}{\text{(dilución utilizada x volumen de inóculo)}}$$

### **Ensayo de inhibición del rendimiento viral**

Monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 cavidades fueron inoculadas con 100 UFP de virus por pocillo. Luego de 1 hora de incubación se removió el virus residual y las células fueron incubadas con MEM suplementado con 1,5% de suero de ternera en presencia o ausencia de distintas concentraciones de los compuestos. Después de 24 h de incubación a 37°C, los cultivos fueron cosechados y se midió el rendimiento viral por el método de UFP. El porcentaje de inhibición se calcula con respecto al control de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{\text{título de la muestra} \times 100}{\text{título del control}}$$

La actividad antiviral se expresó como la concentración efectiva 50 (EC<sub>50</sub>) o la concentración requerida para reducir el rendimiento viral en un 50% comparado con el control sin tratar

### **Ensayo de inhibición de la acción citopática**

Monocapas de células Vero sembradas en una microplaca de 96 pocillos se trataron con medio de cultivo fresco conteniendo CDM, IFN- $\alpha$  humano, IFN- $\gamma$  humano, ambos IFN o la combinación de ellos. A las 16 hs, las células fueron inoculadas con HSV-2 MS y HSV-1 KOS y luego de la adsorción viral se reemplazó el medio con medio fresco conteniendo las concentraciones de IFN utilizadas anteriormente. A las 0, 12, 24, 36 y 48 h p.i. se midió la viabilidad celular usando la técnica de MTT para determinar la inhibición de la acción citopática del virus producida por las citoquinas.

### **Inactivación viral por luz UV**

Alícuotas de 1ml del stock de virus fueron inactivadas por exposición a la luz UV. Brevemente, placas de petri estériles abiertas conteniendo el virus se colocaron sobre hielo a 10 cm de la lámpara de luz UV durante 2 minutos. Al cabo de dicho tiempo, se taparon las placas, se colectó el virus y se congeló hasta su posterior utilización. Para corroborar que la inactivación fuera exitosa se determinó la presencia de virus infeccioso por la técnica de UFP.

### **Ensayos con animales**

#### **Infección de los animales por vía intravaginal**

Ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad fueron inyectados subcutáneamente con 3 mg de medroxiprogesterona. Luego de transcurridos 6 días, se higienizó la zona vaginal de los ratones con un hisopo y se los inoculó en la vagina con 20  $\mu$ l de una solución de virus en PBS. La inoculación se realizó moviendo la micropipeta hacia adentro y afuera para simular el coito. En algunos ensayos se probaron distintas concentraciones virales y en otros se realizaron tratamientos con MAS y con aciclovir

como control positivo. Los animales fueron observados diariamente para evaluar la evolución de la enfermedad. La severidad de las lesiones producidas se graduó en forma arbitraria de la siguiente manera: 0 sano, 1 eritema genital, 2 inflamación genital moderada, 3 lesiones genitales severas y purulentas, 4 parálisis de las patas traseras, y 5 muerte. Los animales fueron separados en grupos y en algunos casos fueron pintados con ácido pícrico para poder identificarlos durante el tratamiento y seguir la evolución de la enfermedad en cada individuo por separado.

### **Lavados vaginales**

Para medir la diseminación del virus dentro de la vagina, se realizaron lavados vaginales con 100  $\mu$ l de PBS suplementado con 50  $\mu$ g/ml de gentamicina a partir del día 1 post-infección y hasta que se creyó necesario. Las muestras fueron centrifugadas y guardadas a  $-75^{\circ}\text{C}$  para luego ser diluidas al décimo y tituladas por el método de formación de placas.

### **Titulación de HSV-2 en cerebro**

Los animales infectados que murieron por encefalitis o aquellos que fueron sacrificados al terminar el experimento, fueron autopsiados y se les extrajo el cerebro. Con la materia encefálica obtenida de cada animal, se realizaron homogenatos individuales que fueron diluidos al 10% p/v en PBS. Los homogenatos fueron clarificados por centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes obtenidos se almacenaron a  $-75^{\circ}\text{C}$  hasta su titulación por el método de UFP.

### **Obtención de cortes histológicos de vagina**

Animales infectados o no fueron sacrificados a distintos tiempos p.i. y se les extirpó la vagina, conteniendo tanto la vulva como el cuello del útero. Estas vaginas fueron lavadas con PBS estéril e inmediatamente congeladas por inmersión en nitrógeno líquido. Una vez congeladas se rotularon y almacenaron a  $-75^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

## **Procesamiento de las muestras para obtener cortes de parafina**

Para llevar a cabo este proceso, se descongelaron las vaginas almacenadas a  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se fijaron en formol 10%.

### **Procesamiento**

-Deshidratación: los tejidos se deshidrataron por inmersión en alcohol etílico 70% durante 2 h, luego se repitió la operación usando una solución de alcohol etílico 90% y por último alcohol absoluto.

-Aclarado: los tejidos se incubaron en cloroformo durante toda la noche para permitir que luego penetre la parafina.

-Impregnación con parafina: se incluyeron los tejidos en parafina dos veces durante 3 h cada una.

-Cortes: se cortaron secciones de  $4\text{ }\mu\text{m}$  aproximadamente utilizando un micrótomo. Las secciones se montaron sobre portaobjetos previamente desengrasados con alcohol y calentados con agua hasta una temperatura menor a la del punto de fusión de la parafina. Una vez montadas las secciones de tejido, se incubaron a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30-60 minutos para que se sequen sobre el vidrio.

-Desparafinado: Secciones de tejido embebidas en parafina fueron introducidas en xileno (3 veces durante 3 min.), y luego hidratados de la siguiente manera: se sumergieron en alcohol absoluto (3 veces durante 3 min.), luego en alcohol 80% (3 veces durante 3 min.), en alcohol 60% (3 veces durante 3 min.), y finalmente en agua destilada.

### **Tinción con hematoxilina-eosina de los cortes de tejido**

Cortes de tejido embebidos en parafina fueron sumergidos en xileno (3 veces durante 3 min.), luego tratados con alcohol absoluto (3 veces durante 3 min.), lavados con agua corriente y teñidos con hematoxilina durante 5-10 min. Se lavaron con agua, se sumergieron en ácido clorhídrico 1% y se tiñeron con eosina durante 30 segundos. Luego se procedió a deshidratar los tejidos como se mencionó anteriormente y se los montó.

### **Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cortes de tejido**

Para realizar la IFI se partió de portaobjetos con el tejido desparafinado. Se realizaron lavados exhaustivos con PBS y los tejidos se incubaron con una dilución 1/150 de Igs de ratón anti-HSV, durante 30 min. a 37°C. Luego de terminada la incubación se realizaron lavados exhaustivos con PBS y se incubaron con una dilución 1/50 de un antisuero de conejo anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Al cabo de 30 min. a 37°C se realizaron dos lavados con PBS y dos con agua bidestilada. Los vidrios se montaron con glicerina tamponada y se observaron en un microscopio con epifluorescencia.

### **Determinación de citoquinas**

#### **Medición de la actividad citotóxica de TNF- $\alpha$**

La actividad citotóxica del TNF- $\alpha$  se midió utilizando un bioensayo de microtitulación en células L929. Monocapas de células L929 fueron incubadas con diluciones al medio de las muestras a testear conteniendo 5  $\mu\text{g/ml}$  de actinomicina D a una temperatura de 38,5 °C durante 20 h. Las placas se fijaron con una solución de formol 10%, se tiñeron con cristal violeta 0,05% y se les midió la absorbancia a 600 nm. en un lector de microplacas. Los títulos de TNF- $\alpha$  se calcularon mediante la determinación de la dilución resultante en un 50% de citotoxicidad comparada con una curva de calibración estándar obtenida con TNF- $\alpha$  recombinante de ratón. La acción citotóxica fue identificada como TNF- $\alpha$  mediante un ensayo de neutralización con un antisuero específico contra TNF- $\alpha$  murino.

#### **Neutralización de TNF- $\alpha$**

Para comprobar que el efecto citotóxico observado en las células L929 se debía a la presencia de TNF- $\alpha$ , se realizó un ensayo de neutralización. Para ello, alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de monocapas de células peritoneales tratadas con MAS fueron incubadas durante 1h a 37° C con el mismo volumen de diluciones seriadas al medio (desde 20  $\mu\text{g/ml}$  a 0,625  $\mu\text{g/ml}$ ) del anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ . Luego de la incubación se trataron monocapas de células L929 con los sobrenadantes neutralizados como se detalló anteriormente. Como control del experimento, las células L929 fueron tratadas



también con los mismos sobrenadantes incubados previamente con medio de cultivo IMDM sin anticuerpo.

### **ELISA para la medición de IFN- $\gamma$ murino**

Se realizó un ELISA de captura casero para determinar la concentración de IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivo o en muestras de animales tratados. Brevemente, microplacas de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc) fueron sensibilizadas con 50  $\mu$ l por pocillo de una solución de 25  $\mu$ g/ml de anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  de ratón (BD PharMingen) en PBS (pH 9, 0,1 M). Las microplacas se colocaron en cámara húmeda y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en heladera. Luego, las placas se lavaron exhaustivamente con PBS 1 X y se bloquearon con medio de cultivo IMDM suplementado con 10% SFB durante 4 h a temperatura ambiente. Se volcó el medio y se sembraron las muestras por duplicado. Se incubó durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Luego de lavar exhaustivamente con PBS Tween 0,05%, se agregaron 50  $\mu$ l/pocillo de una solución de 1  $\mu$ g/ml de anticuerpo anti-IFN- $\gamma$  biotilado (BD PharMingen) en PBS Tween 0,05% y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las microplacas con PBS Tween 0,05% y se agregaron 100  $\mu$ l/pocillo de una solución 1/250 de estreptavidina-peroxidasa (BD PharMingen) en IMDM. Se incubó 1 h a temperatura ambiente y se agregaron 100  $\mu$ l/pocillo de TMB (Sigma). Aproximadamente 30 minutos después de agregado el TMB, se verificó el cambio de color de incoloro a azul en las muestras y se procedió a parar la reacción enzimática utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N como solución de freno. Se leyó la densidad óptica en un lector de microplacas a 450 nm. Se utilizó una curva estándar realizada con IFN- $\gamma$  recombinante (BD PharMingen) diluido al medio desde 2500 pg/ml a 20 pg/ml para extrapolar los datos de D.O. obtenidos y calcular la concentración de IFN- $\gamma$  en las muestras.

### **ELISA para la medición de IL-6 murina**

Se realizó un ELISA de captura casero para determinar la concentración de IL-6 en sobrenadantes de cultivo. Brevemente, microplacas de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc) fueron sensibilizadas con 100  $\mu$ l por pocillo de una dilución 1/250 de un anticuerpo anti-IL-6 de ratón (BD PharMingen) en buffer carbonato de sodio (pH 9, 0,1 M). Las microplacas se colocaron en cámara húmeda y se incubaron durante toda la noche a 4

°C en heladera. Luego, las placas se lavaron exhaustivamente con PBS Tween 0,05% y se bloquearon con medio de cultivo IMDM suplementado con 10% SFB durante 1 h a temperatura ambiente. Se volcó el medio, se lavó con PBS Tween 0,05% y se sembraron las muestras por duplicado. Se incubó durante 2h a temperatura ambiente. Luego de lavar exhaustivamente con PBS Tween 0,05%, se agregaron 100 µl/pocillo de una solución formada por 1/250 de anticuerpo anti-IL-6 biotinilado (BD PharMingen) y 1/250 de estreptavidina peroxidasa (BD PharMingen) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las microplacas con PBS Tween 0,05% y se agregaron 100 µl/pocillo de TMB (Sigma). Aproximadamente 30 minutos después de agregado el TMB, se verificó el cambio de color de incoloro a azul en las muestras y se procedió a parar la reacción enzimática utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N como solución de freno. Se leyó la densidad óptica en un lector de microplacas a 450 nm. Se utilizó una curva estándar realizada con IL-6 recombinante (BD PharMingen) para extrapolar los datos de D.O. obtenidos y calcular la concentración de IL-6 en las muestras.

#### **ELISA para la medición de IL-10 murina**

Se realizó un ELISA de captura casero para determinar la concentración de IL-10 en sobrenadantes de cultivo. Brevemente, microplacas de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc) fueron sensibilizadas con 50 µl por pocillo de una solución de 3 µg/ml de anticuerpo anti-IL-10 de ratón (BD PharMingen) en PBS (pH 6, 0,1 M). Las microplacas se colocaron en cámara húmeda y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en heladera. Luego, las placas se lavaron exhaustivamente con PBS Tween 0,05% y se bloquearon con medio de cultivo IMDM suplementado con 10% SFB durante 2,5 h a temperatura ambiente. Se volcó el medio, se lavó con PBS Tween 0,05% y se sembraron las muestras por duplicado. Se incubó durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Luego de lavar exhaustivamente con PBS Tween 0,05%, se agregaron 50 µl/pocillo de una solución de 2 µg/ml de anticuerpo anti-IL-10 biotinilado (BD PharMingen) en PBS Tween 0,05% y se incubó durante 1,5 h a temperatura ambiente. Se lavaron las microplacas con PBS Tween 0,05% y se agregaron 50 µl/pocillo de una solución 1/2000 de estreptavidina-peroxidasa (BD PharMingen) en IMDM. Se incubó 1 h a temperatura ambiente y se agregaron 100 µl/pocillo de TMB (Sigma). Aproximadamente 30 minutos después de agregado el TMB, se verificó el cambio de

color de incoloro a azul en las muestras y se procedió a parar la reacción enzimática utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 N como solución de freno. Se leyó la densidad óptica en un lector de microplacas a 450 nm. Se utilizó una curva estándar realizada con IL-10 recombinante (BD PharMingen) para extrapolar los datos de D.O. obtenidos y calcular la concentración de IL-10 en las muestras.

### **Determinación de nitritos por Griess**

Sobrenadantes de células tratadas o no con distintas combinaciones de MAS (alícuotas de 100  $\mu\text{l}$ ) se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de Griess.

El reactivo de Griess se obtiene mezclando dos soluciones en iguales cantidades inmediatamente antes de usar. Las soluciones son:

Solución A: 0,1% p/v de N-(1-naftil) hidrocloreto de etilendiamina en agua destilada, almacenada a 4 °C protegida de la luz.

Solución B: 1% p/v de sulfanilamida en ácido fosfórico 5%, almacenada a 4 °C protegida de la luz.

Luego de cumplido el tiempo de incubación, se midió la densidad óptica a 540 nm. y los valores se extrapolaron en una curva de calibración estándar.

### **Detección del factor NF- $\kappa$ B por IFI**

Para determinar la presencia del factor NF- $\kappa$ B, cultivos de macrófagos crecidos sobre cubreobjetos fueron lavados con PBS y fijados con metanol durante 10 min. a -20°C. Se realizaron lavados exhaustivos con PBS y los cubreobjetos se incubaron con una dilución 1/100 de un anticuerpo monoclonal anti-subunidad p65 del NF- $\kappa$ B (Santa Cruz), durante 30 min. a 37°C. Luego de terminada la incubación se realizaron lavados exhaustivos con PBS y se incubaron con una dilución 1/50 de un antisuero de conejo anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma). Al cabo de 30 min. a 37°C se realizaron dos lavados con PBS y dos con agua bidestilada. Los vidrios se montaron con glicerina tamponada y se observaron en un microscopio con epifluorescencia o en un microscopio confocal.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)**

Se utilizaron minigeles de poliacrilamida según el sistema de Laemmli. En general, para la resolución de las proteínas se preparó un gel con una concentración final de acrilamida de 12% 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 20  $\mu$ l de cada muestra por calle y el gel se sometió a 200 voltios con voltaje constante durante 45 min. utilizando el sistema mini-protean II de BioRad.

### **Western blot**

Las proteínas separadas en el gel mediante la técnica de electroforesis, se transfirieron a una membrana de PVDF (MSI) a 0,8 mA/cm<sup>2</sup> durante 1 h utilizando el sistema Novablot de LKB. La membrana se bloqueó a 4°C durante toda la noche con una solución 5% de leche en polvo disuelta en PBS. Al otro día se lavó exhaustivamente con PBS Tween 0,05% y se incubó con una dilución 1/1000 anticuerpo anti-iNOS (BDPharMingen) durante 2 h a 37°C. Luego de la incubación se realizaron lavados exhaustivos con PBS Tween 0,05% y se incubó con un anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa durante 1,5 hs a 37°C. Se lavó con PBS Tween 0,05% y se sumergió en el reactivo de quimioluminiscencia durante 1 min. Se reveló la membrana exponiéndola a una película radiográfica Kodak durante 24 hs a temperatura ambiente.

### **Análisis de imágenes**

Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 40X e importadas al programa NIH ImageJ 1.34s donde se convirtieron a una escala de grises de 8-bit desde 0 (negro) a 225 (blanco). El núcleo de cada una de las células fue seleccionado individualmente para medir la densidad media de inmunofluorescencia nuclear. Esta densidad media se multiplicó por el área del núcleo resultando en la intensidad nuclear. Este procedimiento fue repetido para 10 células / campo y se calculó el promedio de intensidad nuclear por célula que se expresó en unidades arbitrarias.

### **Análisis estadístico**

Los datos presentados son las medias  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

Las diferencias significativas entre los datos se determinaron por ANOVA de una vía seguida del test de Tuckey (GraphPad Prism<sup>®</sup> Home). Las diferencias significativas en la tasa de supervivencia de los ensayos con animales fueron determinadas con el análisis de log rank (GraphPad Prism<sup>®</sup> Home). Las diferencias fueron consideradas significativas con  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

**ACCIÓN DE MELIACINA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN  
GENITAL DE RATONES HEMBRAS ADULTAS CON HSV-2**

## **Introducción**

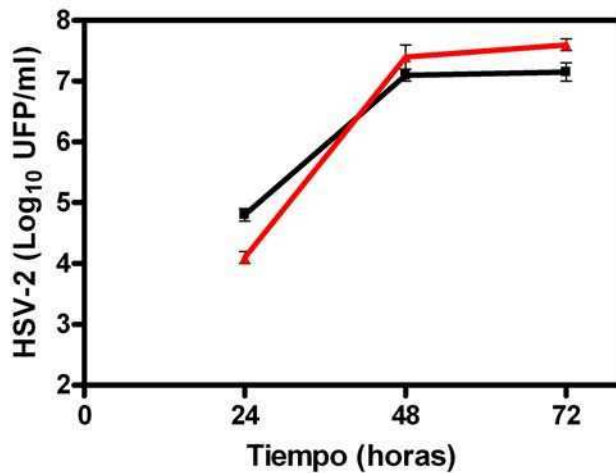
Teniendo en cuenta la actividad ejercida por meliacina en el modelo de queratitis estromal herpética, donde se comporta como un agente terapéutico reduciendo la liberación del virus en los ojos de los animales infectados con HSV-1 (Alché y col., 2000; Pifarré y col., 2002), quisimos evaluar el efecto de la administración local de MAS en el modelo de infección herpética genital utilizando dos cepas de Herpes Simplex tipo 2. La cepa G es una cepa moderadamente virulenta que origina una infección menos severa que la producida por la cepa MS neurogénica que lleva a la muerte del animal por encefalitis.

## **Acción antiviral de meliacina en células Vero infectadas con HSV-2**

Meliacina inhibe la replicación y la propagación de HSV-1 en células Vero (Villamil y col. 1995; Alché y col., 2002). Dadas las similitudes entre HSV-1 y HSV-2 la probabilidad de que HSV-2 fuera susceptible a meliacina era alta, no obstante decidimos evaluar la acción antiviral de meliacina en células Vero infectadas con HSV-2 antes de investigar su poder terapéutico en animales. En primer lugar determinamos si las cepas G y MS de HSV-2 eran capaces de replicar en células Vero. Para ello, infectamos monocapas de células Vero con  $2 \times 10^4$  UFP de HSV-2 cepa G ó HSV-2 cepa MS, luego de una hora de adsorción se retiró el inóculo y se agregó medio de mantenimiento. A las 24, 48 y 72 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes celulares y se tituló el virus presente mediante la técnica de formación de placas.

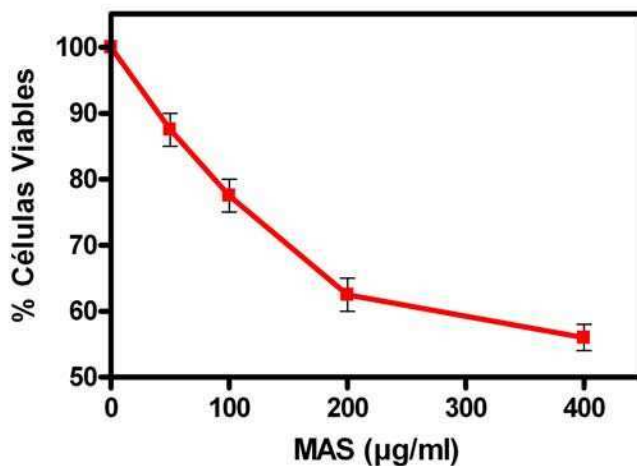
Como se puede observar en la figura 1, ambas cepas de HSV-2 replican con igual eficiencia, alcanzando aproximadamente el mismo título a las 72 h p.i. Una vez que determinamos que la infección de las células Vero con HSV-2 era productiva, decidimos evaluar su susceptibilidad a meliacina.





**Figura 1. Replicación de HSV-2 en células Vero.** Monocapas de células Vero fueron infectadas con  $2 \times 10^4$  UFP de HSV-2 cepa G (rojo) o cepa MS (negro). A las 24, 48 y 72 h p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se determinó el título de virus por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

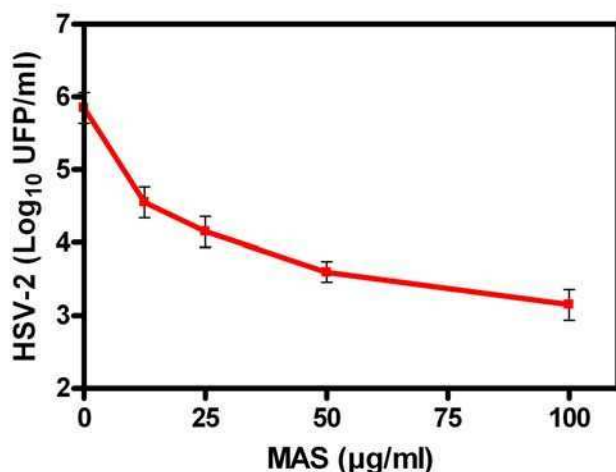
Previamente se determinó la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de meliacina (concentración que mata el 50% de las células), para ello tratamos monocapas de células Vero con distintas concentraciones de MAS durante 24 h y al cabo de dicho tiempo se determinó la viabilidad celular con la técnica del MTT. La figura 2 muestra el porcentaje de células viables en función de la concentración de MAS utilizada. A partir de la regresión lineal de esta curva se obtuvo la CC<sub>50</sub> que resultó ser de 383  $\mu$ g/ml.



**Figura 2. Citotoxicidad de MAS en células Vero.** Monocapas de células Vero fueron tratadas con concentraciones crecientes de MAS (desde 50 a 400  $\mu$ g/ml) durante 24 h, momento en el cual se determinó la viabilidad celular por el método de MTT. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. A partir de la regresión lineal de esta curva se obtuvo el valor correspondiente a la CC<sub>50</sub>.

A continuación procedimos a evaluar la acción antiviral de MAS en células Vero infectadas con HSV-2 MS y para ello determinamos la CI<sub>90</sub>. Las monocapas de células Vero fueron infectadas con  $6 \times 10^5$  UFP/ml (aproximadamente una moi de 1), luego de transcurrida la hora de adsorción se retiró el inóculo y se agregaron concentraciones

crecientes de MAS (desde 12,5 a 100 µg/ml). A las 24 h se cosecharon los sobrenadantes de los cultivos y se procedió a titular el virus por la técnica de UFP. La figura 3 muestra que MAS inhibe la replicación de HSV-2 MS de manera dependiente de la concentración. A partir de la regresión lineal obtenida de la curva se obtuvo una  $CI_{90}$  de 15 µg/ml, que es aquella concentración a la cual MAS produce una inhibición del título de virus del 90%.



**Figura 3. Acción anti-HSV-2 de MAS en células Vero.**

Monocapas de células Vero fueron infectadas con  $6 \times 10^5$  UFP/ml de HSV-2 MS y tratadas luego de la adsorción viral con concentraciones crecientes de MAS (desde 12,5 a 100 µg/ml) durante 24 h, momento en el cual se determinó el título de virus por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. A partir de la regresión lineal de esta curva se obtuvo el valor correspondiente a la  $CI_{90}$ .

Estos resultados nos permiten concluir que meliacina puede inhibir al virus HSV-2 al igual que HSV-1 en cultivos de células Vero. Si comparamos la  $CI_{90}$  (15 µg/ml) con la  $CC_{50}$  vemos que a esa concentración el 100% de las células es viable. Resultados similares se obtuvieron al infectar las células con la cepa G de HSV-2.

### **Puesta a punto del modelo de infección herpética genital**

Antes de considerar la aplicabilidad de un antiviral efectivo *in vitro* en una infección humana es necesario utilizar un modelo animal como paso intermedio para demostrar que el antiviral posee una serie de propiedades que no pueden ser evaluadas en sistemas *in vitro*.

Afortunadamente se conocen varios modelos animales, entre ellos un modelo de infección genital en el ratón que permite evaluar la acción de un antiviral teniendo en cuenta la aparición y evolución de las lesiones así como también la diseminación del virus.

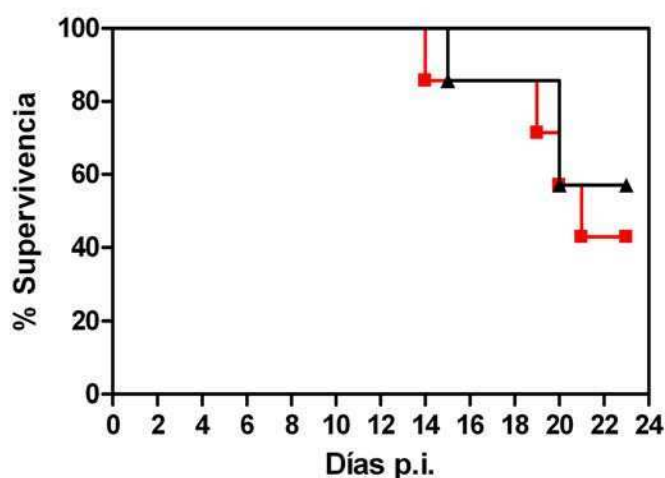
En consecuencia y considerando la susceptibilidad del virus HSV-2 a meliacina y los resultados obtenidos con HSV-1 en el modelo de queratitis herpética murina, se procedió a testear si meliacina era efectiva en este modelo animal de infección genital.

### Modelo de infección con HSV-2 cepa G

Para comenzar a evaluar la acción de MAS en el modelo animal, infectamos ratones hembra BALB/c por la vía intravaginal con dos inóculos distintos de la cepa G de HSV-2. Los ratones fueron previamente inyectados con medroxiprogesterona, un tratamiento hormonal que además de sincronizar los ciclos hormonales de los ratones, aumenta la susceptibilidad a la infección con el virus herpes (Kaushic y col., 2003).

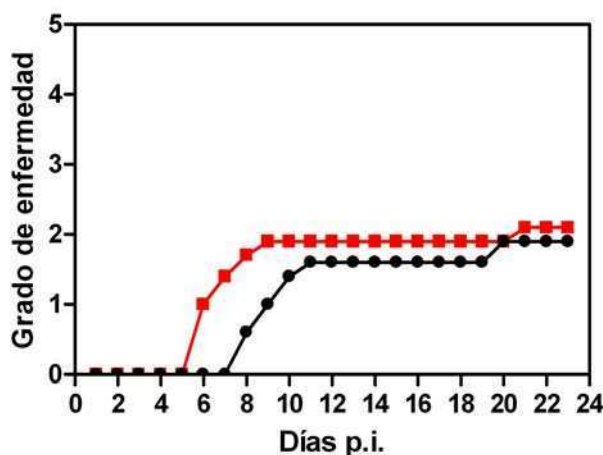
La infección se llevó a cabo utilizando un volumen de inóculo de 20  $\mu$ l conteniendo  $2 \times 10^5$  UFP ó  $5 \times 10^5$  UFP de HSV-2 G. Luego de la inoculación, los animales fueron observados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. Además se realizaron lavados vaginales diariamente durante los días 1 y 4 p.i. para determinar la carga viral.

Como se puede observar en la figura 4 donde se muestra la supervivencia de los animales, no parece haber demasiadas diferencias entre ambos inóculos con respecto a la cantidad de animales sobrevivientes (50% para  $2 \times 10^5$  UFP y 40% para  $5 \times 10^5$  UFP). Es interesante resaltar la evolución lenta de la enfermedad, los animales comienzan a morir recién al día 14-15 p.i. y al día 23 p.i. todavía hay animales que no se enfermaron.



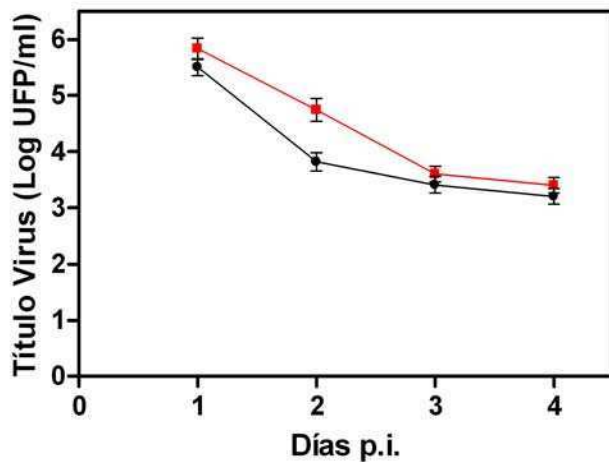
**Figura 4. Supervivencia a la infección con HSV-2 G.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) fueron infectados en la vagina con  $2 \times 10^5$  UFP (●) o  $5 \times 10^5$  UFP (■) de la cepa G de HSV-2. Los animales fueron monitoreados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. El gráfico muestra el porcentaje de supervivencia en cada grupo de tratamiento en función del tiempo según el log rank test.

Teniendo en cuenta las distintas lesiones y que éstas representan una etapa distinta de la enfermedad, utilizamos la gradación de las mismas según trabajos publicados previamente (Walz y col., 1977; Kokuba y col, 1998). Los animales fueron observados diariamente y clasificados según el grado de enfermedad que presentaban. La severidad de la enfermedad se graduó de la siguiente manera: 0, sano; 1, eritema genital; 2, inflamación genital moderada; 3, lesiones genitales severas y purulentas; 4, parálisis de las patas traseras y 5, muerte. Para evaluar la enfermedad neurológica se realizó el *spin test* antes de observar los signos neurológicos. La figura 5 muestra el promedio del grado de enfermedad por grupo de infección en función del tiempo. Este tipo de gráfico nos muestra cómo evoluciona la enfermedad, podemos decir que la infección se desarrolla lentamente y que el grado de enfermedad promedio no llega a 3 (inflamación severa) a los 23 días p.i. En cuanto a los dos inóculos utilizados podemos decir que las diferencias en la evolución de la enfermedad son leves, siendo más pronunciada la obtenida con el inóculo mayor.



**Figura 5. Evolución de la enfermedad en animales infectados con HSV-2 G.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) fueron infectados en la vagina con  $2 \times 10^5$  UFP (●) o  $5 \times 10^5$  UFP (■) de la cepa G de HSV-2. Los animales fueron monitoreados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. El gráfico muestra el promedio del grado de enfermedad para cada grupo respecto del día p.i..

En cuanto a los lavados vaginales, realizamos dos lavados por ratón con 50  $\mu$ l de PBS suplementado con gentamicina que luego se mezclaron y se congelaron. Se determinó el título viral mediante la técnica de formación de placas y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6. Como podemos observar, el título de virus es del orden del inóculo al día 1 p.i. y luego desciende, al día 4 p.i. todavía hay virus en la vagina. La caída del título es menos abrupta en los animales infectados con un inóculo mayor.

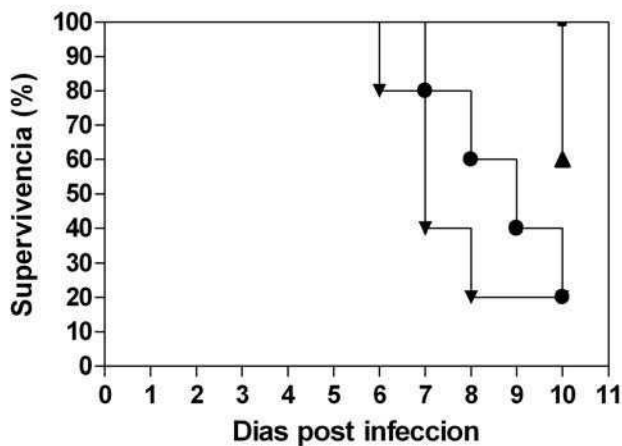


**Figura 6. Título de virus en la vagina de animales infectados con HSV-2 G.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) fueron infectados en la vagina con  $2 \times 10^5$  UFP (●) o  $5 \times 10^5$  UFP (■) de la cepa G de HSV-2. Los animales fueron monitoreados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. A los días 1, 2, 3 y 4 p.i. se realizaron lavados vaginales donde se determinó el título de virus por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de todos los lavados correspondientes a cada día.

Conclusión. La susceptibilidad de los ratones a esta cepa es moderada, la infección transcurre con un período de incubación largo y los síntomas no alcanzan el grado máximo de severidad.

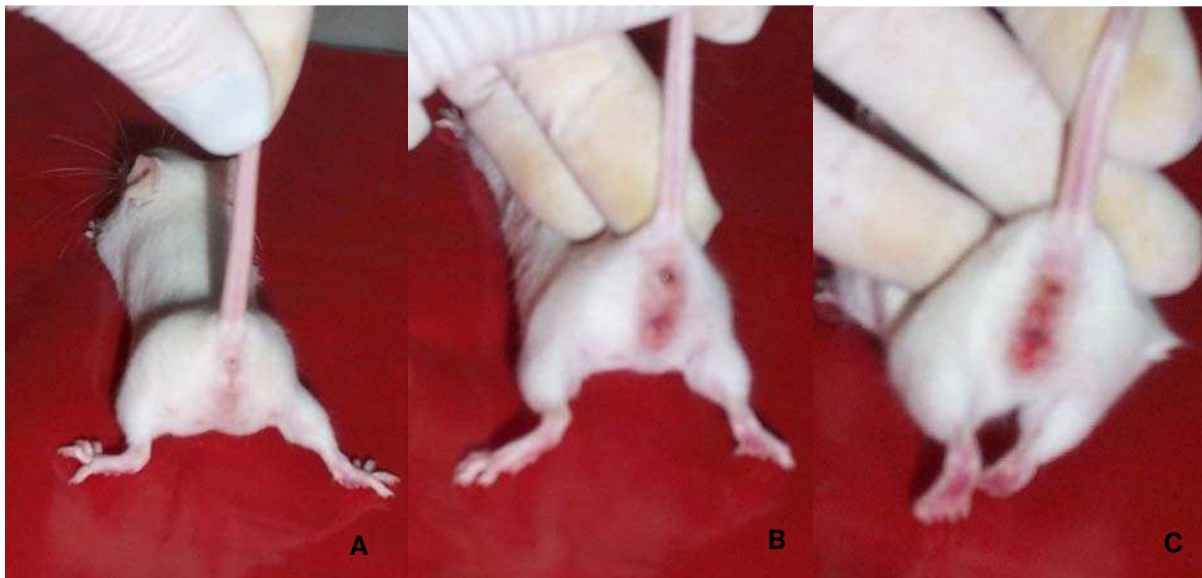
### Modelo de infección con HSV-2 MS

Para poner a punto el modelo lo primero que quisimos determinar fue la cantidad de virus necesaria para producir infección genital. Dada la experiencia adquirida con la cepa G decidimos utilizar una serie de inóculos. Ratones hembras BALB/c infectados con medroxiprogesterona 6 días antes, fueron inoculados intravaginalmente con distintas diluciones seriadas al décimo de HSV-2 MS (desde  $15$  a  $1,52 \times 10^5$  UFP) en  $20 \mu\text{l}$  de PBS. Luego de la infección, los animales fueron examinados diariamente para determinar la aparición de las lesiones. La Figura 7 muestra el porcentaje de supervivencia registrado para cada una de las diluciones de HSV-2 MS utilizadas. Cuando el inóculo utilizado fue menor a  $1,52 \times 10^3$  UFP, la supervivencia fue del 100%, en el caso de  $1,52 \times 10^3$  UFP llegó a ser del 60% al día 10 p.i., 20% para  $1,52 \times 10^4$  UFP al día 10 p.i. también y 20% al día 8 p.i. para la mayor concentración de virus,  $1,52 \times 10^5$  UFP. A diferencia del modelo con HSV-2 G, los animales mueren más rápidamente, entre el sexto y décimo día p.i. dependiendo de la dosis.



**Figura 7. Efecto de la dosis de virus HSV-2 MS sobre la supervivencia de los ratones.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) infectados en la vagina con HSV-2 MS (▲)  $1,5 \times 10^3$  UFP, (●)  $1,5 \times 10^4$  UFP, (▼)  $1,5 \times 10^5$  UFP, fueron monitoreados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. El gráfico muestra el porcentaje de supervivencia en cada grupo de tratamiento en función del tiempo según el log rank test.

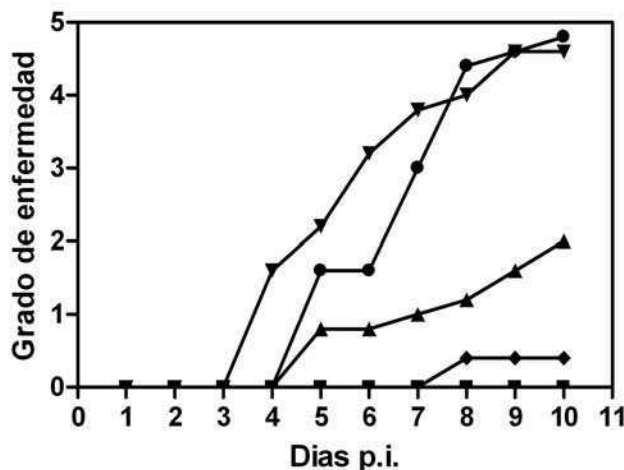
La Figura 8 muestra las lesiones progresivas que se desarrollan al infectar los ratones con la cepa MS de HSV-2. Como se puede observar en la Figura 8A el ratón sano no presenta ninguna lesión en la zona genital, pero además está erguido. La Figura 8B muestra a un ratón con inflamación moderada del área genital, nótese como la zona periférica a la vulva y peri anal está enrojecida.



**Figura 8. Grados de enfermedad en ratones infectados con HSV-2 MS.** Ratones BALB/c hembra fueron infectados en forma intra -vaginal con la cepa MS del virus HSV-2. Los ratones fueron observados diariamente y se obtuvieron fotografías a distintos tiempos que muestran la evolución de la enfermedad. (A) Ratón sano. (B) Ratón con inflamación moderada. (C) Ratón con parálisis.

En la última foto (Figura 8C) se observa un ratón con parálisis de las patas traseras, si comparamos con la imagen del ratón sano podemos observar que el ratón además de presentar inflamada la zona genital, no puede sostenerse sobre sus patas.

La gradación de la severidad de la enfermedad se realizó de manera similar a la utilizada para la cepa G. La Figura 9 muestra el grado de severidad de la enfermedad promedio por día, para cada uno de los grupos infectados con distintas cantidades de UFP. Este tipo de gráfico muestra la evolución de la enfermedad en la población de cada grupo, son datos promediados y representativos de la población en general. Como podemos observar, sólo en el caso de los animales infectados con  $1,52 \times 10^4$  y  $1,52 \times 10^5$  UFP se alcanzaron los mayores grados de enfermedad, lo que indica que los animales se enfermaron y presentaron lesiones que evolucionaron hasta la muerte. En el caso de la infección con  $1,52 \times 10^3$  UFP vemos que la mayoría de los animales llegó a tener inflamación moderada, a pesar de ello según se mostró en la figura 7 murió el 40% de los animales.



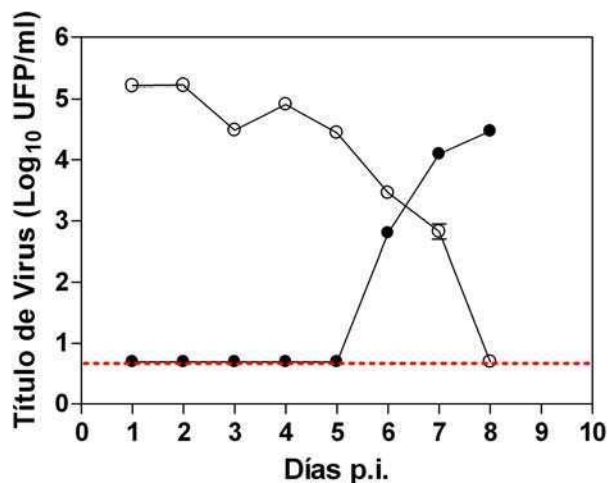
**Figura 9. Efecto de la dosis de virus HSV-2 MS sobre la evolución de la enfermedad en los ratones.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) infectados en la vagina con HSV-2 MS (■) 15 UFP, (◆)  $1,5 \times 10^2$  UFP, (▲)  $1,5 \times 10^3$  UFP, (●)  $1,5 \times 10^4$  UFP, (▼)  $1,5 \times 10^5$  UFP, fueron monitoreados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. El gráfico muestra el grado de enfermedad promedio en cada grupo de tratamiento en función del tiempo.

De acuerdo con estos resultados decidimos continuar los estudios con la dosis de virus  $1,5 \times 10^5$  UFP que produce un alto porcentaje de muerte y un rápido desenlace de la enfermedad ya que los animales mueren entre los 6-8 días p.i.

Puesto que los animales se mueren con signos claros de encefalitis quisimos averiguar cuando el virus migraba al cerebro. Con este fin y para determinar la evolución de la infección e inocularon animales que fueron separados de a pares. Todos los días entre el día 1 y el 8 p.i. se realizaron lavados vaginales a un grupo de dos ratones que luego fueron sacrificados y congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento. Se determinó la carga viral en los fluidos vaginales y en los homogenatos realizados a los cerebros usando la técnica de formación de placas. La Figura 10 muestra como el título

de virus decae en los fluidos vaginales resultando indetectable al día 8 p.i. La desaparición del virus se relaciona con su migración al cerebro donde se lo detecta al día 6 p.i., y al día 8 p.i. se observa que alcanzó los niveles presentes en la vagina el primer día después de la infección.

Nótese como el virus replica exponencialmente en el cerebro cuyos signos exteriores son la parálisis y muerte.



**Figura 10. Título de virus en los cerebros de animales infectados con HSV-2.** Ratones BALB/c hembra (n=2 por grupo) infectados en la vagina con HSV-2 MS cuyos fluidos vaginales fueron cosechados mediante lavados, fueron sacrificados diariamente para extraerles el cerebro. Se determinó el título de virus en los lavados vaginales y en el cerebro utilizando el método de UFP. La línea punteada roja señala el límite de detección del método. (○) Título de virus en la vagina. (●) Título de virus en el cerebro

El diseño de este experimento permitió establecer que hasta el quinto día p.i. el virus no alcanza a multiplicar en el cerebro. Al día 6 p.i. con niveles detectables en la vagina ya alcanza títulos importantes en el cerebro, luego multiplica exponencialmente y al alcanzar un título cercano a  $10^5$  UFP/ml los animales mueren.

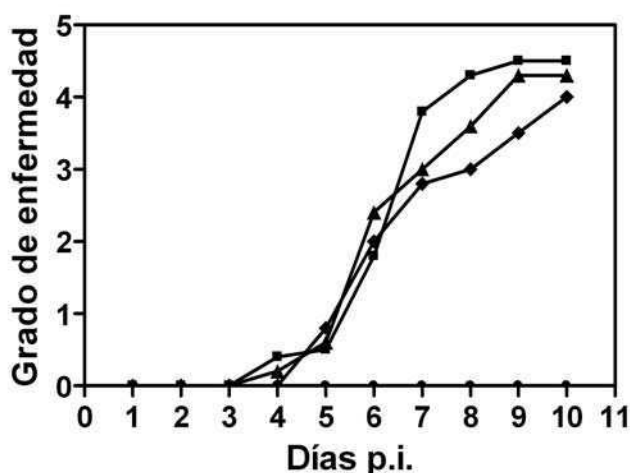
### **Acción de meliacina sobre la infección genital con HSV-2**

En primer lugar realizamos estudios orientativos, destinados a establecer si la administración de meliacina modificaba el curso de la infección ya sea aumentando la sobrevivencia de los animales o disminuyendo la gravedad de los síntomas y la carga viral. Elegimos para trabajar las condiciones más desfavorables usando la cepa más virulenta de HSV-2, MS, en una dosis de  $1,5 \times 10^5$  UFP que fue administrada por vía intra-vaginal. Se utilizaron cuatro grupos de animales formados por diez animales cada uno. El tratamiento consistió en utilizar una solución madre de MAS en PBS (2 mg/ml). Dos veces por día durante cinco días, el día de la inoculación y cuatro días p.i. los animales fueron topcados en la vagina con 20  $\mu$ l de la solución de MAS. Otro grupo recibió MAS por vía intra-peritoneal, otro grupo fue tratado con ACV (como control



positivo) y un cuarto grupo fue tratado con vehículo (PBS) como control. Los animales se observaron durante diez días. El 20% de los animales sin tratar sobrevivió a la infección y lo mismo sucedió con los ratones de los dos grupos de tratamiento realizados con meliacina. Todos los ratones tratados con ACV sobrevivieron. Si bien no parecería haber diferencias con respecto al porcentaje de supervivencia entre los ratones sin tratar y los tratados con MAS por cualquiera de las dos vías, se observó que los ratones tratados comienzan a morir 1 día después que los controles.

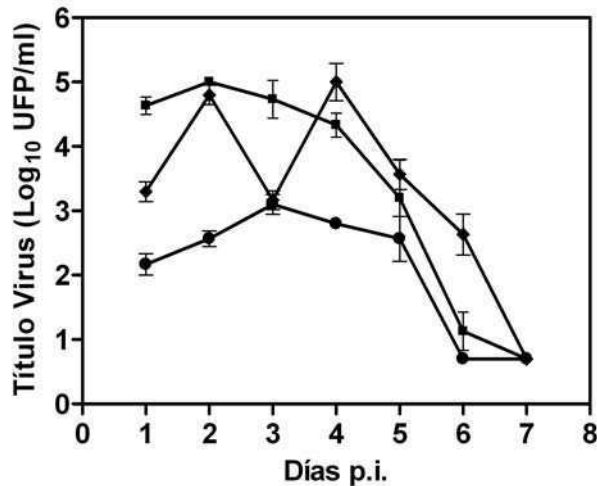
La diferencia entre los animales control y los tratados con MAS se ve mejor en la Figura 11, donde se puede observar que si bien el desarrollo de la enfermedad es parejo en los tres grupos de animales tratados durante los primeros días, y todos llegan a un grado de enfermedad promedio de entre 4 y 4,5, hay diferencias en el grado de severidad de la enfermedad entre los días 6 y 10 p.i. siendo más significativa cuando MAS se administra por vía i.v.



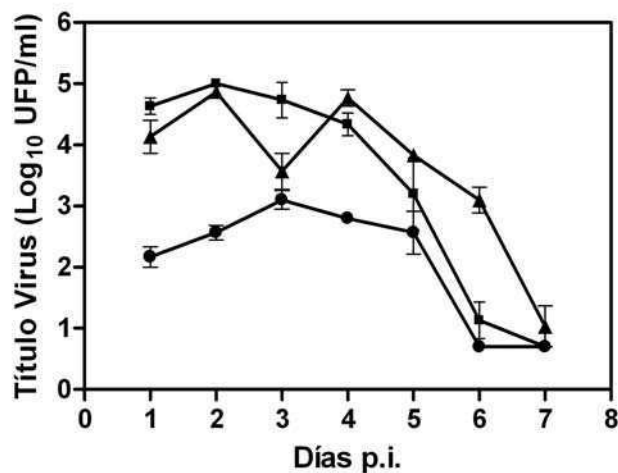
**Figura 11. Efecto del tipo de tratamiento con MAS en ratones infectados con HSV-2 MS.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) infectados en la vagina con  $1,5 \times 10^5$  UFP de HSV-2 MS y tratados con (■) PBS, (◆) MAS i.v., (▲) MAS i.p., (●) ACV i.v., fueron monitoreados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. El gráfico muestra el grado de enfermedad promedio en cada grupo de tratamiento en función del tiempo.

Las Figuras 12 y 13 muestran la carga viral en las vaginas de los animales infectados y tratados durante los días 1 a 7 p.i.. Como se puede observar, el tratamiento con ACV redujo considerablemente el título de virus en la vagina de los animales infectados, al día 1 p.i. ya hubo una disminución del título de 2,5 log con respecto a los animales control. Los tratamientos con MAS también redujeron la carga viral al día 1 p.i. en 1,3 log UFP/ml en el tratamiento con MAS i.v. (Figura 12) y en 0,5 log para el tratamiento con MAS i.p. (Figura 13) y luego aumentaron a los niveles de virus encontrados en el control. Llamativamente, al día 3 p.i. la carga viral en las vaginas de los ratones de los dos grupos de tratamiento con MAS presentaron títulos de virus al nivel encontrado en

las vaginas tratadas con ACV. Pero, a partir del día 4 p.i. el nivel de virus se mantuvo similar al determinado en los controles.



**Figura 12. Efecto del tipo de tratamiento con MAS en ratones infectados con HSV-2 MS.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) infectados en la vagina con  $1,5 \times 10^5$  UFP de HSV-2 MS fueron tratados con (■) PBS, (◆) MAS i.v., (●) ACV i.v.. A distintos días p.i. se realizaron lavados vaginales y se determinó el título viral por la técnica de UFP.

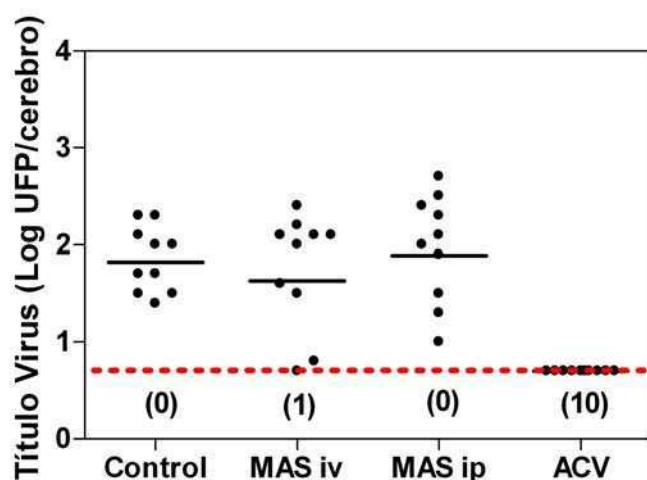


**Figura 13. Efecto del tipo de tratamiento con MAS en ratones infectados con HSV-2 MS.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) infectados en la vagina con  $1,5 \times 10^5$  UFP de HSV-2 MS fueron tratados con (■) PBS, (▲) MAS i.p., (●) ACV i.v.. A distintos días p.i. se realizaron lavados vaginales y se determinó el título viral por la técnica de UFP.

Si comparamos con la figura 10, parece muy importante que el título de virus al día 5 p.i. esté por debajo de  $10^3$  para no producir encefalitis, el aciclovir logra mantener el nivel de virus por debajo de este valor.

Al determinar la carga viral en el cerebro encontramos que los animales tratados con ACV, que fueron sacrificados al final del experimento, no presentaron niveles detectables de HSV-2 (Figura 14). En cuanto a los tratamientos con MAS, ninguno de los dos redujo el título de virus significativamente con respecto a los animales tratados con vehículo, pero produjeron una leve dispersión entre los títulos de virus de los cerebros de cada grupo que se ve reflejada por la media geométrica de éstos. Como se

puede observar en la figura 14, la media geométrica del tratamiento con MAS i.v. es levemente menor que la perteneciente a los animales control.



**Figura 14. Título de virus en el cerebro de animales infectados con HSV-2 MS y tratados con MAS.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) infectados en la vagina con  $1,5 \times 10^5$  UFP de HSV-2 MS fueron tratados con PBS, MAS i.v., MAS i.p., o ACV. Se determinó el título de virus en los cerebros al momento de la muerte o del sacrificio al final del experimento. La línea punteada roja muestra el límite de detección del método de UFP. La línea negra representa la media geométrica de los datos. Los números entre paréntesis muestran el número de ratones por grupo que no presentó virus detectable.

Estos resultados no fueron muy alentadores aunque sugieren que meliicina ejerció un efecto terapéutico leve que no llegó a evitar la muerte de los ratones. La evaluación de la carga viral en los cerebros confirma el hecho de que los ratones mueran por encefalitis ya que el título de virus en el cerebro de los animales tratados fue del orden del encontrado en los animales control con algunas diferencias en el tratamiento intra-vaginal.

Respecto al tratamiento con MAS no se observaron ventajas al administrarla por la vía intra-peritoneal por lo tanto no se procedió a utilizar esta vía en los próximos tratamientos. Por otro lado, consideramos la posibilidad de que la solución tópica no asegure la presencia del antiviral durante el tiempo necesario para actuar ya que al ser líquida existe la probabilidad de que sea expulsada de la vagina. Si bien se repitieron los experimentos con una suspensión madre de MAS de 2 mg/ml gelatina y glicerina (0,1 mg de gelatina/ ml de glicerina), que es la fórmula aproximada utilizada para la producción de óvulos ginecológicos. Los resultados obtenidos fueron similares a los expuestos para la solución en PBS. Finalmente decidimos administrar meliicina incorporándola a una crema en forma similar a la fórmula farmacéutica tópica del aciclovir.

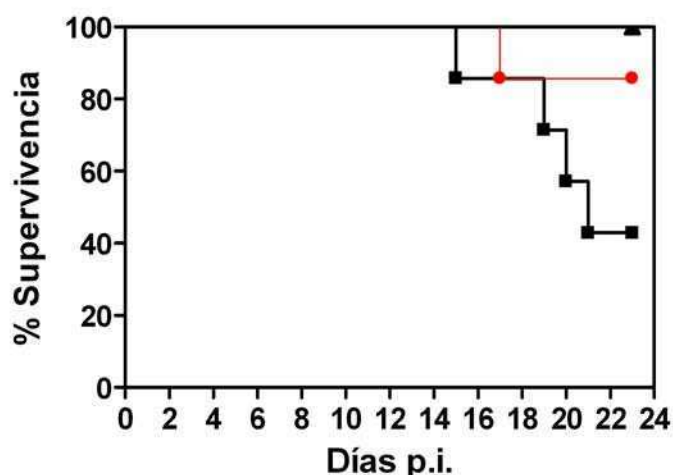
## Efecto del tratamiento con meliacina formulada en ungüento sobre la infección genital de ratones hembra

### HSV-2 cepa G

Con la intención de demostrar el potencial antiviral *in vivo* de meliacina los experimentos siguientes se realizaron utilizando MAS formulada en un excipiente de cera y vaselina sólida y líquida.

Realizamos una suspensión madre al 0,1% p/p y usamos una dosis de MAS de 50 mg. Ratones adultos hembras se inocularon con  $5 \times 10^5$  UFP de HSV-2 G en 20  $\mu$ l de PBS y luego se separaron en tres grupos de 10 animales cada uno, a un grupo se lo trató con ungüento solo, a otro con MAS y al tercero con ACV. Las topificaciones se realizaron dos veces por día durante los días -1, 0, 1, 2, 3 y 4 p.i.

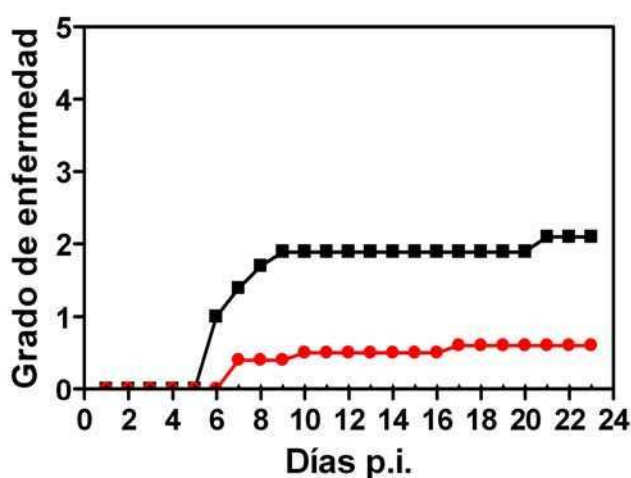
La figura 15 muestra que meliacina protege a los animales de desarrollar síntomas severos de la infección, a pesar de que la protección no es tan alta como la ejercida por el tratamiento con aciclovir utilizado como control. La supervivencia entre los animales infectados y no tratados fue del 42 %, mientras que el tratamiento con meliacina aumentó la supervivencia a un 86% y el aciclovir al 100%.



**Figura 15. Efecto del tratamiento local con MAS sobre la supervivencia de ratones infectados con HSV-2 G.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) infectados en la vagina con HSV-2 G fueron tratados con ungüento (■), MAS (●) o ACV (▲), dos veces al día durante 6 días. Los animales fueron monitoreados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. El gráfico muestra el porcentaje de supervivencia en cada grupo de tratamiento en función del tiempo.

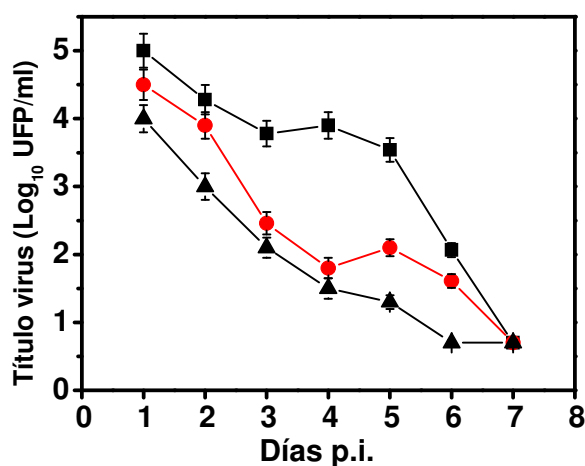
La inoculación de los animales por la ruta intra-vaginal con la cepa G del HSV-2 resultó ser moderadamente patogénica para los ratones confirmando datos de la figura 4. Los animales enfermos primero presentaron eritema genital seguido por inflamación moderada y lesiones genitales purulentas. Es remarcable el hecho de que los animales mueren sin presentar parálisis en sus patas traseras. La administración de MAS retardó

el tiempo de evolución del grado de enfermedad. La mayoría de los animales sin tratar presentaron eritema genital al día 6 p.i. que se transformó en inflamación genital moderada dos días más tarde. Como se puede ver en la Figura 16, al día 7 p.i. solo el 10% de los animales tratados con MAS presentó eritema genital seguido de inflamación moderada y muerte. Como se esperaba, los ratones tratados con ACV no desarrollaron síntomas de la enfermedad y ninguno murió. Por otro lado, la administración tópica de meliacina en ungüento a un grupo de animales sin infectar no produjo reacciones alérgicas u otros signos de toxicidad local o general.



**Figura 16. Efecto del tratamiento local con MAS sobre la evolución de la enfermedad en ratones infectados con HSV-2 G.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) infectados en la vagina con HSV-2 G fueron tratados con ungüento (■), MAS (●) o ACV (▲), dos veces al día durante 6 días. Los animales fueron monitoreados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. El gráfico muestra el grado de enfermedad promedio en cada grupo de tratamiento en función del tiempo.

La liberación de virus en las secreciones vaginales de los animales tratados con MAS o con ACV fue significativamente reducida ( $p < 0,05$ ) en comparación con los ratones sin tratar (Figura 17). La cinética de inhibición viral fue similar en los tres casos, aunque el ACV es más efectivo que MAS.



**Figura 17. Efecto del tratamiento local con MAS sobre el título de virus en la vagina de ratones infectados con HSV-2 G.** Ratones BALB/c hembra (n=10 por grupo) infectados en la vagina con HSV-2 G fueron tratados con ungüento (■), MAS (●) o ACV (▲), dos veces al día durante 6 días, se realizaron lavados vaginales a distintos tiempos p.i. y se determinó la carga viral por el método de UFP.

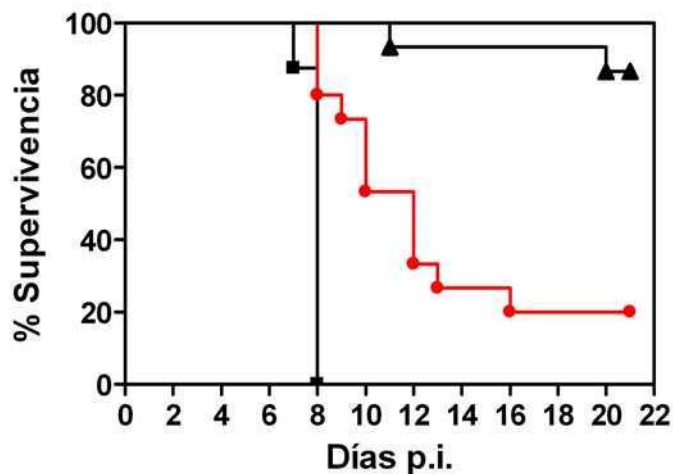
Es importante resaltar que mientras no hubo grandes diferencias entre el título de virus presente en los lavados vaginales de los animales tratados con ACV y MAS, el efecto protector fue notablemente mayor en el tratamiento con ACV ya que ninguno de los animales se enfermó (Figura 16).

Como conclusión podemos decir que el tratamiento con MAS retarda la aparición de las lesiones genitales y el comienzo de la enfermedad sistémica en animales infectados con la cepa G de HSV-2. La infección con esta cepa parece imitar la infección genital humana ya que la tasa de mortalidad es baja y aunque las lesiones genitales aparecen, tienden a curarse solas. (Koelle y col., 1998). Teniendo en cuenta esto y para asegurarnos de que meliacina pudiera actuar como antiviral, decidimos evaluar el efecto de la administración de MA sobre ratones infectados con la cepa MS de HSV-2, que en nuestras condiciones experimentales se comporta como una cepa virulenta que mata al 80-100% de los animales infectados por encefalitis precedida de parálisis en las patas traseras. Tomar el parámetro muerte evitaría la interpretación subjetiva de los signos clínicos observados.

### **HSV-2 cepa MS**

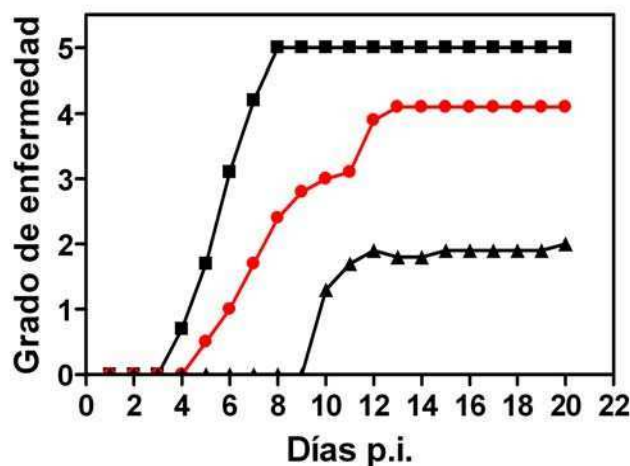
Para evaluar el efecto de meliacina sobre el modelo de infección con HSV-2 MS utilizamos un protocolo idéntico al descrito para la cepa G de HSV-2. En este caso los grupos estaban formados por 15 animales y fueron tratados con ungüento solo, MAS o ACV.

La inoculación intra-vaginal de  $1,5 \times 10^5$  UFP de HSV-2 MS alcanzó el 100% de mortalidad en los animales tratados con vehículo, mientras que el tratamiento con MAS incrementó significativamente la supervivencia de 0 a 20% y el tratamiento con ACV a más del 85% (Figura 18). Notablemente, mientras los animales control mueren casi todos al mismo tiempo (entre los días 7 y 8 p.i.), el tiempo de vida fue considerablemente extendido más allá del día 20 p.i. en los ratones tratados con MAS (Figura 18).



**Figura 18. Efecto del tratamiento local con MAS sobre la supervivencia de ratones infectados con HSV-2 MS.** Ratones BALB/c hembra (n=15 por grupo) infectados en la vagina con HSV-2 MS fueron tratados con ungüento (■), MAS (●) o ACV (▲), dos veces al día durante 6 días. Los animales fueron monitoreados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. El gráfico muestra el porcentaje de supervivencia en cada grupo de tratamiento en función del tiempo.

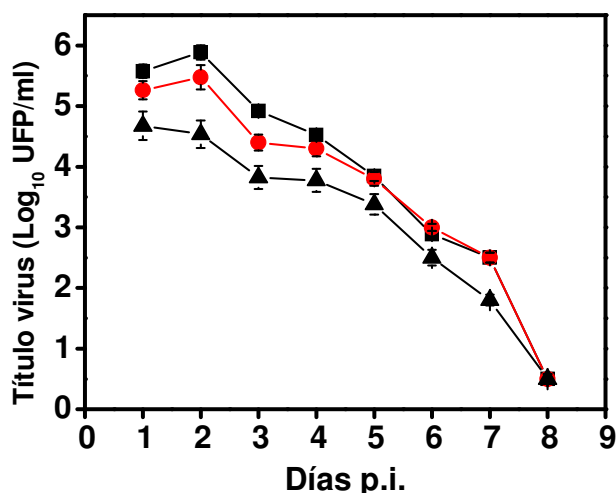
Como se puede observar en la Figura 19, los animales infectados y tratados con vehículo desarrollaron lesiones genitales al día 4 p.i. que fueron seguidas por una parálisis rápida la cual llevó a la muerte de los animales al día 8 p.i. El tratamiento con MAS retardó la evolución de la enfermedad. Los animales comenzaron a mostrar lesiones 1 día después que los controles y el comienzo de la parálisis de las patas traseras se extendió del día 6 al 12 p.i. Por otro lado, solo algunos ratones tratados con ACV se enfermaron al día 10 p.i. (Figura 19)



**Figura 19. Efecto del tratamiento local con MAS sobre la evolución de la enfermedad en ratones infectados con HSV-2 MS.** Ratones BALB/c hembra (n=15 por grupo) infectados en la vagina con HSV-2 MS fueron tratados con ungüento (■), MAS (●) o ACV (▲), dos veces al día durante 6 días. Los animales fueron monitoreados diariamente para seguir la evolución de la enfermedad. El gráfico muestra el grado de enfermedad promedio en cada grupo de tratamiento en función del tiempo.

Los fluidos vaginales de los animales tratados o no, fueron colectados durante 8 días p.i. y la cantidad de virus infeccioso presente fue titulado por el método de formación de placas. La Figura 20 muestra que el tratamiento con MAS redujo el título

de HSV-2 MS en los días 2 y 3 p.i. mientras que el tratamiento con ACV redujo significativamente la cantidad de HSV-2 MS desde el comienzo de la infección.

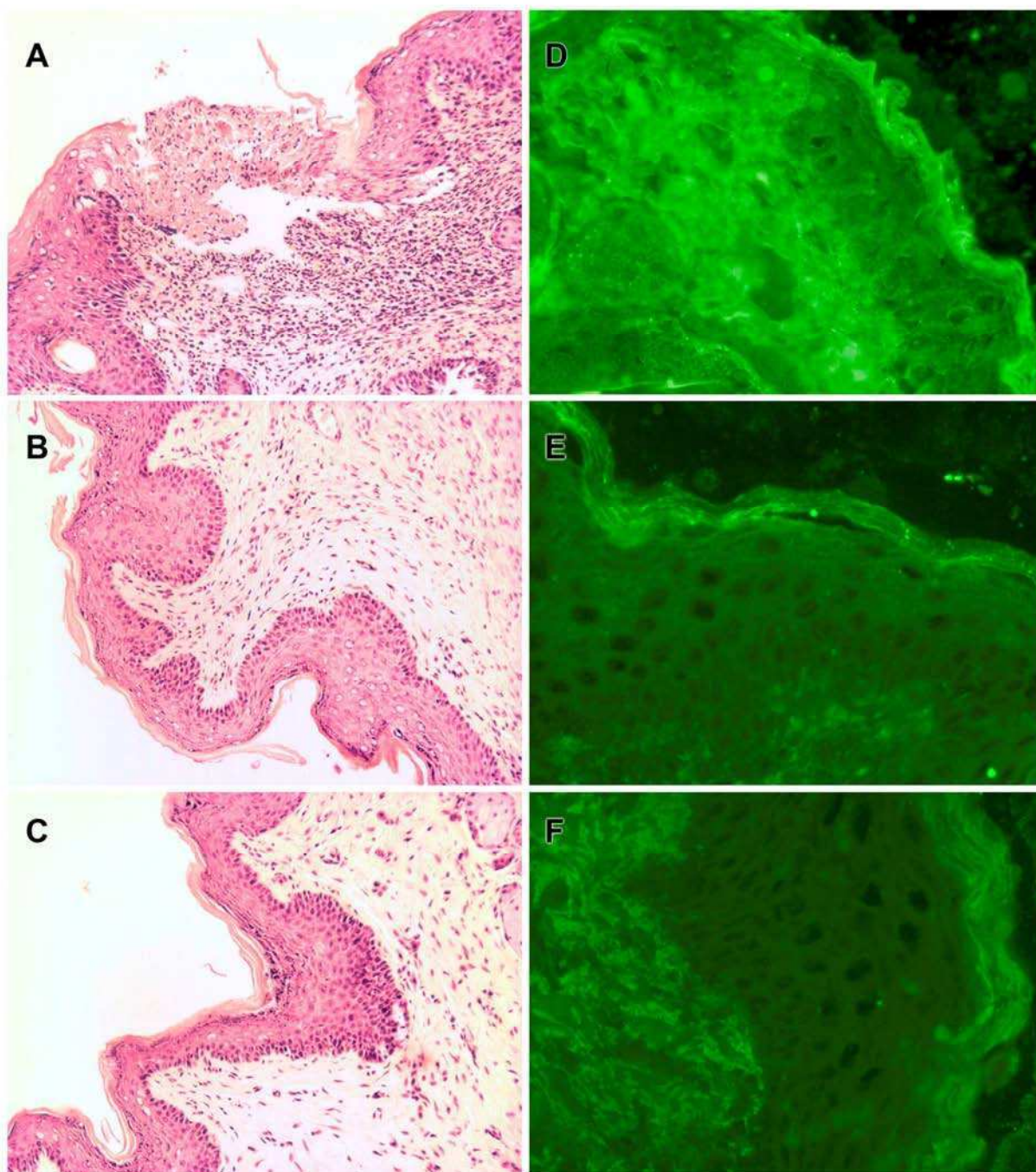


**Figura 20. Efecto del tratamiento local con MAS sobre el título de virus en la vagina de ratones infectados con HSV-2 MS.** Ratones BALB/c hembra (n=15 por grupo) infectados en la vagina con HSV-2 MS fueron tratados con ungüento (■), MAS (●) o ACV (▲), dos veces al día durante 6 días, se realizaron lavados vaginales a distintos tiempos p.i. y se determinó la carga viral por el método de UFP.

La protección llevada a cabo por el tratamiento con meliacina que mostramos en las Figuras 18, 19 y 20, fue confirmada cuando se realizaron los estudios del tejido vaginal. Al día 4 p.i. animales infectados o no y tratados con ungüento, MAS o ACV fueron sacrificados con motivo de obtener las vaginas de los ratones. Una vez obtenido el tejido, se realizaron inclusiones en parafina para poder realizar cortes con micrótopo. Con los cortes de tejido se hicieron tinciones histológicas e inmunofluorescencia indirecta contra antígenos de HSV-2. El tratamiento con MAS en animales sin infectar no produce ninguna reacción adversa (datos que no se muestran). En cambio, el tejido vaginal obtenido de ratones infectados y tratados con vehículo presentó lesiones herpéticas típicas con infiltración de linfocitos (Figura 21A), mientras que las vaginas de los ratones infectados y tratados con MAS (Figura 21 B) o con ACV (Figura 21 C) no.

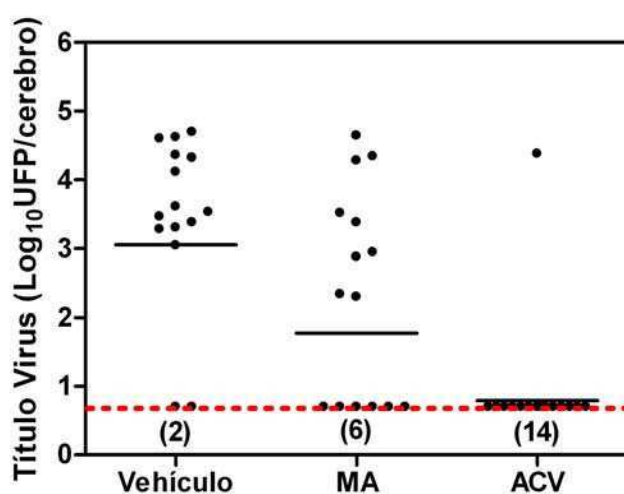
La presencia del virus fue revelada en todos los cortes de animales infectados por los anticuerpos anti-herpes. Los tejidos vaginales de los ratones sin tratar presentaron una fluorescencia intensa (Figura 21 D) mientras que los tejidos de los animales tratados presentaron una tinción moderada (Figura 21E-F). No se detectó fluorescencia en las vaginas de animales sin infectar (datos que no se muestran)





**Figura 21. Inmunofluorescencia e histología en cortes de vagina de animales infectados con HSV-2 MS.** Ratones BALB/c hembra fueron infectados con HSV-2 MS y tratados con MAS y ACV. Al día 4 p.i. los animales fueron sacrificados para obtener el tejido vaginal. Se realizaron tinciones histológicas (A-C) e inmunofluorescencia contra HSV-2 (D-F). Tratamiento con vehículo en animales infectados (A y D), tratamiento con MAS (B y E), tratamiento con ACV (C y F). Imágenes capturadas por una lente 20x y representativas de 3 animales distintos.

Teniendo en cuenta los estudios preliminares realizados para seguir la evolución del virus, donde aproximadamente al día 6 p.i. el virus desaparece de la vagina y comienza a migrar al cerebro (Figura 10) momento en el cual comienzan a morir los animales, quisimos investigar el efecto del tratamiento con MAS o ACV sobre la presencia de virus en el cerebro. Para esto, los animales fueron congelados al momento de su muerte o de su sacrificio, para la posterior titulación del virus en los homogenatos obtenidos de los cerebros. La Figura 22 muestra que el tratamiento con MAS lleva a una gran dispersión en el título de virus entre los animales tratados, entre los cuales hubo 6 que no presentaron niveles detectables de virus y solo 5 de 15 cerebros (33%) alcanzaron un título de 3 log UFP. Esta dispersión difiere de la observada para los animales control donde la mayoría de los cerebros (87%) tienen un título de virus mayor a 3 log UFP por cerebro. En el caso del ACV sólo el cerebro de un animal presentó niveles detectables de virus. Creemos que a este hecho se debe el efecto altamente protector de este antiviral.



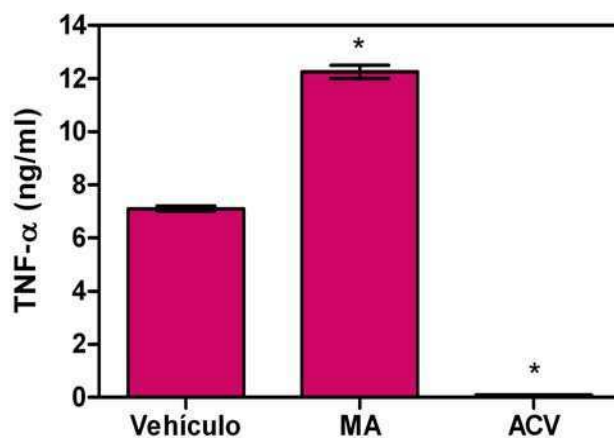
**Figura 22. Título de virus en el cerebro de animales infectados con HSV-2 MS y tratados con MAS.** Ratones BALB/c hembra (n=15 por grupo) infectados en la vagina con  $1,5 \times 10^5$  UFP de HSV-2 MS fueron tratados con vehículo, MAS i.v. o ACV. Se determinó el título de virus en los cerebros al momento de la muerte o del sacrificio al final del experimento. La línea punteada roja muestra el límite de detección del método de UFP. La línea negra representa la media geométrica de los datos. Los números entre paréntesis muestran el número de ratones por grupo que no presentó virus detectable

Teniendo en cuenta estos resultados junto con la observación de que los animales tratados con meliacina presentaron una sobrevivencia considerable con respecto a los no tratados, nosotros postulamos que el tratamiento con MAS retarda el arribo del virus al cerebro.

Los resultados presentados hasta aquí indican que meliacina ejerce un efecto terapéutico sobre la infección de animales con la cepa MS de HSV-2 que es altamente virulenta.

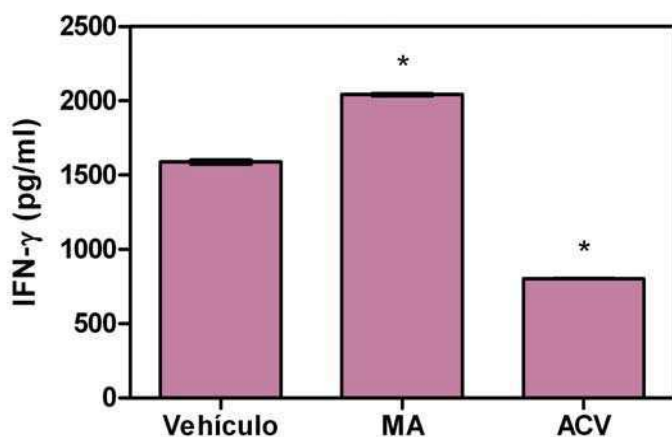
## Detección de citoquinas en los fluidos vaginales

Teniendo en cuenta el efecto terapéutico de meliacina a pesar de no haber reducido significativamente el título de virus en la vagina, nos preguntamos si este efecto podría deberse a que MAS estuviera de alguna manera reforzando la respuesta innata del animal. Para explorar la posibilidad de que MAS pudiera afectar la producción local de citoquinas *in vivo*, determinamos la presencia de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en los fluidos vaginales de los ratones infectados con la cepa MS de HSV-2 tratados o no. La determinación de las citoquinas se llevó a cabo en fluidos vaginales tomados al día 5 p.i. de animales infectados y tratados con vehículo, MAS o ACV (cuatro lavados por grupo de tratamiento seleccionados al azar). Encontramos que la administración local de meliacina duplica la cantidad de TNF- $\alpha$  presente respecto de los animales controles tratados solo con vehículo de  $7 \pm 0,9$  ng/ml a  $12,15 \pm 0,92$  ng/ml ( $p < 0,05$ ). En los ratones tratados con ACV, el nivel de TNF- $\alpha$  fue indetectable (Figura 23).



**Figura 23. Detección de TNF- $\alpha$  en fluidos vaginales de ratones infectados con HSV-2 MS.** Fluidos vaginales de ratones infectados y tratados con vehículo, MAS o ACV fueron colectados al día 5 p.i. y se midieron los niveles de TNF- $\alpha$  utilizando un bioensayo. Los datos muestran el promedio y el desvío estándar de cuatro muestras independientes. Las diferencias significativas relativas al tratamiento con vehículo son señaladas con un asterisco ( $p < 0,05$ , ANOVA de una vía seguida del test de Tukey).

La exploración de la presencia de IFN- $\gamma$  en los fluidos vaginales, presentada en la Figura 24, demostró que hubo un incremento en la producción de esta citoquina en los ratones tratados con MAS ( $2050 \pm 63$  pg/ml) en comparación con aquellos sin tratar ( $1240 \pm 59$  pg/ml) o los tratados con ACV ( $784 \pm 58,5$  pg/ml) ( $p < 0,05$ ), de todas maneras el incremento del IFN- $\gamma$  no es tan alto como en el caso del TNF- $\alpha$ .



**Figura 24. Detección de IFN- $\gamma$  en fluidos vaginales de ratones infectados con HSV-2 MS.** Fluidos vaginales de ratones infectados y tratados con vehículo, MAS o ACV fueron colectados al día 5 p.i. y se midieron los niveles de IFN- $\gamma$  por la técnica de ELISA. Los datos muestran el promedio y el desvío estándar de cuatro muestras independientes. Las diferencias significativas relativas al tratamiento con vehículo son señaladas con un asterisco ( $p < 0,05$ , ANOVA de una vía seguida del test de Tukey).

Estos resultados demuestran que hubo un aumento de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en los fluidos vaginales de los animales tratados tópicamente con MAS formulada en ungüento, aunque no podemos saber sobre qué tipo celular estaría actuando meliicina para llevar a la producción y liberación de estas citoquinas.

De los experimentos realizados *in vivo* podemos concluir que: i) MAS ejerció un efecto terapéutico en los animales infectados en la vagina con el virus herpes que dependió no solo de la vía de tratamiento sino también del vehículo con el que se administró; ii) la magnitud del efecto ejercido por MAS estuvo relacionada con la virulencia de la cepa de virus utilizada, ya que mientras con la cepa G redujo la muerte considerablemente, con la cepa neurotóxica prolongó la supervivencia de los animales pero finalmente murió el 80% de los mismos; iii) MAS aumentó la producción de citoquinas en los fluidos vaginales, tanto el IFN- $\gamma$  como el TNF- $\alpha$  presentaron niveles significativamente mayores que los animales control o tratados con ACV.

Desde el punto de vista de los objetivos de esta tesis consideramos que si bien meliicina no puede compararse con el antiviral aciclovir es probable que aumentando la concentración y el número de dosis por día durante más tiempo se logren resultados significativos. Pero antes de explorar esa posibilidad que requiere un número muy grande de animales y consumo de tiempo decidimos explorar un sistema más sencillo (*in vitro*), la posibilidad de que meliicina estuviera actuando como un refuerzo de la respuesta inmune natural.

**INTERACCIÓN DE MELIACINA CON LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE  
IFN- $\alpha$  E IFN- $\gamma$  EN CÉLULAS VERO INFECTADAS CON HSV-1 Y HSV-2**

## Introducción

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados *in vivo* sugieren que la administración de meliacina en animales infectados con HSV-2 ejerce un efecto protector ya que la supervivencia de los animales aumentó, la severidad de la enfermedad disminuyó y los animales tuvieron mayor sobrevivencia. Por otro lado, aunque el tratamiento con MAS redujo la cantidad de virus en el cerebro de los animales infectados, no hubo una disminución significativa del título de virus en los lavados vaginales. Estos resultados, junto con la evidencia de que la concentración de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  está aumentada en los lavados vaginales de los ratones tratados con MAS con respecto al control y al tratamiento con aciclovir, nos llevaron a preguntarnos si existía la posibilidad de que meliacina estuviera interfiriendo con la acción que algunas citoquinas ejercen sobre la actividad antiviral innata del animal.

Los interferones tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) y los interferones tipo II (IFN- $\gamma$ ) son componentes importantes de la respuesta inmune del huésped a las infecciones virales. El IFN- $\alpha$  y el IFN- $\beta$  son producidos por la mayoría de las células como una respuesta a la infección viral. La activación de los receptores para IFN- $\alpha/\beta$  modifica los patrones de transcripción y traducción induciendo a las células a un estado antiviral. En contraste, el IFN- $\gamma$  es sintetizado casi exclusivamente por células T y NK activadas en respuesta a células infectadas por virus y se une a un receptor distinto. Además, el IFN- $\gamma$  es una citoquina inmunoregulatoria muy potente que también inhibe la replicación de determinados virus *in vivo* (Sainz y Halford, 2002).

Estudios previos indican que los IFN tipo I y tipo II por separado no son inhibidores efectivos de HSV-1 *in vitro* (Harle y col., 2002), pero producen un efecto sinérgico en la inhibición de la replicación cuando son agregados en forma combinada tanto *in vitro* como *in vivo* (Sainz y Halford, 2002). Teniendo en cuenta el sinergismo producido por estas citoquinas y debido al aumento de IFN- $\gamma$  observado en los animales tratados con MAS, decidimos evaluar la acción de este antiviral sobre el efecto antiherpético producido por los interferones por separado o en forma combinada sobre células Vero. Como no contábamos con datos previos acerca del efecto antiviral producido por los interferones sobre la replicación de HSV-2, comenzamos evaluando la acción antiviral de los interferones sobre este virus.

## **Efecto antiviral de IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ y su combinación sobre la formación de placas de HSV-2**

### **Puesta a punto del modelo**

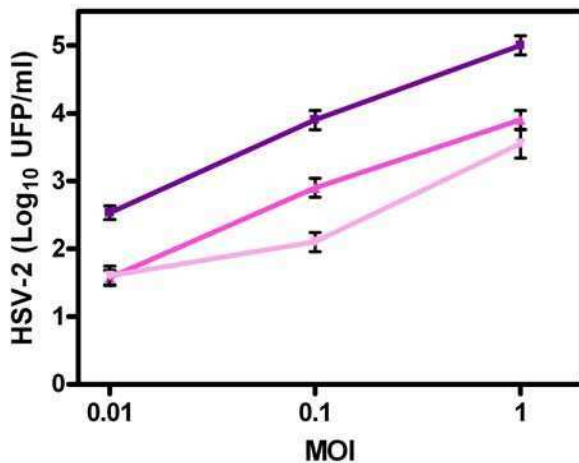
Debido a que la primera defensa contra la infección herpética es llevada a cabo por el IFN- $\alpha/\beta$  y por el sinergismo producido entre éste y el IFN- $\gamma$ , quisimos evaluar si la administración de meliacina podía interferir de alguna manera con esta interacción.

Datos publicados por (Sainz y Halford, 2002) señalan que en presencia de ambos IFN la actividad anti- HSV-1 se sinergiza. Como no había datos en la bibliografía sobre HSV-2 debimos establecer si ocurría lo mismo que para HSV-1. Por otra parte en los experimentos usamos HSV-1 como control.

Para esto, realizamos experimentos infectando células Vero con HSV-2 y tratándolas con IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o la combinación de ambos en presencia o ausencia de meliacina bajo diferentes condiciones experimentales.

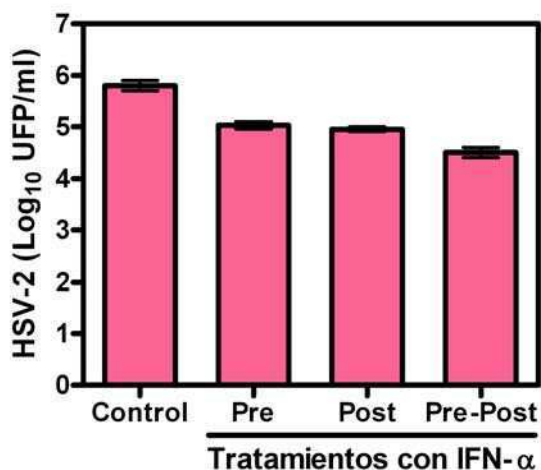
### **Determinación de la moi adecuada**

En primer lugar quisimos establecer la cantidad de virus necesaria para llevar a cabo los experimentos. Para ello, cultivos de células Vero conteniendo  $10^4$  células por pocillo, fueron tratados durante 16 h con vehículo o IFN- $\alpha$  humano e infectadas con  $10^4$ ,  $10^3$ , o  $10^2$  UFP de HSV-2 MS (moi de 1, 0,1 y 0,01 respectivamente). Luego de la infección, se retiró el inóculo viral y se volvió a agregar IFN- $\alpha$  durante 24 h, momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento viral por la técnica de formación de placas. La figura 25 muestra que el rendimiento de HSV-2 MS aumenta en función de la moi utilizada y que el tratamiento de las células con el IFN- $\alpha$  disminuye el título viral en función de la concentración utilizada, ya que el agregado de 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  produce una inhibición menor que el agregado de 200 UI/ml. De todas maneras, se puede apreciar que la disminución del título de virus es significativa en ambos casos. Basándonos en estos resultados decidimos trabajar siempre usando una moi de 1.



**Figura 25. Multiplicación de HSV-2 MS en función de la moi utilizada.** Células Vero fueron tratadas con vehículo (■), 100 UI/ml (■), o 200 UI/ml (■) de IFN- $\alpha$  durante 16 h, se infectaron con distintas moi de HSV-2 MS y luego de la adsorción se descartó el inóculo y se volvieron a agregar las citoquinas en las concentraciones mencionadas hasta las 24 h p.i. Los sobrenadantes fueron cosechados y el título viral se determinó por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

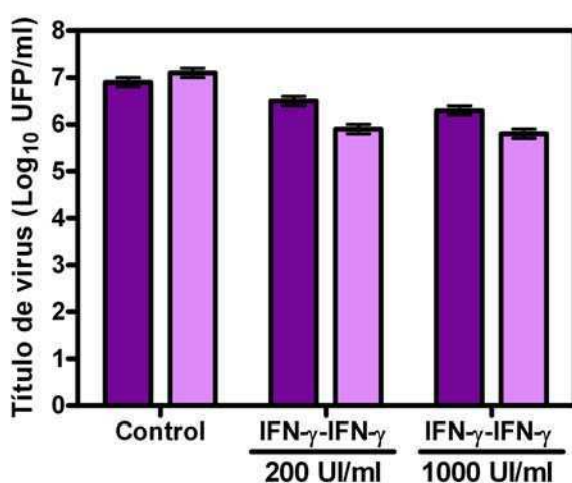
Según los datos bibliográficos, los tratamientos realizados con IFN son siempre prolongados, realizándose desde 16 h antes de la infección hasta 24 h después. Quisimos averiguar si se podía obtener la misma inhibición viral usando tratamientos a tiempos más cortos. Para ello, células Vero fueron infectadas con HSV-2 MS a una moi de 1 y se realizaron pretratamientos de 16 h antes de la infección, postratamientos de 24 h luego de la infección ó pre y postratamientos con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$ . Como se puede observar en la figura 26, si bien hay una inhibición de 0,7 log cuando el tratamiento se realiza antes o después de la infección, esta inhibición aumenta a 1,3 log cuando se realiza el tratamiento continuo desde antes de la infección hasta el final del experimento. Por lo tanto decidimos hacer las inducciones con los IFN durante el tiempo completo, para trabajar en las condiciones óptimas de inhibición para estas citoquinas.



**Figura 26. Multiplicación de HSV-2 MS en función del tratamiento con IFN- $\alpha$ .** Células Vero fueron infectadas con HSV-2 a una moi de 1 y pretratadas, postratadas o pre-postratadas con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$ . A las 24 h, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó el título viral por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes



Otro dato que aparece en la bibliografía es la concentración a la cual son activos los IFN contra HSV-1. En los trabajos anteriores se usaron 100 o 200 UI/ml de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  ya que a concentraciones mayores el efecto parece ser el mismo. Para determinar si nuestro sistema era similar al utilizado en los trabajos con HSV-1, realizamos inducciones con 200 o 1000 UI/ml de IFN- $\gamma$  antes y después de la infección con HSV-1 KOS o HSV-2 MS. No se observaron diferencias entre la inhibición producida por el tratamiento con 200 o 1000 UI/ml de IFN- $\gamma$  en las células infectadas con HSV-2 o HSV-1 (figura 27). Sin embargo como se puede observar, la inhibición producida por el IFN- $\gamma$  es mayor en células infectadas con HSV-1, con lo cual podemos postular que el HSV-2 es menos susceptible a la inhibición por IFN- $\gamma$  que el HSV-1.



**Figura 27. Multiplicación de HSV en función de la concentración de IFN- $\gamma$ .** Células Vero fueron infectadas con HSV-1 (■) o HSV-2 (■) a una moi de 1 y tratadas durante las 16 h previas a la infección y las 24 h posteriores con 200 o 1000 UI/ml de IFN- $\gamma$ . A las 24 h, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó el título viral por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

### Efecto de IFN $\alpha$ y $\gamma$ sobre la formación de placas de HSV-1 y HSV-2 en células Vero

Una vez puesto a punto el sistema, se realizaron los experimentos para evaluar la acción inhibitoria de los interferones por separado o en forma combinada. Células Vero fueron pretratadas durante 16 h con 100 UI/ml de los interferones por separado o en combinación y luego infectadas con las cepas MS o G de HSV-2 a una moi de 1. También se realizaron como control experimentos en paralelo con las cepas F y KOS de HSV-1. La eficiencia de la formación de placas de las cepas F y KOS de HSV-1 fue levemente reducida por la presencia de IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  solos, mientras que la

combinación de los interferones actuó en forma sinérgica como había sido reportado previamente (Sainz y Halford, 2002).

El tratamiento simultáneo de las células Vero con IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  redujo 3,8 veces la formación de placas de HSV-2 cepa MS y 8,6 veces con la cepa G en comparación con el efecto producido por los interferones solos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de IFN  $\alpha$  y  $\gamma$  sobre la formación de placas de HSV-1 y HSV-2 en células Vero.

	Tratamiento (U/ml) <sup>a</sup>	Media no. de placas <sup>b</sup> $\pm$ SEM	Reducción <sup>c</sup>
HSV-1 KOS	Vehículo	133 $\pm$ 8.2	-
	IFN- $\alpha$ (100)	68.5 $\pm$ 5.9	1.9
	IFN- $\gamma$ (100)	74.5 $\pm$ 6.1	1.8
	IFN- $\alpha$ (100) + IFN- $\gamma$ (100)	4 $\pm$ 1.4	<b>33</b>
	IFN- $\alpha$ (200)	54.5 $\pm$ 5.2	2.4
	IFN- $\gamma$ (200)	84.5 $\pm$ 6.5	1.6
HSV-1 F	Vehículo	100 $\pm$ 7.1	-
	IFN- $\alpha$ (100)	82.5 $\pm$ 6.4	1.2
	IFN- $\gamma$ (100)	84.5 $\pm$ 6.5	1.2
	IFN- $\alpha$ (100) + IFN- $\gamma$ (100)	19 $\pm$ 3.1	<b>5.3</b>
	IFN- $\alpha$ (200)	51.5 $\pm$ 5.1	1.9
	IFN- $\gamma$ (200)	53 $\pm$ 5.1	1.9
HSV-2 MS	Vehículo	137 $\pm$ 8.3	-
	IFN- $\alpha$ (100)	82.5 $\pm$ 6.4	1.7
	IFN- $\gamma$ (100)	86 $\pm$ 6.6	1.6
	IFN- $\alpha$ (100) + IFN- $\gamma$ (100)	36.5 $\pm$ 4.3	<b>3.8</b>
	IFN- $\alpha$ (200)	68 $\pm$ 5.8	2
	IFN- $\gamma$ (200)	72 $\pm$ 6	1.9
HSV-2 G	Vehículo	98.5 $\pm$ 7	-
	IFN- $\alpha$ (100)	81 $\pm$ 6.4	1.2
	IFN- $\gamma$ (100)	98 $\pm$ 7	1
	IFN- $\alpha$ (100) + IFN- $\gamma$ (100)	11.5 $\pm$ 2.4	<b>8.6</b>
	IFN- $\alpha$ (200)	52 $\pm$ 5.1	1.9
	IFN- $\gamma$ (200)	35 $\pm$ 4.2	2.8

<sup>a</sup> Células Vero tratadas continuamente con IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o la combinación de estas citoquinas desde 16 h antes de la infección hasta el final del experimento.

<sup>b</sup> Número de placas formadas en células Vero inoculadas con 150 UFP de HSV-1 KOS y F y HSV-2 MS y G.

<sup>c</sup> La reducción se calculó como el N<sup>o</sup> de placas en control/número de placas en el tratamiento.

El nivel de inhibición alcanzado por la combinación de los interferones no fue debido a que la cantidad de IFN estaba duplicada en el cultivo ya que, como se puede

ver en el cuadro 1, el aumento de 100 a 200 UI/ml de IFN no produjo una inhibición mayor de HSV-1 o HSV-2.

Estos resultados indican que la replicación de HSV-2 en células Vero es más susceptible a la combinación de los interferones que a cada uno por separado. El sinergismo parece ser dependiente de la cepa de virus utilizada y además HSV-2 es menos susceptible que HSV-1.

### **Efecto de IFN $\alpha$ y $\gamma$ sobre el rendimiento viral de HSV-1 y HSV-2 en células Vero**

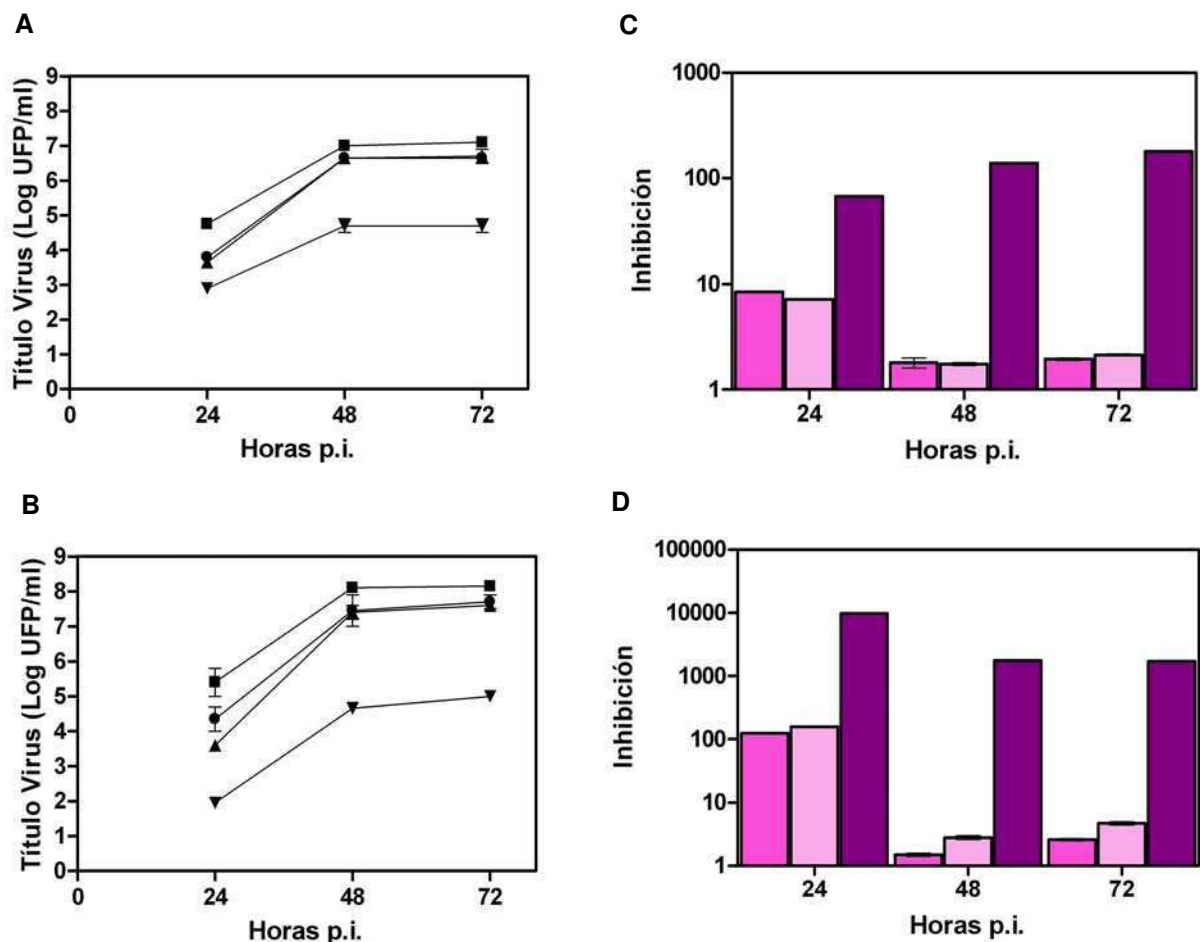
Para poder caracterizar el efecto inhibitorio del tratamiento con IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  sobre la replicación de HSV-2, se realizaron ensayos de crecimiento viral durante tres días. Cultivos de células Vero pretratados durante 16 h con 100 UI/ml de los interferones por separado o en combinación fueron infectados con HSV-2 cepas MS o G a una moi de 1, los sobrenadantes de los cultivos fueron cosechados a las 24, 48 y 72 h post infección para su posterior titulación. Se realizaron tratamientos similares en paralelo con células infectadas con HSV-1 cepas F y KOS como control. Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos en el cuadro 3.

Se observó que la inhibición de la replicación de HSV-2 en células Vero fue mucho mayor al ser tratadas con los interferones en combinación que por separado, a pesar de que cada interferón por separado mostró una mayor actividad antiviral que en el caso del ensayo de reducción de placas (Figura 28). En cultivos tratados con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ , la replicación de las cepas MS y G fue reducida 8 y 100 veces respectivamente ( $p < 0,001$ ) a las 24 h p.i. (Figura 28a y 28b). A las 48 y a las 72 h, los cultivos tratados con IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  presentaron títulos de virus cercanos a los encontrados en los cultivos control. Sin embargo, hubo una reducción del título de 2 veces en el caso de la cepa MS y de 2 y 3 veces en el caso de la cepa G a esos tiempos (Figura 28c y 28d).

Las cepas de HSV-2 presentaron distinta susceptibilidad a la combinación de los interferones, hubo diferencias en el efecto inhibitorio ejercido por los interferones en forma conjunta. Los títulos de HSV-2 cepa MS fueron reducidos 100 veces aproximadamente con respecto a las células Vero sin tratar, a todos los tiempos estudiados. En el caso de la cepa G de HSV-2, la combinación de interferones redujo el título viral 10000 veces a las 24 h y 2000 veces a las 48 y 72h en comparación con el

control. Estos resultados indican que la combinación de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  sinergiza el efecto antiviral contra HSV-2 en una forma similar a la reportada previamente, y confirmada por nosotros, para HSV-1 (Figura 29).

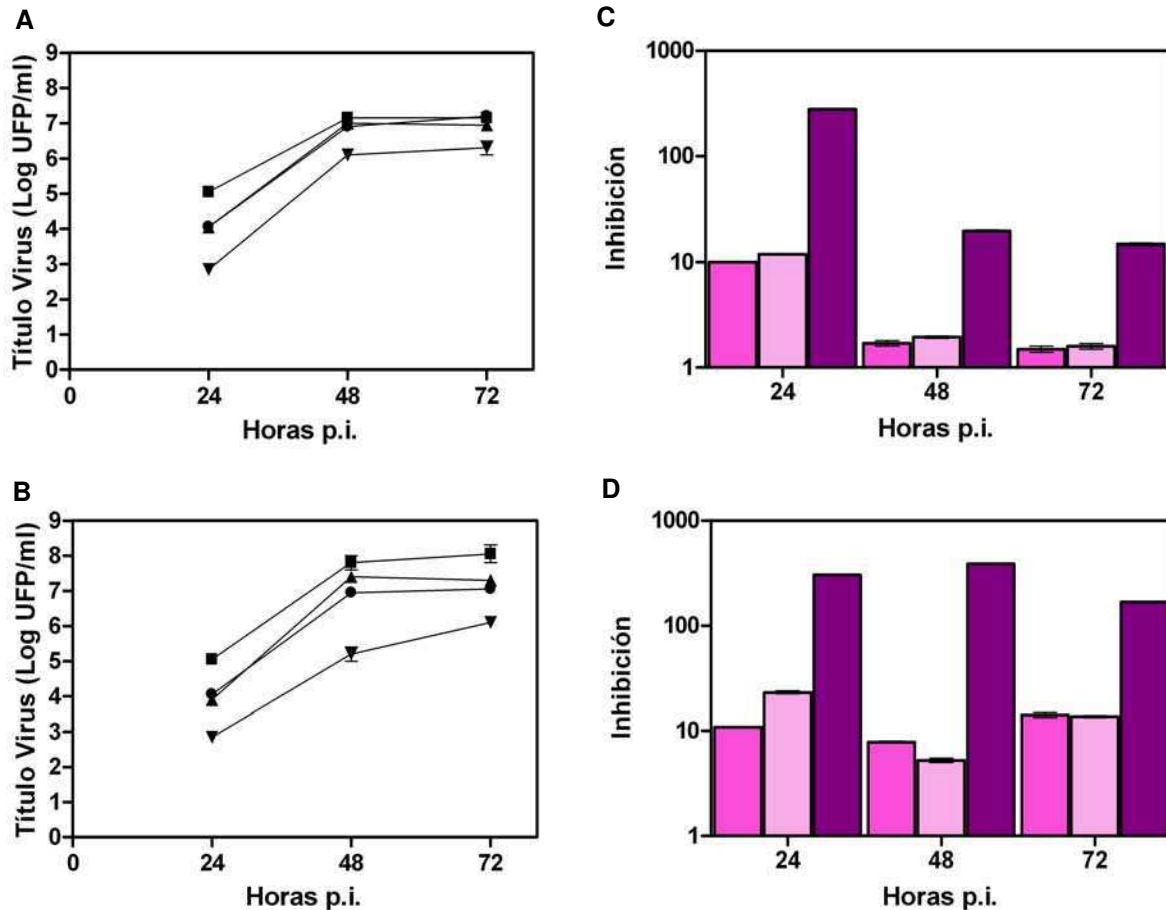
En cuanto a la inhibición de la replicación de HSV-1, comprobamos que fue mucho mayor al tratar las células con los interferones en combinación que por separado, no obstante cada interferón por separado mostró una mayor actividad antiviral que en el caso del ensayo de reducción de placas (Figura 29), igual que para los ensayos con HSV-2.



**Figura 28. Efecto del IFN- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  sobre la replicación de HSV-2.** Células Vero tratadas con vehículo (■), con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  (●) ó IFN- $\gamma$  (▲) o la combinación de ambos (▼) durante 16 h antes de la infección con HSV-2 cepa MS (A, C) o cepa G (B, D) a una moi de 1. Los sobrenadantes fueron cosechados a los días indicados y se determinó el título viral por el método de UFP. (C y D) Promedio de la inhibición en la replicación viral en células tratadas con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  (■), IFN- $\gamma$  (●) o ambos (▲) calculada como título viral en control/ título viral en tratamiento. Las diferencias fueron significativas usando un ANOVA de una vía seguido del test de Tukey ( $p < 0,001$ ).

En cultivos tratados con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ , la replicación de las cepas KOS y F fue reducida 10 veces ( $p < 0,001$ ) a las 24 h p.i. (Figura 29a y 29b). A las 48 y a las 72 h, los cultivos infectados con HSV-1 KOS y tratados con IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  presentaron

títulos de virus cercanos a los encontrados en los cultivos control. Sin embargo, hubo una reducción del título de 10 veces en el caso de la cepa F a las 48 y 72 h (Figura 29c y 29d).



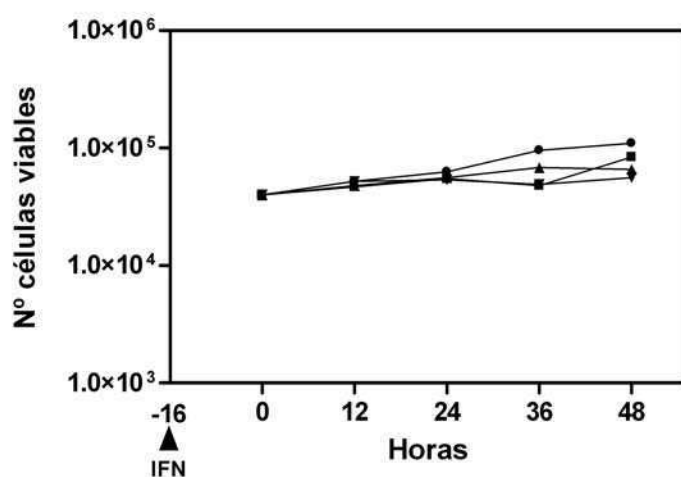
**Figura 29. Efecto del IFN- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  sobre la replicación de HSV-1.** Células Vero tratadas con vehículo (■), con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  (●) ó IFN- $\gamma$  (▲) o la combinación de ambos (▼) durante 16 h antes de la infección con HSV-1 cepa KOS (A, C) o cepa F (B, D) a una moi de 1. Los sobrenadantes fueron cosechados a los días indicados y se determinó el título viral por el método de UFP. (C y D) Promedio de la inhibición en la replicación viral en células tratadas con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  (■), IFN- $\gamma$  (●) o ambos (▲) calculada como título viral en control/ título viral en tratamiento. Las diferencias fueron significativas usando un ANOVA de una vía seguido del test de Tukey ( $p < 0,001$ ).

En el caso de los cultivos infectados con HSV-1 y tratados con la combinación de los interferones no hubo grandes diferencias en el efecto inhibitorio ejercido sobre las distintas cepas. En las células infectadas con la cepa KOS de HSV-1, la combinación de interferones redujo el título viral 300 veces a las 24 h y 20 veces a las 48 y 72h en comparación con el control. Los títulos de HSV-1 cepa F fueron reducidos 300 veces aproximadamente con respecto a las células Vero sin tratar, a todos los tiempos estudiados. Estos resultados confirman que la combinación de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$

produce una inhibición de la replicación de HSV-1 de tipo sinérgica que coincide con la reportada previamente.

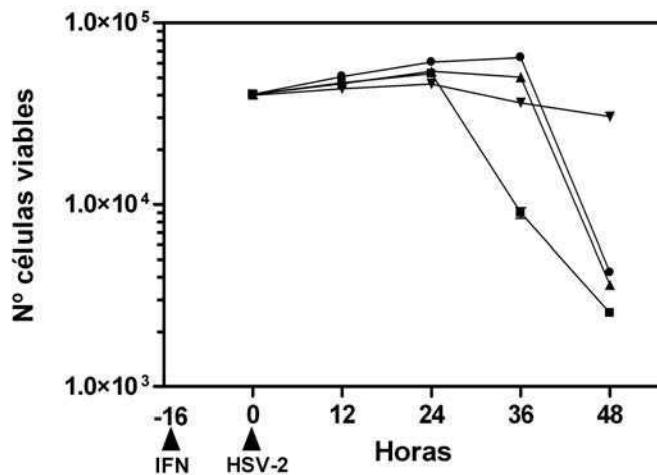
### Efecto protector de IFN $\alpha$ y $\gamma$ sobre la acción citopática de HSV-1 y HSV-2 en células Vero

Debido a que en los experimentos realizados los interferones están en contacto con las células durante un largo tiempo, nos pareció importante evaluar la viabilidad celular para descartar que los interferones produjeran algún efecto citotóxico y de esta manera pudieran interferir simulando una actividad antiviral. Con este fin, células Vero fueron tratadas durante 16 h con IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o la combinación de ambos. Luego de transcurrido ese tiempo, las monocapas fueron infectadas con la cepa KOS de HSV-1 o la cepa MS de HSV-2 a una moi de 1, después de la hora de adsorción se les agregó medio de cultivo fresco con o sin IFN y se dejó hasta finalizar el experimento. Se observó la morfología celular mediante la utilización de un microscopio y se determinó el número de células viables a las 0, 12, 24, 36 y 48 h mediante la técnica de MTT. El tratamiento de las células con IFN no afectó la proliferación ni la morfología celular en comparación con las células sin infectar y tratadas con medio de cultivo sólo (Figura 30).



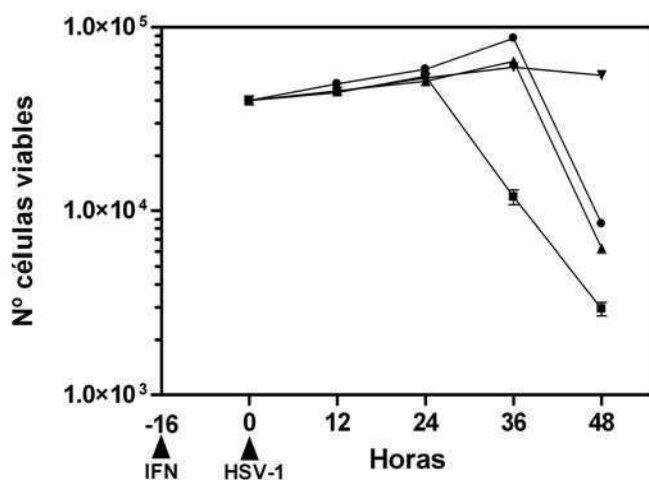
**Figura 30. Citotoxicidad del IFN- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  sobre células Vero sin infectar.** Células Vero sin infectar fueron sometidas al ensayo de MTT para obtener el número de células viables a distintos tiempos luego de ser tratadas con vehículo (■), 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  (●), 100 UI/ml de IFN- $\gamma$  (▲), IFN- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  (▼).

A las 48 h, la infección con la cepa MS de HSV-2 destruyó el 87,5% de las células tratadas con vehículo (Figura 31).



**Figura 31. El tratamiento con IFN protege a las células infectadas con HSV-2 del efecto citopático viral.** Células Vero infectadas con HSV-2 MS fueron sometidas al ensayo de MTT para obtener el número de células viables a distintos tiempos luego de ser tratadas con vehículo (■), 100 UI/ml de IFN-α (●), 100 UI/ml de IFN-γ (▲), IFN-α + IFN-γ (▼).

El tratamiento con IFN-α o IFN-γ retardó la aparición de la acción citopática en los cultivos infectados e incrementó la fracción de células viables entre las 24 y 36 h p.i.. Además, a las 48 p.i., los cultivos presentan la apariencia de las células tratadas con vehículo. Por el contrario, la combinación de IFN-α con IFN-γ provocó una gran protección, el 75% de las células infectadas con MS permaneció viable a las 48 h p.i. Resultados similares se obtuvieron en tratamientos realizados sobre células infectadas con HSV-1 cepa KOS (figura 32). Sin embargo, la inhibición de HSV-1 ejercida por los interferones por separado fue mayor que la observada para HSV-2.



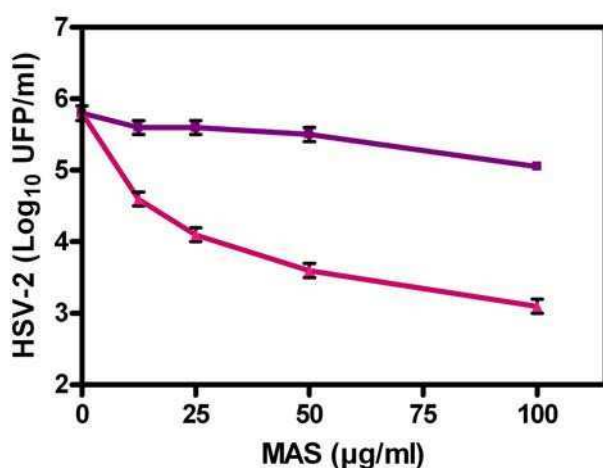
**Figura 32. El tratamiento con IFN protege a las células infectadas con HSV-1 del efecto citopático viral.** Células Vero infectadas con HSV-1 KOS fueron sometidas al ensayo de MTT para obtener el número de células viables a distintos tiempos luego de ser tratadas con vehículo (■), 100 UI/ml de IFN-α (●), 100 UI/ml de IFN-γ (▲), IFN-α + IFN-γ (▼).

Los resultados de estos experimentos donde se midió la viabilidad celular concuerdan con los datos obtenidos previamente (cuadro 3 y figuras 28 y 29) donde la combinación de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  inhibieron en forma sinérgica la replicación de HSV-2 y HSV-1 en células Vero.

### **Acción de meliacina sobre el efecto antiviral de IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ y su combinación**

Para evaluar si meliacina podía interferir con el efecto antiviral producido por los interferones por separado o en forma combinada, realizamos ensayos dirigidos a determinar su acción antiviral sobre las células Vero.

Primeramente, células Vero fueron tratadas durante 16 h con distintas concentraciones de MAS, desde 12,5 a 100  $\mu\text{g/ml}$  (pretratamiento). Luego de transcurrido ese tiempo, las monocapas fueron infectadas con la cepa MS de HSV-2 a una moi de 1, después de la hora de adsorción se les agregó medio de cultivo fresco y se dejó hasta finalizar el experimento a las 24 h p.i. Por otro lado, se realizó un experimento similar pero agregando las distintas concentraciones de MAS sólo después de la infección (postratamiento). Cumplidas las 24 h p.i. se procedió a titular el virus presente en los sobrenadantes de los cultivos, mediante la técnica de formación de placas.



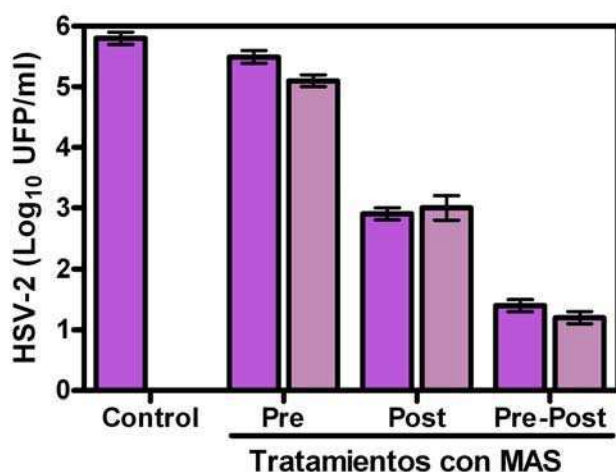
**Figura 33. Multiplicación de HSV-2 en función de la concentración de MAS.** Células Vero fueron infectadas con HSV-2 MS a una moi de 1 y tratadas durante las 16 h previas a la infección (■) ó las 24 h posteriores (■) con distintas concentraciones de MAS. A las 24 h, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó el título viral por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

La figura 33 muestra la cinética de reducción del título de HSV-2 en función de la concentración de MAS. Como se puede observar, el pretratamiento de 16 h con MAS produce una leve reducción del título viral que no llega a ser de 1 log a la concentración



máxima testeada. Sin embargo, el postratamiento con MAS lleva a una reducción de hasta 3 log al tratar con 100 µg/ml. Teniendo en cuenta las concentraciones testeadas, se decidió usar 50 µg/ml para los experimentos posteriores ya que es una concentración a la cual MAS tiene un efecto antiviral significativo y además no es citotóxica.

Meliacina produce un estado refractario a la infección cuando es agregada 2 h antes que el virus VSV (Andrei y col., 1988), aunque este efecto inhibitorio es muy leve contra HSV-1 (Villamil y col., 1995). Por este motivo, decidimos estudiar si había diferencias en el pretratamiento con MAS de 2 o 16 h antes de la infección con HSV-2. La figura 34 muestra claramente la diferencia entre el pre y el postratamiento con MAS en la inhibición de la replicación del virus. Si bien hay una diferencia entre pretratar las células durante 2 o 16 h, ya que la inducción más larga produce una reducción del título levemente mayor, cuando se realizó el tratamiento durante todo el experimento la diferencia en el tiempo de pretratamiento no cambió la inhibición. Sorprendentemente, el tratamiento con MAS durante 2 o 16 h antes de la infección y 24 h después produjo una inhibición del título de virus de aproximadamente 4 logaritmos.

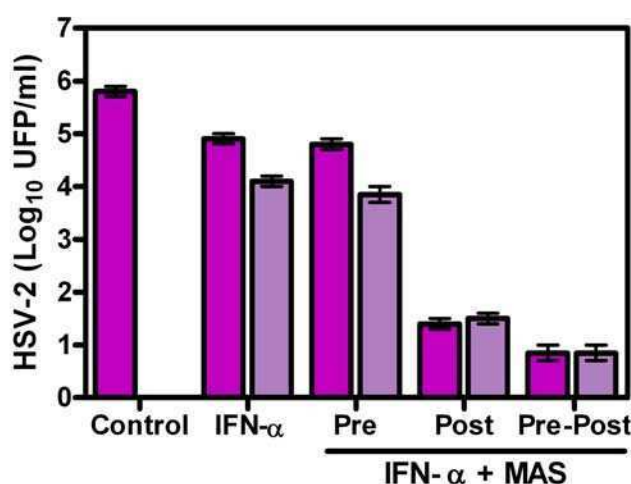


**Figura 34. Multiplicación de HSV-2 MS en función de distintos tratamientos con MAS.** Células Vero fueron infectadas con HSV-2 MS a una  $moi$  de 1 y pretratadas durante 2h (■) o 16 h (◼), postratadas o pre y postratadas con 50 µg/ml de MAS. A las 24 h, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó el título viral por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Con estos resultados llegamos a la conclusión de que no hay diferencias significativas entre el pretratamiento de 2 h y el de 16 h con MAS sola en este sistema.

Para comenzar con la evaluación del efecto de MAS sobre la inhibición de la replicación de HSV-2 ejercida por los interferones, realizamos el ensayo descrito

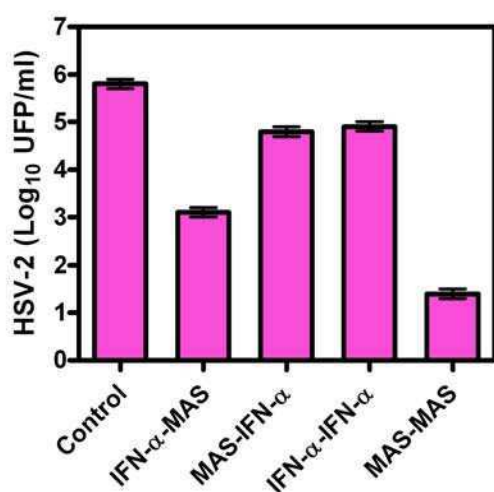
anteriormente usando distintos tiempos de pretratamiento. Si bien ya sabíamos que no habría diferencias en la inhibición producida por MAS sola, pensamos que tal vez sí podía variar en los tratamientos con interferón. En estos ensayos, las células Vero fueron tratadas durante 2 o 16 h con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  ó IFN- $\alpha$  + 50  $\mu$ g/ml de MAS, infectadas con HSV-2 MS y luego de la adsorción tratadas nuevamente con IFN- $\alpha$  ó IFN- $\alpha$  + MAS. Por lo tanto, se realizaron distintos tratamientos: IFN- $\alpha$  todo el tiempo, IFN- $\alpha$  todo el tiempo + MAS antes de la infección, IFN- $\alpha$  todo el tiempo + MAS después de la infección o MAS + IFN- $\alpha$  todo el tiempo. La figura 35 muestra que en el tratamiento continuo con IFN- $\alpha$  solo, la diferencia en el pretratamiento es importante ya que la inhibición del título viral aumenta de 0,8 a 1,6 logaritmos. Teniendo en cuenta esta diferencia se puede observar que el pretratamiento con MAS no tuvo incidencia sobre la inhibición producida por el IFN- $\alpha$  solo, pero que disminuyó de 4 a 1,5 Log UFP/ml el título de virus al agregarse luego de la infección y de 4 a 0,7 Log UFP/ml cuando se agregó en forma conjunta con el IFN- $\alpha$  durante todo el ensayo.



**Figura 35. Multiplicación de HSV-2 MS en función de distintos tratamiento con MAS e IFN- $\alpha$ .** Células Vero fueron pretratadas durante 2h (■) o 16 h (□) con IFN- $\alpha$  o IFN- $\alpha$ +MAS, se infectaron con HSV-2 MS a una moi de 1 y luego de la adsorción se trataron con IFN- $\alpha$  o IFN- $\alpha$ +MAS. A las 24 h, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó el título viral por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Para asegurarnos de que meliicina no estaba interfiriendo con la acción antiviral del IFN- $\alpha$ , hicimos pre o postratamientos con IFN- $\alpha$  solo o con MAS sola. Células Vero fueron tratadas durante 2 h con IFN- $\alpha$  o con MAS, infectadas con HSV-2 MS y luego de la adsorción del virus tratadas con IFN- $\alpha$  o MAS fresco. A las 24 h p.i. se tituló el virus por la técnica de UFP. Como podemos ver en la figura 36, el pretratamiento con IFN- $\alpha$  no influyó en la inhibición llevada a cabo por el agregado de MAS luego de la infección, ya que este resultado es el mismo que el obtenido con el postratamiento con MAS sola

que se mostró en la figura 34. Sí parece haber un aumento de la inhibición, de 0,3 a 1 logaritmo de diferencia, en el tratamiento primero con MAS e IFN- $\alpha$  luego de la infección que cuando se pretrató con MAS sola y luego se agregó medio de cultivo (figura 34). Esta inhibición coincide con la alcanzada al tratar las células con IFN- $\alpha$  todo el tiempo (figura 36), lo que podría explicarse como que MAS ejerce sobre las células un efecto similar al que lleva a cabo el IFN- $\alpha$ . En cuanto al tratamiento con MAS todo el tiempo no hubo diferencias con los resultados anteriores, con lo cual podemos decir que el sistema es reproducible.



**Figura 36. Multiplicación de HSV-2 MS en función de distintos tratamiento con MAS e IFN- $\alpha$ .** Células Vero fueron pretratadas durante 2h con IFN- $\alpha$  o MAS, se infectaron con HSV-2 MS a una  $moi$  de 1 y luego de la adsorción se volvieron a tratar con IFN- $\alpha$  o MAS. A las 24 h, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó el título viral por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Los resultados de estos experimentos nos llevan a postular que meliacina no interfiere con el efecto antiviral ejercido por el IFN- $\alpha$  solo, y que además aumenta la inhibición cuando es agregada en forma conjunta con éste.

Hasta este punto habíamos evaluado el efecto de MAS sobre la inhibición producida por el IFN- $\alpha$  siempre midiendo el rendimiento viral, entonces quisimos saber que pasaba al infectar con HSV-2 y tratar monocapas de células Vero con MAS y los interferones por plaqueo directo. Para ello, monocapas de células Vero fueron tratadas durante 16 h con IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o la combinación de ambos; luego fueron infectadas con 150 UFP de HSV-2 cepa MS y luego de la adsorción viral se agregaron nuevamente las citoquinas. Se realizaron dos tratamientos con MAS, durante la hora previa al agregado de los IFN o durante todo el tiempo de inducción.

Cuadro 4. Efecto de MAS sobre la inhibición de la formación de placas de HSV-2 producida por IFN  $\alpha$  y  $\gamma$  en células Vero.

	Tratamiento (U/ml) <sup>a</sup>	Media no. de placas <sup>b</sup> $\pm$ SEM	Reducción <sup>c</sup>
HSV-2 MS	Vehículo	137 $\pm$ 8,3	-
	IFN- $\alpha$ (100)	82,5 $\pm$ 6,4	1,7
	IFN- $\gamma$ (100)	86 $\pm$ 6,6	1,6
	IFN- $\alpha$ (100) + IFN- $\gamma$ (100)	36,5 $\pm$ 4,3	<b>3,8</b>
	IFN- $\alpha$ (200)	68 $\pm$ 5,8	2
	IFN- $\gamma$ (200)	72 $\pm$ 6	1,9
MAS 1h antes IFNs <sup>d</sup>	Vehículo	114 $\pm$ 7,5	1,2
	IFN- $\alpha$ (100)	70 $\pm$ 5,9	1,6
	IFN- $\gamma$ (100)	65,5 $\pm$ 5,7	1,7
	IFN- $\alpha$ (100) + IFN- $\gamma$ (100)	34 $\pm$ 4,1	<b>3,4</b>
	IFN- $\alpha$ (200)	64 $\pm$ 5,7	1,8
	IFN- $\gamma$ (200)	52 $\pm$ 5,1	2,2
MAS durante toda la inducción	Vehículo	<5	>27,6
	IFN- $\alpha$ (100)	<5	>27,6
	IFN- $\gamma$ (100)	<5	>27,6
	IFN- $\alpha$ (100) + IFN- $\gamma$ (100)	<5	>27,6
	IFN- $\alpha$ (200)	<5	>27,6
	IFN- $\gamma$ (200)	<5	>27,6

<sup>a</sup> Células Vero tratadas continuamente con IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o la combinación de estas citoquinas desde 16 h antes de la infección hasta el final del experimento.

<sup>b</sup> Número de placas formadas en células Vero inoculadas con 150 UFP de HSV-2 MS.

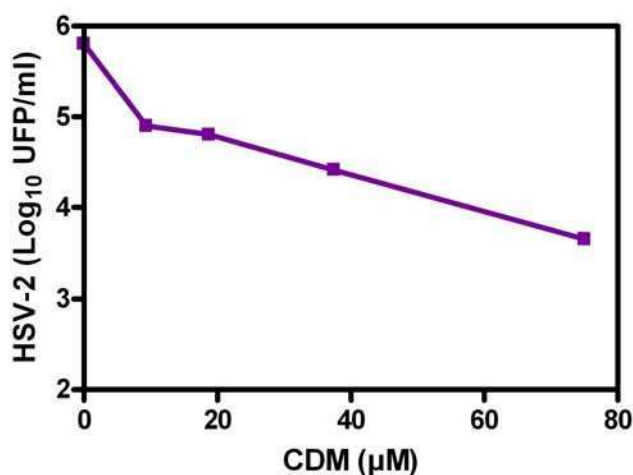
<sup>c</sup> La reducción se calculó como el N° de placas en control/número de placas en el tratamiento.

<sup>d</sup> Células Vero fueron tratadas sólo durante 1 h con 50  $\mu$ g/ml de MAS y luego continuamente con IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o la combinación de estas citoquinas desde 16 h antes de la infección hasta el final del experimento.

Como se puede observar en el cuadro 4, el pretratamiento de las células durante 1 h con MAS no interfirió en la inhibición producida por el IFN- $\alpha$ , el IFN- $\gamma$  o la combinación de ambos. Por otro lado, el agregado de MAS sola durante todo el tiempo de inducción produjo una inhibición tal que no se formó ninguna placa. Debido a este resultado, nos vimos obligados a evaluar la inhibición producida por MAS midiendo el rendimiento viral, ya que la única conclusión derivada del plaqueo directo fue que meliacina sola agregada antes y después de la infección produjo una reducción del número de placas mayor a 27,6 veces. Esta inhibición tan alta no permitió ver posibles diferencias entre los distintos tratamientos con los interferones.

### **Acción de CDM sobre el efecto antiviral de IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ y su combinación**

Para poder evaluar si CDM, el principio activo de meliaccina, ejercía el mismo efecto que MAS, realizamos un ensayo para establecer la  $CI_{90}$  del compuesto en células Vero infectadas con HSV-2 MS. Para esto, infectamos células Vero con HSV-2 cepa MS a una moi de 1, luego de la adsorción viral se retiró el inóculo y se agregaron concentraciones crecientes de CDM, desde 10 a 75  $\mu$ M. A las 24 h se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el virus presente por la técnica de formación de placas. La figura 37 muestra la curva de inhibición de la replicación de HSV-2 en función de la concentración de CDM. Como se puede observar la  $CI_{90}$  calculada es 20  $\mu$ M (que corresponde a 13,3  $\mu$ g/ml), la cual es similar a la obtenida para MAS.



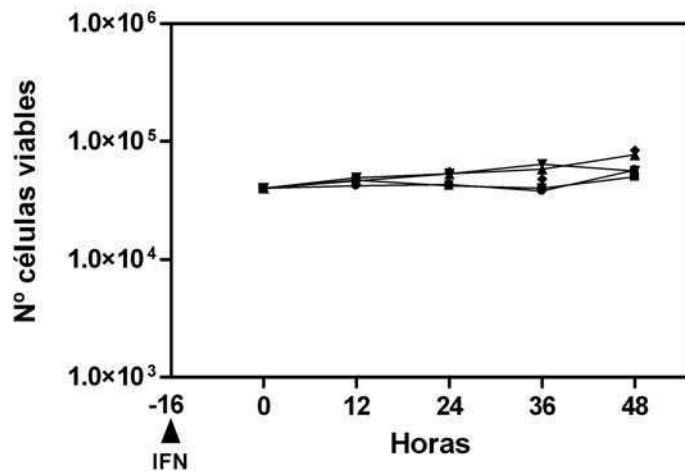
**Figura 37. Multiplicación de HSV-2 en función de la concentración de CDM.** Células Vero fueron infectadas con HSV-2 MS a una moi de 1 y tratadas durante las 24 h posteriores con distintas concentraciones de CDM. A las 24 h, se cosecharon los sobrenadantes y se determinó el título viral por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Teniendo en cuenta que el efecto antiviral producido por CDM es similar al obtenido en los ensayos con MAS, decidimos seguir trabajando con el compuesto puro. Con el objeto de investigar si CDM podía interactuar o no con el efecto antiviral ejercido por las citoquinas sobre las células Vero realizamos los siguientes experimentos.

Primero evaluamos que CDM agregado solo o en forma conjunta con los interferones no fuera tóxico para las células Vero. Con esta intención, se realizó un experimento similar al descrito en la figura 30 pero en presencia de 50  $\mu$ g/ml de CDM. Células Vero fueron tratadas con CDM, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o la combinación de estos durante distintos tiempos a los cuales se realizó la técnica del MTT y se determinó el número de células viables. Como se puede observar en la figura 38, el tratamiento con CDM, sólo o en combinación con los interferones, no causó ningún efecto citotóxico ya que el

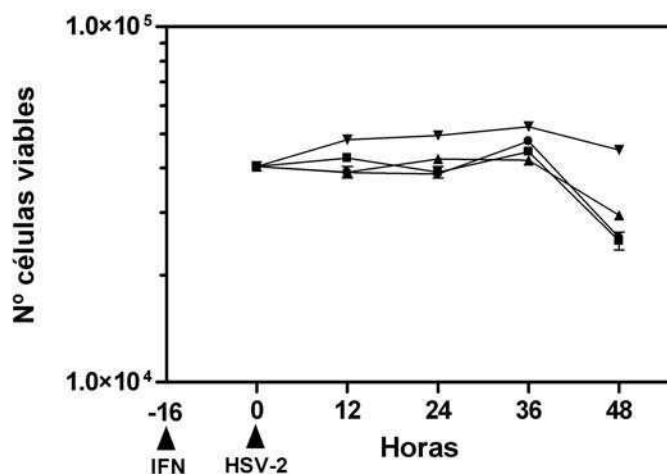
número de células se mantuvo constante en el tiempo y a niveles similares a los obtenidos para los cultivos tratados con vehículo.

Por lo tanto concluimos que CDM no es citotóxico en las condiciones utilizadas.



**Figura 38. Citotoxicidad de CDM, IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  sobre células Vero sin infectar.** Células Vero sin infectar fueron sometidas al ensayo de MTT para obtener el número de células viables a distintos tiempos luego de ser tratadas con Vehículo (◆), CDM (■), CDM + 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  (●), CDM + 100 UI/ml de IFN- $\gamma$  (▲), CDM + IFN- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  (▼).

Para evaluar el efecto de CDM sobre la protección contra la acción citopática ejercida por el IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o la combinación de éstos, se realizó un experimento similar al descrito por la figura 31 pero en presencia de CDM. Las células Vero fueron pretratadas por 16 h con CDM, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o la combinación de éstos, infectadas con HSV-2 MS y luego de la adsorción re- tratadas con CDM, las citoquinas o su combinación. El número de células viables fue determinado a las 12, 24, 36 y 48 h p.i.



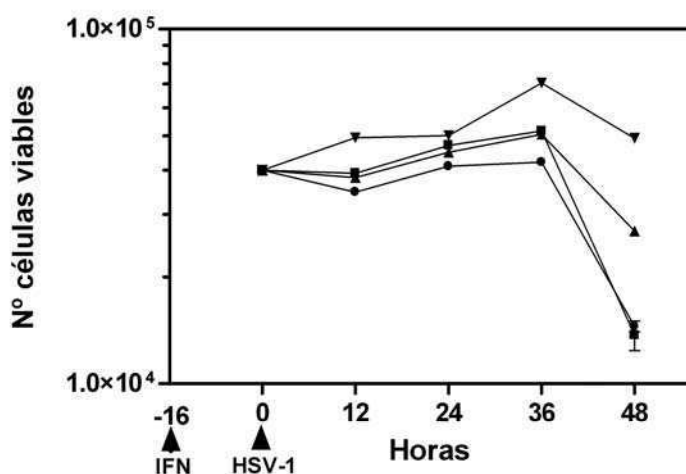
**Figura 39. El tratamiento con CDM aumenta la protección ejercida por los interferones sobre las células infectadas con HSV-2.** Células Vero infectadas con HSV-2 MS fueron sometidas al ensayo de MTT para obtener el número de células viables a distintos tiempos luego de ser tratadas con CDM (■), CDM + 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  (●), CDM + 100 UI/ml de IFN- $\gamma$  (▲), CDM + IFN- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  (▼)

Si comparamos las figuras 31 y 39 podemos ver que en presencia únicamente de CDM, las células Vero fueron protegidas del efecto citopático producido por HSV-2,

ya que el 60% de las células infectadas permaneció viable. Cuando CDM fue combinada con IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ , el número de células protegidas se incrementó con respecto al efecto de cada interferón por separado sugiriendo que la protección observada es debido a CDM. Es interesante el hecho de que al tratar las células con CDM más la combinación de ambos interferones el efecto antiviral parece ser de tipo aditivo.

Por otro lado, realizamos el mismo experimento pero infectando las células con HSV-1 KOS para comparar el efecto de CDM y los interferones en ambos tipos de herpesvirus.

La figura 40 muestra que el agregado de CDM a las células infectadas produjo un aumento en la viabilidad celular, en comparación con la figura 32 donde aparece la acción anti-citopática producida por los interferones solos. Podríamos afirmar que la acción antiviral de CDM en forma conjunta con los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  es similar para ambos tipos de herpesvirus, aunque la acción citopática de HSV-1 KOS parece ser mucho mayor que la observada por HSV-2 MS.



**Figura 40. El tratamiento con CDM aumenta la protección ejercida por los interferones sobre las células infectadas con HSV-1.** Células Vero infectadas con HSV-1 KOS fueron sometidas al ensayo de MTT para obtener el número de células viables a distintos tiempos luego de ser tratadas con CDM (■), CDM + 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  (●), CDM + 100 UI/ml de IFN- $\gamma$  (▲), CDM + IFN- $\alpha$  + IFN- $\gamma$  (▼)

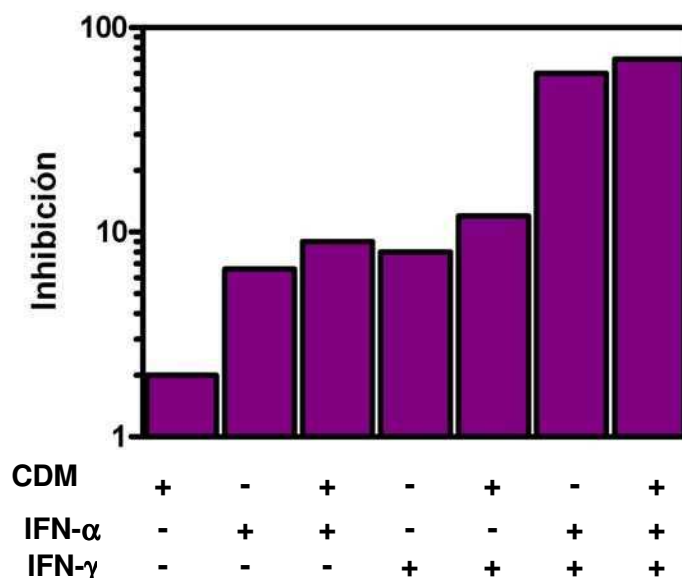
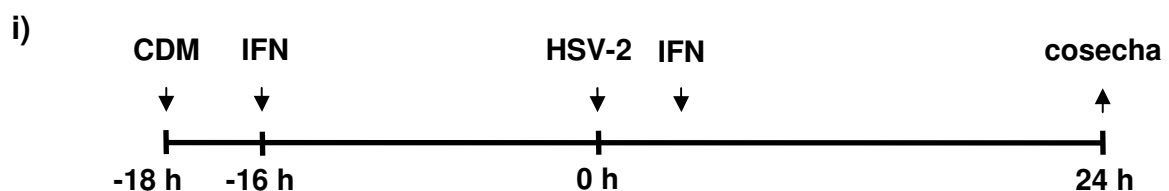
Estos experimentos nos llevan a concluir que CDM per se protege a las células Vero de la acción citopática ejercida por los virus HSV-1 y HSV-2. Asimismo, el agregado de CDM a la combinación de ambos interferones estaría aumentando significativamente la protección producida por los interferones en forma conjunta.

### Acción de CDM bajo diferentes condiciones sobre el efecto antiviral de IFN

Por otro lado, evaluamos si la presencia de CDM bajo diferentes condiciones experimentales podía afectar la acción antiviral de los interferones sobre la replicación de la cepa MS de HSV-2. Se realizaron experimentos con el objeto de determinar el rendimiento viral a las 24 h p.i. en células tratadas con CDM de la siguiente manera:

- i) presente durante las 2 h previas a la inducción con los interferones, ii) agregado simultáneamente con los interferones y mantenido sólo por 16 h antes de la infección, iii) agregado luego de la infección viral y mantenido hasta la cosecha del virus, iiiii) agregado junto con los interferones 16 h antes de la infección, re-agregado después de la infección y mantenido hasta la cosecha del virus.

Los resultados obtenidos siguiendo el protocolo i) se muestran en la figura 41.



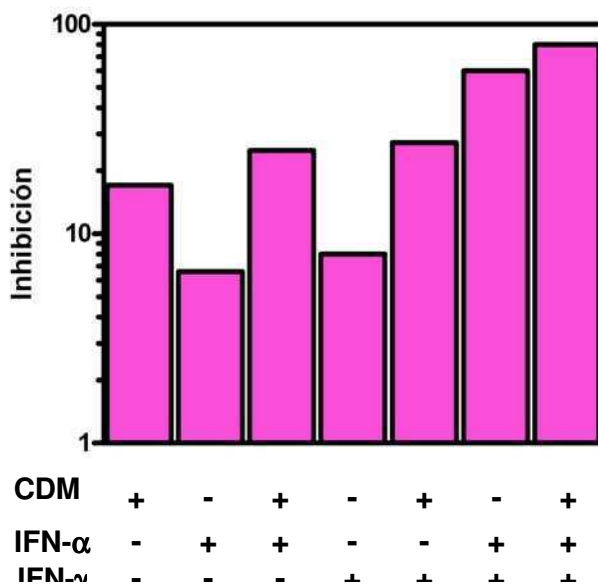
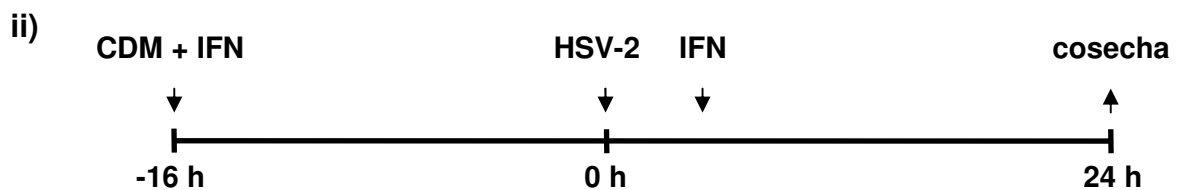
**Figura 41. Efecto de CDM sobre la acción antiviral ejercida por los interferones.** Células Vero fueron tratadas con CDM durante 2 h y luego, al ser removido el antiviral se agregaron 100 UI/ml de IFN- $\alpha$ , 100 UI/ml de IFN- $\gamma$  o la combinación de ambos durante 16 h antes de la infección con HSV-2 MS. Después de la adsorción viral, las células fueron re-tratadas con las citoquinas que permanecieron en el cultivo hasta las 24 h p.i. momento en el cual se midió el rendimiento viral por la técnica de UFP.

El efecto antiviral debido al interferón solo o en combinación fue incrementado 2 veces en células pretratadas con CDM, lo que indicaría que el tratamiento con CDM no interfiere con la actividad antiviral ejercida por los interferones solos o en combinación.



Por el contrario, nosotros especulamos que el efecto antiviral del pretratamiento de 2 h con CDM solo contribuyó de manera aditiva a la actividad antiviral total.

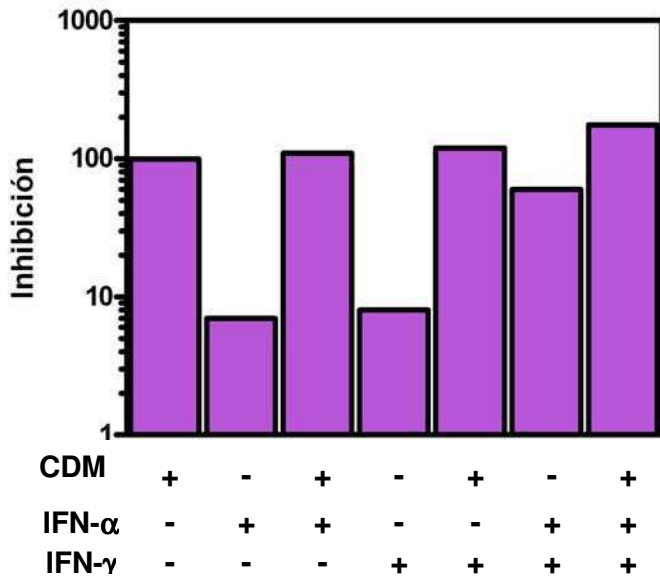
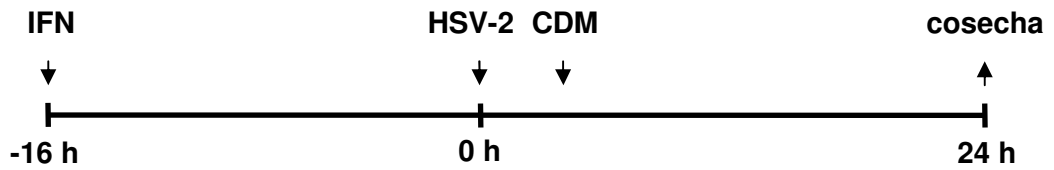
Los resultados obtenidos con el tratamiento donde CDM estuvo presente durante 16 h, el período de inducción antiviral de los IFN, son más difíciles de interpretar debido a que CDM “per se” reduce 20 veces la replicación de HSV-2 (Figura 42). En este caso, también se observó un efecto aditivo de CDM sobre las células tratadas con IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o la combinación de ambos.



**Figura 42. Efecto de CDM sobre la acción antiviral ejercida por los interferones.** Células Vero fueron tratadas con CDM solo, CDM más 100 UI/ml de IFN- $\alpha$ , 100 UI/ml de IFN- $\gamma$  o la combinación de ambos durante 16 h antes de la infección con HSV-2 MS. Después de la adsorción viral, las células fueron re-tratadas con las citoquinas, pero no con CDM, que permanecieron en el cultivo hasta las 24 h p.i. momento en el cual se midió el rendimiento viral por la técnica de UFP.

Cuando CDM fue agregado después de la infección y mantenido hasta las 24 h p.i. (Figura 43) o cuando estuvo presente desde las 16 h de inducción hasta las 24 h p.i. (Figura 44), su efecto antiviral fue tan alto (100 veces y 20000 veces de reducción del rendimiento viral con respecto al control sin tratar) que enmascaró su interacción con los interferones.

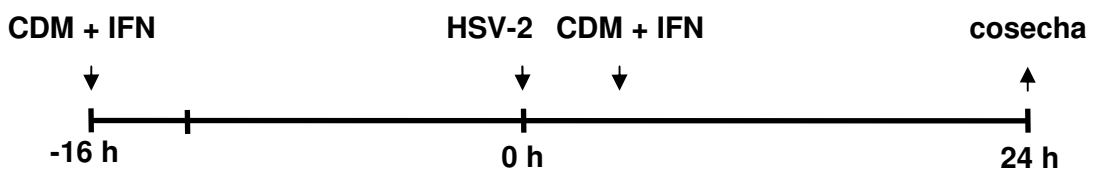
iii)

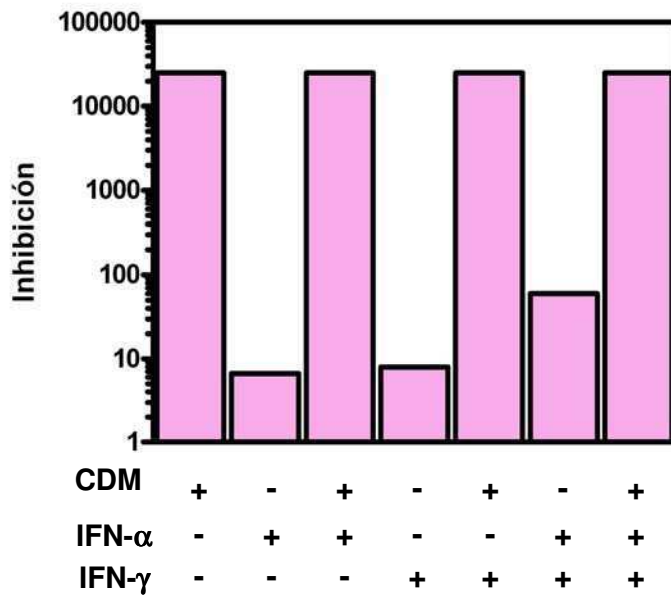


**Figura 43. Efecto de CDM sobre la acción antiviral ejercida por los interferones.** Células Vero fueron tratadas con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$ , 100 UI/ml de IFN- $\gamma$  o la combinación de ambos durante 16 h antes de la infección con HSV-2 MS. Después de la adsorción viral, las células fueron tratadas con CDM y re-tratadas con las citoquinas que permanecieron en el cultivo hasta las 24 h p.i. momento en el cual se midió el rendimiento viral por la técnica de UFP.

Para poder establecer que tipo de interacción había entre CDM y los interferones, repetimos el experimento mostrado en la figura 43 con concentraciones menores de CDM. Se determinó el rendimiento viral a las 24 h p.i. en cultivos infectados con la cepa MS de HSV-2 y tratados con 6,2; 12,25; 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$  de CDM, CDM más 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  o CDM más 100 UI/ml de IFN- $\gamma$ .

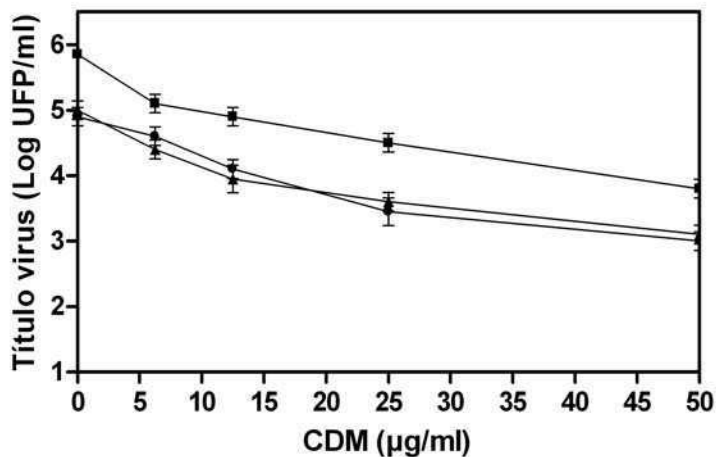
iii)





**Figura 44. Efecto de CDM sobre la acción antiviral ejercida por los interferones.** Células Vero fueron tratadas con CDM, 100 UI/ml de IFN- $\alpha$ , 100 UI/ml de IFN- $\gamma$  o la combinación de ambos durante 16 h antes de la infección con HSV-2 MS. Después de la adsorción viral, las células fueron re-tratadas con CDM y con las citoquinas que permanecieron en el cultivo hasta las 24 h p.i. momento en el cual se midió el rendimiento viral por la técnica de UFP.

Como se puede observar en la Figura 45, CDM solo inhibió la replicación del virus en una manera dependiente de la dosis. La combinación de cada uno de los interferones con CDM incrementó en un logaritmo el efecto antiviral sin alterar la cinética de la inhibición observada.



**Figura 45. Efecto aditivo de CDM y los interferones sobre la inhibición de HSV-2.** Células Vero fueron tratadas con vehículo, 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  o 100 UI/ml de IFN- $\gamma$  durante 16 h antes de la infección con HSV-2 MS. Después de la adsorción, las células fueron tratadas con distintas concentraciones de CDM y re-tratadas con las citoquinas que permanecieron en el cultivo hasta las 24 h p.i. momento en el cual se midió el rendimiento viral por la técnica de UFP. (■) CDM solo, (●) CDM + IFN- $\alpha$ , (▲) CDM + IFN- $\gamma$ .

Estos resultados sugieren que la presencia de CDM no interfiere con la inhibición del HSV-2 producida por el IFN- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  solos o en combinación.

El análisis de los resultados en conjunto nos lleva a concluir que ni MAS ni CDM estarían interfiriendo en la inhibición de la replicación del herpes producida por los interferones en células Vero. Con lo cual, si extrapolamos estos resultados al modelo *in*

*vivo*, podríamos postular que MAS debería parte de su efecto antiviral al hecho de que por un lado aumenta la cantidad de IFN- $\gamma$  liberada en la vagina y que a su vez aumenta el efecto sinérgico que se produce con el IFN- $\alpha$  y el IFN- $\gamma$  combinados.

**EFFECTO DE MELIACINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS  
INDUCIDAS EN MACRÓFAGOS CULTIVADOS *IN VITRO***

## **Introducción**

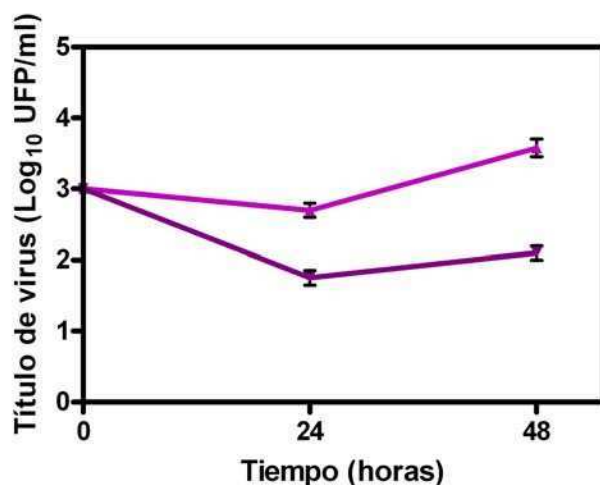
Los macrófagos son centinelas del sistema inmune que luego de una infección migran desde el torrente sanguíneo a los tejidos donde se diferencian y convierten en macrófagos residentes. El reconocimiento de estructuras moleculares asociadas a patógenos tales como el LPS bacteriano o ciertas proteínas virales dispara la activación de los macrófagos, lo que conduce a una gran variedad de respuestas biológicas. Estas respuestas están mediadas principalmente por la liberación de citoquinas tales como TNF- $\alpha$  e interleuquinas (Sharif y col., 2007). Debido a los resultados que obtuvimos sobre la acción *in vivo* de meliacina, donde además de producir un efecto terapéutico MAS aumentó la concentración de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en los fluidos vaginales de los ratones infectados, y teniendo en cuenta el rol esencial de los macrófagos en la respuesta contra las infecciones, quisimos evaluar la acción de MAS directamente sobre este tipo celular. Para ello elegimos trabajar con una línea continua de macrófagos y con macrófagos peritoneales murinos extraídos por lavaje peritoneal de ratones BALB/c previamente tratados con caldo tioglicolato.

## **Actividad antiviral de meliacina en macrófagos**

### **Sistema modelo de VSV**

Trabajos anteriores demostraron que las células Vero, BHK, L929 y Hela son susceptibles a la acción de meliacina. Para poder trabajar con la línea continua de macrófagos J774 A.1, se realizó un ensayo donde se evaluó su susceptibilidad a meliacina. Primeramente medimos la citotoxicidad de MAS en este tipo celular mediante la técnica del MTT y calculamos la CC<sub>50</sub> que resultó ser 600  $\mu\text{g/ml}$ .

El ensayo antiviral se llevó a cabo infectando las células con el virus de la estomatitis vesicular (VSV) cuya replicación es inhibida por el pretratamiento de las células con MAS. Se sembraron  $1 \times 10^3$  células /ml en una microplaca de 24 pocillos, a las 24 h se pre-trataron con 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAS durante 2 horas y luego se infectaron con  $10^3$  UFP/ml de VSV. A las 24 y a las 48 h se determinó el título de VSV por el método de formación de placas. La Figura 46 muestra el título de VSV en función del tiempo, donde se ve claramente como disminuyó el título viral en las células tratadas con MAS.



**Figura 46. Efecto de MAS en macrófagos infectados con VSV.** Cultivos de macrófagos fueron pretratados con medio de cultivo (■) o con MAS 50 µg/ml (■) e infectados con VSV ( $10^3$  UFP/ml). A las 24 y 48 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se midió el título viral por el método de UFP. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

Los resultados muestran que el pretratamiento de las células macrofágicas con meliacina inhibe el rendimiento de VSV de forma similar al exhibido en otros tipos celulares, lo que nos hace suponer que podemos utilizar la línea J774 A.1 u otra similar como sistema para evaluar la acción de meliacina.

## PRODUCCIÓN DE TNF- $\alpha$

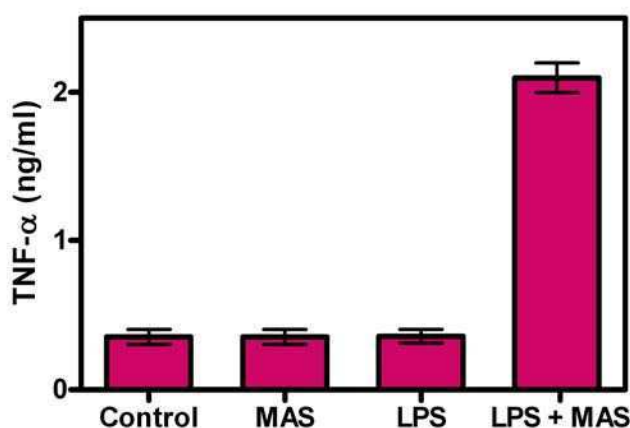
### Inductor LPS

El LPS es un componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas que es conocido como un potente activador de los macrófagos. Dado que entre el amplio rango de reacciones inflamatorias inducidas por el LPS se encuentra la producción de citoquinas (Galanos y Freudenberg, 1993; Conboy y col., 1999), decidimos utilizarlo en primer lugar como inductor de la síntesis de TNF- $\alpha$  y analizar los cambios derivados de la presencia de MAS en el sistema.

### Respuesta de la línea celular continua de macrófagos J774 A.1

Con el objetivo de disponer de un gran número de células macrofágicas se utilizó la línea continua de macrófagos murinos J774 A.1. Los macrófagos se incubaron separadamente durante 24h a una densidad de  $5 \times 10^5$  células por pocillo con LPS (10 µg/ml) solo, MAS (50 µg/ml) sola o la combinación de ambos. Al cabo de dicho tiempo se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la producción de TNF- $\alpha$  por medio de un bioensayo. Como se puede observar en la figura 47, las células J774A.1

presentaron una concentración basal de TNF- $\alpha$  muy alta que no permitió ver diferencias entre los tratamientos realizados, la producción del TNF- $\alpha$  en células estimuladas con medio de cultivo fue igual que la obtenida en células estimuladas con LPS. El marcado aumento de TNF- $\alpha$  producido al inducir en forma combinada con MAS y LPS nos sorprendió gratamente ya que esperábamos ver algún efecto de MAS sobre el sistema. De todas maneras, debido a que la producción basal de TNF- $\alpha$  fue muy alta decidimos no usar la línea celular y evaluar el uso de macrófagos peritoneales murinos.



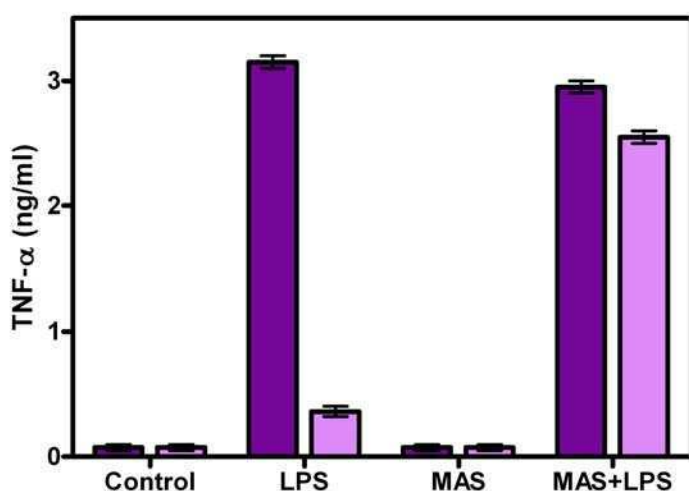
**Figura 47. Producción de TNF- $\alpha$  en células macrofágicas J774 A.1.** Células J774 A.1 ( $5 \times 10^5$  células por pocillo) fueron tratadas en paralelo con medio de cultivo, MAS, LPS o LPS + MAS durante 24 h, momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  por medio de un bioensayo. Los datos provienen de 3 muestras independientes.

### Diferencias en la respuesta de macrófagos obtenidos de ratones machos respecto de las hembras

Inicialmente comparamos la producción de TNF- $\alpha$  en cultivos de macrófagos provenientes de ratones BALB/c hembras y machos. Cultivos de macrófagos extraídos de ratones hembras y machos se incubaron separadamente durante 24h con LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ), MAS (50  $\mu\text{g/ml}$ ) o la combinación de ambos. Por otro lado se realizó la inducción con MAS (50  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 h previas al agregado de LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) que se dejó durante 24 h. La figura 48 muestra la producción de TNF- $\alpha$  en los macrófagos estimulados, MAS “per se” produce un leve aumento del TNF- $\alpha$  (50 pg/ml). La cantidad de TNF- $\alpha$  liberada por los cultivos de macrófagos de los machos fue similar (aproximadamente 3 ng/ml) independientemente de la presencia o no de MAS. La estimulación de los cultivos con LPS varió según se tratara de macrófagos obtenidos de ratones machos o hembras. Los macrófagos de los machos son más respondedores al estímulo, así la producción de TNF- $\alpha$  es 7,5 veces mayor en los machos que en las



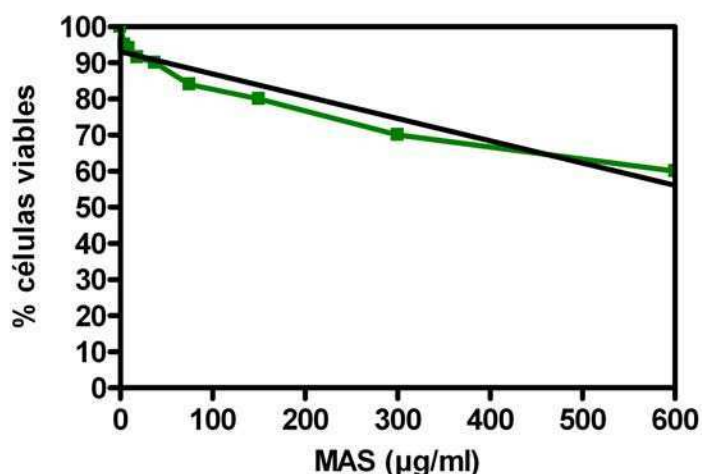
hembras. Estos resultados parecen concordar con trabajos previos donde se ha demostrado que los macrófagos derivados de machos producen cantidades significativamente mayores de mediadores inflamatorios en respuesta al LPS bacteriano debido a la alta expresión constitutiva del receptor TLR4 (Marriott y col., 2006). Por otra parte, la presencia de MAS agregada simultáneamente o 24 h antes no alteró la respuesta. En cambio, en los cultivos de macrófagos provenientes de hembras el agregado de MAS simultáneamente con el LPS produjo un aumento muy importante de la síntesis de TNF- $\alpha$  aproximadamente de 7 veces. Dado que el sinergismo de la respuesta nos permitiría estudiar el efecto modulador de MAS, elegimos como sustrato los cultivos de macrófagos provenientes de hembras.



**Figura 48. Diferencias en la producción de TNF- $\alpha$  entre macrófagos de ratón hembra y macho.** Macrófagos peritoneales de ratones hembras (◆) y machos (■) se trataron con medio de cultivo, MAS, LPS y LPS + MAS durante 24 h momento en el cual los sobrenadantes fueron recogidos para determinar la presencia de TNF- $\alpha$  mediante la utilización de un bioensayo. Los datos provienen de 3 muestras independientes

### Citotoxicidad de MAS para los macrófagos

Si bien meliicina ha demostrado tener muy baja citotoxicidad para un amplio espectro de cultivos celulares, entre los cuales se encuentra la línea macrofágica J774 A.1, antes de realizar tratamientos a los macrófagos peritoneales con MAS fue necesario calcular la  $CC_{50}$ . Para ello, se llevó a cabo la técnica del MTT, monocapas de macrófagos peritoneales fueron tratados durante 24 h con concentraciones crecientes de MAS para luego ser incubados con el reactivo de MTT. Como muestra la figura 49, a partir del gráfico de DO en función de la concentración de MAS se obtuvo una  $CC_{50} > 600 \mu\text{g/ml}$ . Resultado que nos permitió trabajar con la dosis de  $50 \mu\text{g/ml}$  sin preocuparnos por problemas secundarios debidos a citotoxicidad.

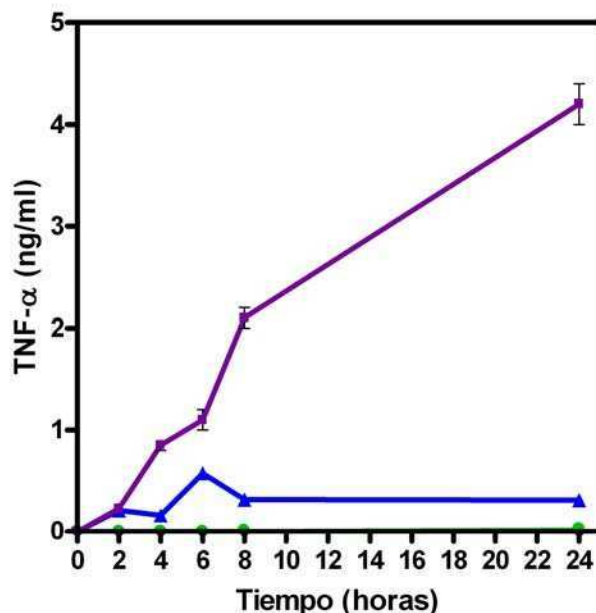


**Figura 49. Citotoxicidad de MAS sobre macrófagos peritoneales murinos.** Macrófagos peritoneales cultivados en microplacas de 96 pocillos por triplicado, fueron tratados durante 24 h con concentraciones crecientes de MAS. Cumplido el tiempo de incubación, se trataron con el reactivo de MTT durante 2 h a 37°C. Una vez producida la reacción se midió la D.O. a 590 nm y se determinó la  $CC_{50}$  utilizando los datos de la regresión lineal (línea negra).

## Cinética de producción de TNF- $\alpha$ en cultivos de macrófagos inducidos por LPS.

### Acción de MAS

Una vez que elegimos el sistema con el cual trabajar, decidimos evaluar la acción de meliicina a distintos tiempos sobre la producción de TNF- $\alpha$  en cultivos de macrófagos peritoneales murinos.

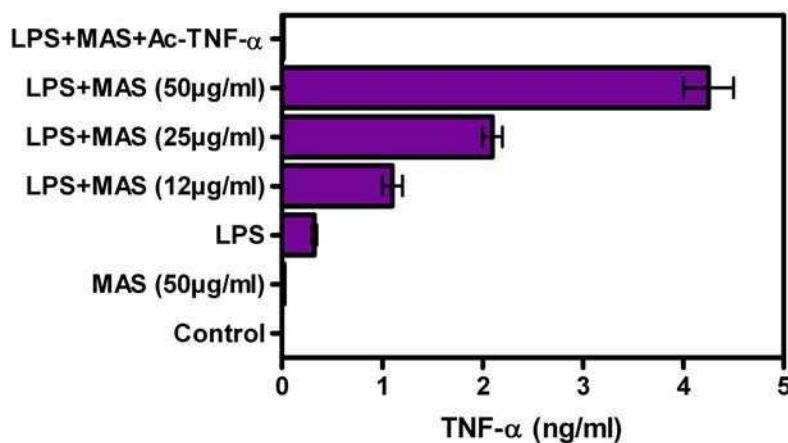


**Figura 50. Cinética de la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos estimulados con LPS y LPS + MAS.** Cultivos de macrófagos peritoneales ( $5 \times 10^5$ ) fueron tratados con 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS solo (azul), 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAS sola (verde), o 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS + 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAS (violeta). Los cultivos control fueron tratados con medio de cultivo solo. A las 2, 4, 6, 8 y 24 h se recogió el sobrenadante de cada cultivo y se midió la concentración de TNF- $\alpha$  utilizando un bioensayo. Los datos provienen de tres muestras independientes.

La figura 50 muestra la cinética de producción de TNF- $\alpha$ . La máxima concentración de TNF- $\alpha$  producida por la estimulación con LPS ocurre a las 6h post inducción y luego decae, lo que concuerda con trabajos previos en el tema (Conboy y col., 1999). La combinación de MAS con LPS produjo niveles mucho más altos de TNF-

$\alpha$  significativos desde las 4 h post inducción alcanzando, a las 24 h, valores cuatro veces mayores a los producidos por el LPS solo cuando su inducción es máxima. Estos resultados indican que MAS no sólo sinergiza la inducción con LPS sino que tiene un efecto sobre la duración y mantenimiento de la respuesta.

Para confirmar la especificidad de los resultados obtenidos se realizó un experimento similar de efecto concentración dependiente de MAS y LPS y se midió el nivel de TNF- $\alpha$  liberado a las 24 h de iniciada la inducción. Como se puede observar en la figura 51, el LPS solo indujo la producción de 300 pg/ml de TNF- $\alpha$ , el tratamiento solo con MAS produjo 50 pg/ml mientras que no se detectó la citoquina en el sobrenadante de los cultivos control. La adición de concentraciones crecientes de MAS con LPS sinergizó (3, 6 y 13 veces) la cantidad de TNF- $\alpha$  liberado en una manera dependiente de la dosis confirmando la especificidad de la acción.

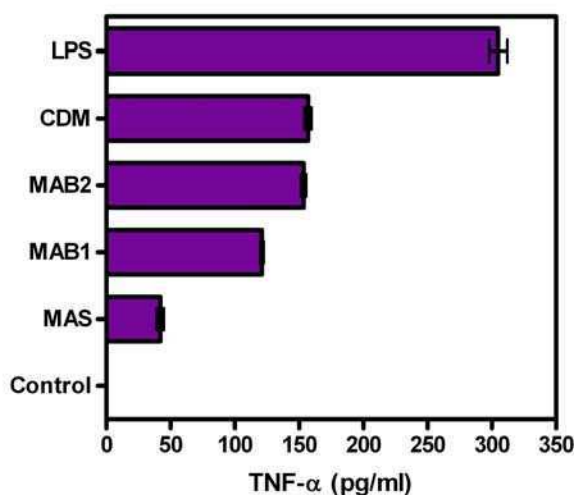


**Figura 51. Efecto de MAS sobre la producción de TNF- $\alpha$ .** Macrófagos peritoneales ( $5 \times 10^5$ ) cultivados por 24h fueron tratados con 50  $\mu$ g/ml de MAS, 10  $\mu$ g/ml de LPS sólo o la combinación de LPS más concentraciones crecientes de MAS (12, 25, 50  $\mu$ g/ml) durante 24 h. Al cabo de dicho tiempo se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  por un bioensayo. Sobrenadantes de tratamientos con MAS+LPS se neutralizaron con Ac-TNF- $\alpha$  (anticuerpo anti TNF- $\alpha$ ). Los datos provienen de 3 muestras independientes.

Debido a que el bioensayo utilizado para medir el TNF- $\alpha$  activo, se basa en la medición de la acción citopática de TNF- $\alpha$  sobre células L929, evaluamos su especificidad neutralizando los sobrenadantes de los cultivos tratados con un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ . La Figura 51 muestra la neutralización producida por el anticuerpo sobre el TNF- $\alpha$  presente en el sobrenadante de macrófagos estimulados con LPS+MAS 50  $\mu$ g/ml. Este resultado demuestra que efectivamente se trata de TNF- $\alpha$ . Esta neutralización se realizó en todos los ensayos presentados donde se mide TNF- $\alpha$  como control de la especificidad.

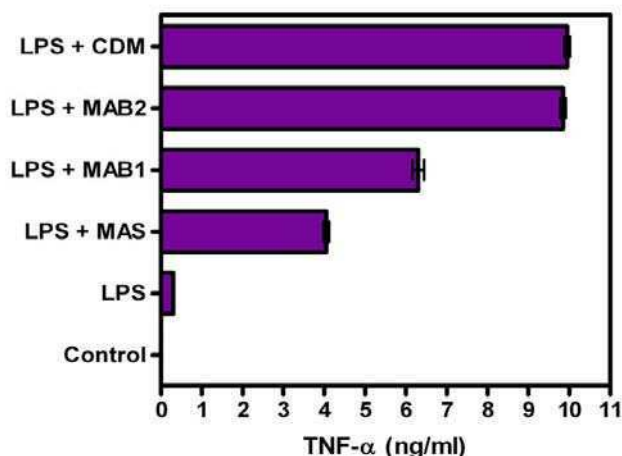
### Actividad moduladora comparada de fracciones obtenidas en el proceso de purificación del principio activo (CDM) a partir de hojas de *M. azedarach* L

En el proceso utilizado para la purificación de CDM se obtienen distintas fracciones con distinto grado de pureza todas con actividad antiviral. Ya que esta propiedad se usa como indicador de la presencia del principio activo, nosotros quisimos evaluar la acción de dichas fracciones sobre la producción de TNF- $\alpha$ . Como era de esperar, las fracciones más purificadas provocan un aumento mayor en la producción de TNF- $\alpha$  en comparación con MAS en idénticas condiciones de ensayo. La figura 52 muestra el efecto del agregado de MAS, MAB1, MAB2 y CDM a los cultivos de macrófagos. Esta vez los resultados se expresan en picomoles. Si bien, la estimulación producida por el LPS siempre es mayor, en el caso de MAB2 y el compuesto puro CDM, se obtuvieron valores mucho más altos de TNF- $\alpha$  (160 pg/ml) que cuando la estimulación se realizó con MAS (50 pg/ml). En cuanto al efecto sinérgico al agregarse las fracciones en combinación con el LPS (Figura 53) la producción de TNF- $\alpha$  llegó a un máximo de 10 ng/ml cuando la estimulación se realizó con CDM y LPS. CDM es 3 veces más activo que MAS y MAB2 es tan activo como CDM.



**Figura 52. Efecto comparativo de MAS, MAB1, MAB2 y CDM sobre la producción de TNF- $\alpha$ .** Cultivos de macrófagos peritoneales ( $5 \times 10^5$ ) fueron tratados con LPS solo, 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAS, 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAB1, 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAB2 o 50  $\mu\text{g/ml}$  de CDM durante 24 h. Los cultivos control fueron tratados con medio de cultivo sólo. A las 24 h post inducción los sobrenadantes fueron cosechados y se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  mediante la utilización de un bioensayo. Los datos provienen de 3 muestras independientes.

Estos resultados indican que CDM, el compuesto activo obtenido de *M. azedarach* L, induce la producción de TNF- $\alpha$  en la concentración utilizada aunque en menor proporción que el LPS.



**Figura 53. Efecto comparativo de la combinación del LPS con MAS, MAB1, MAB2 y CDM sobre la producción de TNF- $\alpha$ .** Cultivos de macrófagos peritoneales ( $5 \times 10^5$ ) fueron tratados con LPS sólo, o la combinación de LPS más 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAS, 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAB1, 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAB2 o 50  $\mu\text{g/ml}$  de CDM durante 24 h. Los cultivos control fueron tratados con medio de cultivo sólo. A las 24 h post inducción los sobrenadantes fueron cosechados y se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  mediante la utilización de un bioensayo. Los datos provienen de 3 muestras independientes.

### Virus HSV-2 como inductor

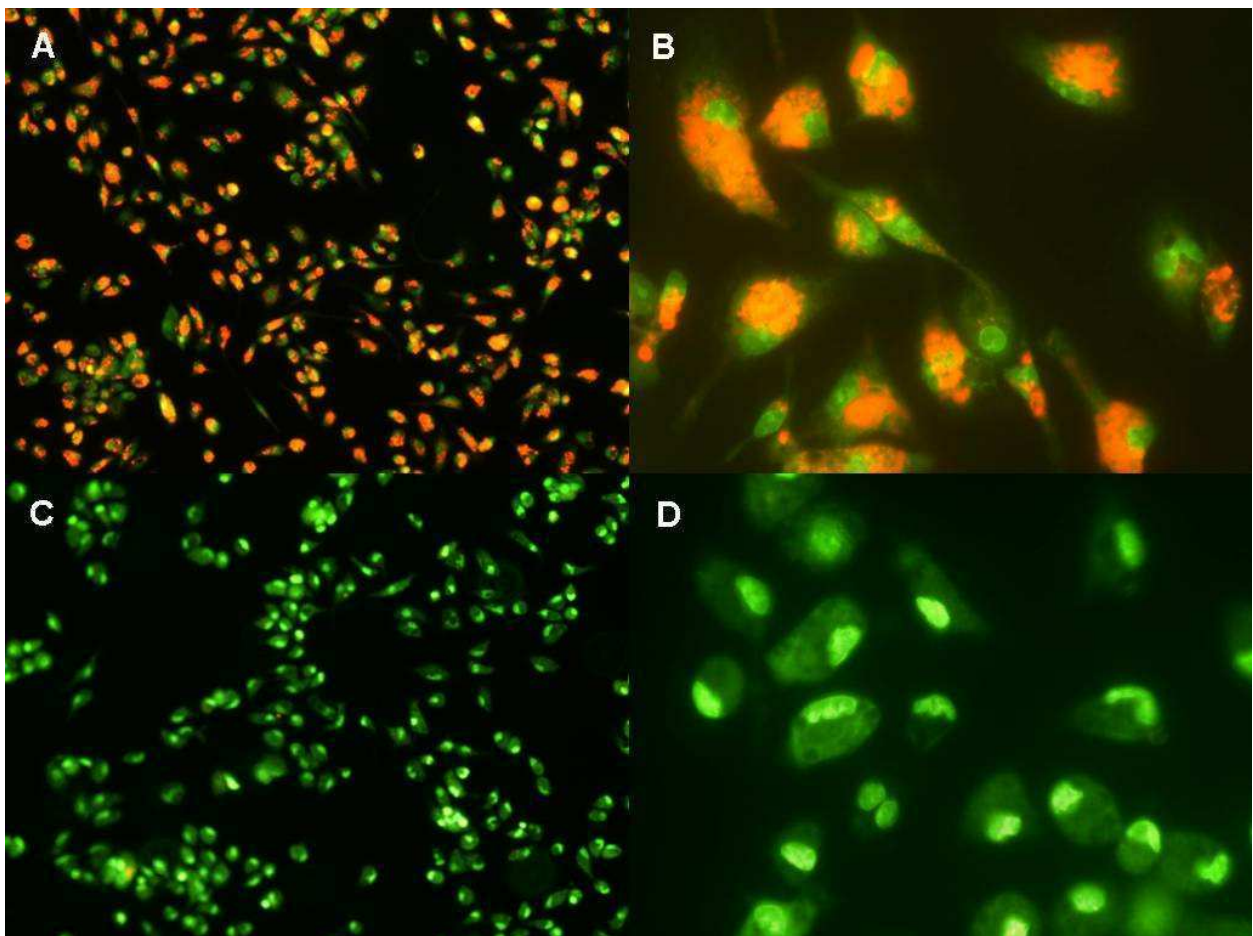
Uno de los virus más estudiados en cuanto a su susceptibilidad a meliicina como antiviral ha sido sin dudas HSV-1 (Villamil y col., 1995; Barquero y col., 1997 a y b; Alché y col., 2000; Alché y col., 2002; Pifarré y col., 2002; Alché y col., 2003) y en este trabajo de tesis HSV-2. Dado que existen modelos animales que reproducen las infecciones que ocurren en el hombre y puesto que es sabido que durante la infección herpética, los macrófagos son activados y estimulados a producir citoquinas además de llevar a cabo otras funciones (Ellerman-Eriksen, 2005) decidimos medir la acción de MAS utilizando al virus HSV-2 MS como inductor. Detrás de este objetivo yace la idea de buscar símiles de lo que pudo ocurrir con el tratamiento con MAS en la infección genital *in vivo*.

### Respuesta de los macrófagos al tratamiento con MAS

Si bien numerosos tipos de cultivos celulares son susceptibles a la inducción de un estado antiviral debido al pretratamiento con meliicina (Andrei y col., 1988; Wachsman y col. 1998), no sabíamos si este efecto se podía observar en cultivos de macrófagos. Una forma de evidenciar la acción de MA sobre las células es determinar si se produce la basificación de los endosomas.

El ensayo se llevó a cabo con macrófagos peritoneales extraídos por lavaje peritoneal de ratones BALB/c hembras de 8 semanas de edad, que se sembraron sobre cubreobjetos en microplacas de 24 pocillos. Se trataron con MAS (50  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 2 h, momento en el cual se lavaron con PBS frío y se incubaron durante 15

min. a 37°C con 5 µg/ml de naranja de acridina. Luego se realizaron lavados y se montaron los cubreobjetos para su visualización al microscopio. La Figura 54 muestra los resultados obtenidos. Las células macrofágicas sin tratar presentan gran parte del citoplasma con fluorescencia naranja que corresponde al colorante naranja de acridina que al entrar en los endosomas se protona y emite el color (Figura 54 A y B). El tratamiento con MAS basicifica los endosomas de los macrófagos y de esta manera no permite que el colorante permanezca en los endosomas, con la consecuente pérdida de fluorescencia naranja (Figura 54 C y D).



**Figura 54. Acción de MAS sobre la basificación de los endosomas en macrófagos peritoneales.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con vehículo (A y B) o con MAS (C y D) durante 2 h, luego de dicho tiempo se incubaron con naranja de acridina durante 15 min., se lavaron con PBS y se montaron. Los preparados se observaron al microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron. (A y C), aumento 10 X; (B y D) aumento 100X

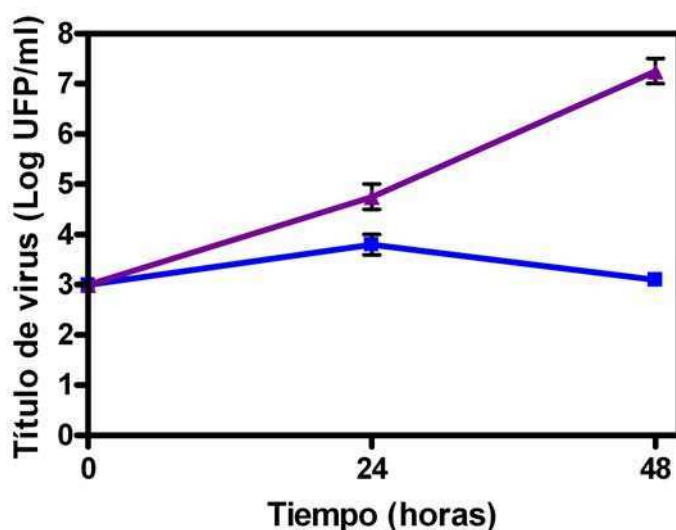
Este ensayo nos permite concluir que MAS basicifica los endosomas de los macrófagos peritoneales bajo las mismas condiciones que lo hace en otros tipos celulares. (Wachsman y col. 1998)

Por otro lado, por medio de la visualización al microscopio de la morfología de las células teñidas con naranja de acridina se determinó que aproximadamente el 90% de las células son macrófagos.

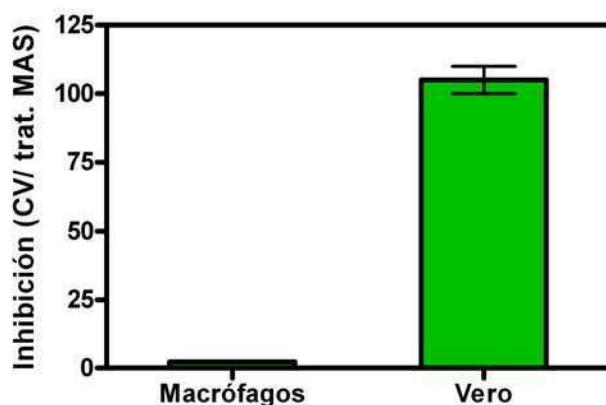
### Replicación de HSV-2 en cultivos de macrófagos peritoneales

La mayor parte del conocimiento de la acción de MA sobre HSV-1 y HSV-2 se realizó en células Vero, por lo que queríamos saber si HSV-2 replicaba en los cultivos de macrófagos y si MA ejercía un efecto antiviral que pudiera interferir sobre la capacidad del virus para inducir la producción de citoquinas.

El primer ensayo que realizamos fue evaluar el rendimiento viral al infectar cultivos de macrófagos peritoneales murinos con HSV-2 MS. Como se puede observar en la figura 55, el título de HSV-2 MS no aumenta en función del tiempo en los cultivos de macrófagos, pero si lo hace y en gran medida en las células Vero llegando a 7 Log UFP/ml a las 48 h. Si bien el tratamiento con MAS durante 24 h produce una disminución del título de 5 veces con respecto al control en los macrófagos, esta disminución es despreciable si la comparamos con la acción de MAS sobre HSV-2 en células Vero (Figura 56). Estos resultados concuerdan con el hecho de que los macrófagos poseen actividad antiviral intrínseca contra herpes siendo generalmente no permisivos a la replicación viral, protegiendo a otras células de la infección (Mogensen y Virelizier, 1987). Por lo tanto, creemos que MAS no tiene el mismo efecto en los macrófagos que en las células Vero debido a la diferencia en la replicación viral.



**Figura 55. Diferencias en la producción de HSV-2 MS en macrófagos peritoneales y células Vero.** Cultivos de macrófagos peritoneales (azul) o cultivos de células Vero (violeta) fueron infectados con HSV-2 MS ( $10^3$  UFP). A las 24 y 48 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se midió el título viral por el método de UFP.



**Figura 56. Inhibición de la replicación de HSV-2 MS por la acción de MAS.** Macrófagos peritoneales y células Vero infectados con HSV-2 MS ( $10^3$  UFP) fueron tratados con vehículo o MAS. A las 24 hs p.i. se cosecharon los sobrenadantes y se midió el título viral por el método de UFP. La inhibición se expresó como el título de virus en el cultivo control dividido el título de virus en el cultivo tratado con MAS

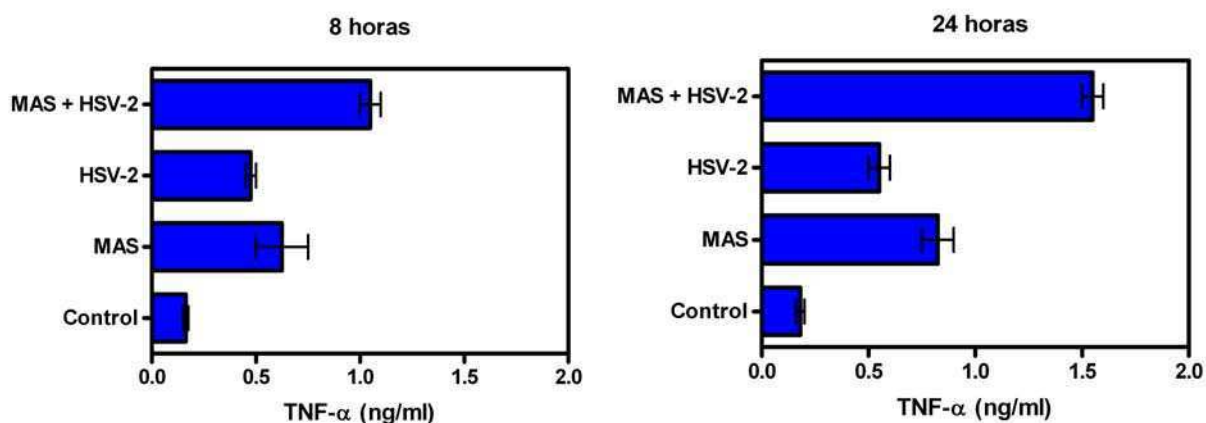
Estos resultados indican que HSV-2 replica en macrófagos pero a muy bajo título y a pesar de que meliicina puede inhibir más de 100 veces la replicación de HSV-2 MS en células Vero no es tan efectiva como antiviral en los macrófagos.

### **Efecto de MAS sobre la inducción de TNF- $\alpha$ por HSV-2**

Una vez establecido el hecho de que MAS no estaría interfiriendo con la replicación de HSV-2, se procedió a evaluar la producción de TNF- $\alpha$  en los macrófagos peritoneales inducidos con HSV-2. Para esto se cultivaron macrófagos peritoneales en microplacas de 24 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^5$  macrófagos / pocillo y se realizaron tratamientos con 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAS,  $10^4$  UFP de HSV-2 MS o la combinación de ambos. Vale la pena aclarar que la inducción con el virus se realizó sin llevar a cabo el paso de adsorción, fue agregado de la misma manera que MAS y se mantuvo en el medio hasta que se cosecharon los sobrenadantes a las 8 y a las 24 h para la determinación del TNF- $\alpha$  por el bioensayo.

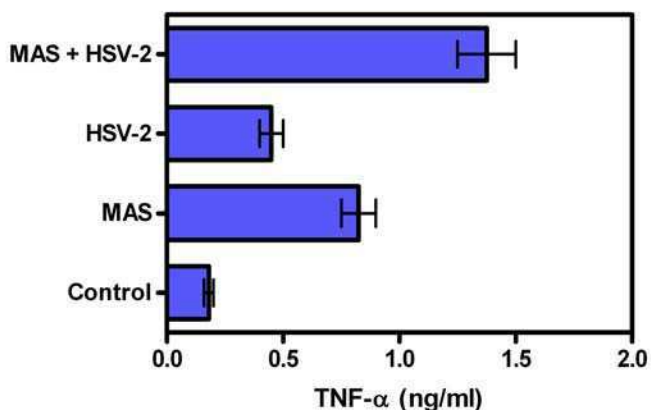
La figura 57 muestra que tanto MAS como HSV-2 MS producen un aumento en la producción de TNF- $\alpha$  a los dos tiempos ensayados, siendo en ambos casos mayores a las 24 h. La combinación de ambos inductores lleva a un aumento que corresponde aproximadamente a la suma de las inducciones por separado.





**Figura 57. Producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos peritoneales estimulados con HSV-2.** Macrófagos peritoneales fueron cultivados y tratados con medio de cultivo, MAS (50  $\mu$ g/ml), HSV-2 MS ( $10^4$  UFP) o la combinación de ambos. A las 8 y 24 hs se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  por medio de un bioensayo. Los datos provienen de tres muestras independientes.

De los experimentos realizados surge que el HSV-2 replica a niveles muy bajos en los macrófagos, por lo que quisimos saber si el aumento en la producción de TNF- $\alpha$  medido se debía a la infección viral o a que el virus produce la inducción a través de la interacción de sus glicoproteínas con los receptores. Para esto realizamos la inactivación de alícuotas de HSV-2 MS por exposición a la luz UV. Una vez inactivado el virus procedimos a evaluar su efecto como inductor. Para ello, se realizó el mismo protocolo usado con el virus sin inactivar. La figura 58 muestra que la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos peritoneales inducidos con HSV-2 inactivado es similar a la obtenida con el virus infeccioso, ya sea cuando la inducción se realizó con virus solo como en combinación con MAS.



**Figura 58. Producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos peritoneales estimulados con HSV-2 inactivado.** Macrófagos peritoneales fueron cultivados y tratados con medio de cultivo, MAS (50  $\mu$ g/ml), HSV-2 MS inactivado ( $10^4$  UFP) o la combinación de ambos. A las 8 y 24 hs se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  por medio de un bioensayo. Los datos provienen de tres muestras independientes.

Estos resultados nos llevan a postular que no es necesario que el virus HSV-2 MS infecte a los macrófagos peritoneales para que se induzca la producción de TNF- $\alpha$  medida en las condiciones descritas aunque el virus es un inductor pobre. Además esta respuesta no parece estar afectada por la acción antiviral de MAS, ya que no hay una disminución en la cantidad de TNF- $\alpha$  cuando ambos inductores son agregados simultáneamente. Estos datos coinciden con resultados publicados anteriormente, donde se ha descrito que HSV induce la expresión de TNF- $\alpha$  en macrófagos a través de distintos mecanismos que involucran a las glicoproteínas virales, a eventos tempranos luego de la entrada del virus y a la RNA-PKR (Paludan y Mogensen, 2001). La baja producción de TNF- $\alpha$  medida se debería a que el virus no está multiplicando y por lo tanto la activación se realizaría únicamente a través de las glicoproteínas virales, lo que baja su eficiencia de inducción.

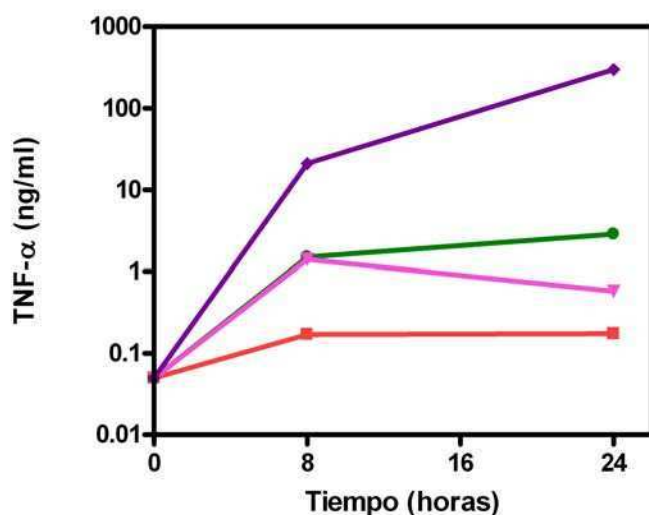
### **Inductor IFN- $\gamma$**

El IFN- $\gamma$  es una citoquina que tiene acción sobre un amplio rango de tipos celulares incluyendo células inmunes o no. De todos estos tipos celulares, uno de los más importantes son los macrófagos donde el IFN- $\gamma$  activa directamente sus funciones microbicidas. La exposición del macrófago al IFN- $\gamma$  produce la activación del factor de transcripción IRF-1 con la consecuente alteración en la expresión del genoma (Liu y col., 2007). Debido a esto, quisimos evaluar si la producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos inducidos con IFN- $\gamma$  se veía afectada por el agregado de MAS.

Sorpresivamente, cuando utilizamos IFN- $\gamma$  como inductor encontramos que la producción de TNF- $\alpha$  presenta una cinética similar a la producida por la estimulación con LPS. Los macrófagos peritoneales fueron cultivados y tratados con MAS (50  $\mu$ g/ml), IFN- $\gamma$  recombinante de ratón (100 UI) o la combinación de ambos. A las 8 y 24 h post tratamiento se midió la concentración de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes por medio de un bioensayo. Como se puede observar en la figura 59, la inducción de TNF- $\alpha$  producida por MAS o por el IFN- $\gamma$  solos o por separado es similar, llegando a 1,5 ng/ml a las 8 hs. Esta concentración de TNF- $\alpha$  aumenta a 2,85 ng/ml a las 24 h en la inducción con MAS y disminuye en el tratamiento con IFN- $\gamma$  alcanzando 0,65 ng/ml. Sorpresivamente, el tratamiento con la combinación de MAS e IFN- $\gamma$  induce la

producción de 21 ng/ml a las 8 hs y 300 ng/ml a las 24 hs. Estos datos fueron confirmados al realizar la neutralización del TNF- $\alpha$  con un anticuerpo específico, hecho que descarta la posibilidad de que el efecto citopático observado en el biosensayo se deba a otra razón que no sea propiamente la producida por el TNF- $\alpha$ .

Con estos resultados podemos concluir que MAS presenta un efecto sinérgico sobre la producción de TNF- $\alpha$  al combinarse con el IFN- $\gamma$  y que además mantiene el efecto en el tiempo. Estos resultados concuerdan con los publicados previamente (Conboy y col., 1999), donde se ve un aumento en la producción de TNF- $\alpha$  que se mantiene en el tiempo al estimular los macrófagos con IFN- $\gamma$  y bafilomicina, un inhibidor de la V-ATPasa celular que al igual que MAS produce la basificación de los endosomas.

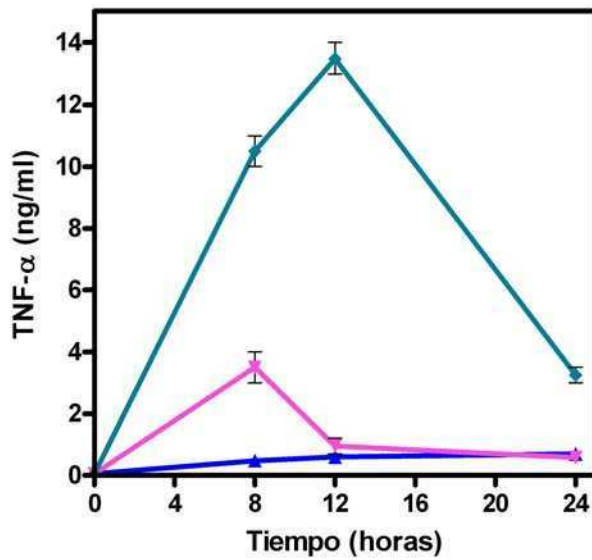


**Figura 59. Producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos estimulados con IFN- $\gamma$ .** Macrófagos peritoneales ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) fueron tratados con vehículo (■), MAS (50  $\mu$ g/ml) (●), IFN- $\gamma$  (100 UI) (▼) o la combinación de ambos (◆). A las 8 y 24 hs se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  por un biosensayo. Los datos provienen de tres muestras independientes.

### Inducción con IFN- $\gamma$ y HSV-2

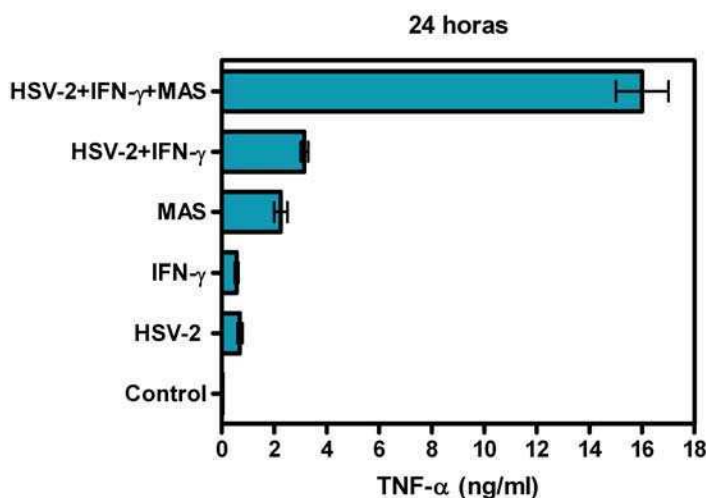
Debido a que estudios publicados previamente demostraron que la estimulación con IFN- $\gamma$  de una línea de macrófagos infectada con HSV-2 sinergiza la producción de TNF- $\alpha$  (Paludan y col., 1998), quisimos evaluar si ocurría lo mismo en nuestro sistema donde el virus es utilizado como inductor. Para ello, realizamos inducciones a distintos tiempos. Cultivos de macrófagos peritoneales ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) fueron tratados con medio de cultivo, HSV-2 MS ( $10^4$  UFP), IFN- $\gamma$  de ratón (100 UI) o la combinación de ambos. Al cabo de 8, 12 y 24 h post inducción se cosecharon los sobrenadantes y se midió la presencia de TNF- $\alpha$  utilizando un biosensayo.

Como se puede observar en la figura 60, el virus es un pobre inductor de TNF- $\alpha$  tanto a las 8 como a las 12 h, mientras que el IFN- $\gamma$  presenta un pico máximo de 3 ng/ml a las 8 h que disminuye a 1 ng/ml a las 12 h. La combinación de HSV-2 e IFN- $\gamma$  aumenta sinérgicamente la concentración de TNF- $\alpha$ , alcanzando un máximo de 13 ng/ml a las 12 h post inducción que se reduce a 3 ng/ml a las 24 h.



**Figura 60. Producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos estimulados con IFN- $\gamma$  y HSV-2.** Macrófagos peritoneales ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) fueron tratados con vehículo, HSV-2 MS ( $10^4$  UFP) ( $\blacktriangle$ ), IFN- $\gamma$  (100 UI) ( $\blacktriangledown$ ) o la combinación de ambos ( $\blacklozenge$ ). A las 8, 12 y 24 h se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  mediante la utilización de un bioensayo. Los datos provienen de tres muestras independientes.

Al agregar MAS a la inducción de los cultivos de macrófagos peritoneales con IFN- $\gamma$  y HSV-2 MS se pudo observar que MAS mantiene el efecto sinérgico observado hasta las 24 h post inducción (Figura 61).



**Figura 61. Producción de TNF- $\alpha$  en macrófagos estimulados con HSV-2, IFN- $\gamma$  y MAS.** Macrófagos peritoneales ( $5 \times 10^5$  células/pocillo) fueron tratados con vehículo, MAS (50  $\mu$ g/ml), IFN- $\gamma$  (100 UI), HSV-2 MS ( $10^4$  UFP) o la combinación de todos los inductores. A las 24 h se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  por un bioensayo. Los datos provienen de tres muestras independientes.

Debido a los resultados obtenidos al inducir en forma conjunta con MAS e IFN- $\gamma$ , suponemos que este fenómeno se debe únicamente al sinergismo producido entre MAS y el IFN- $\gamma$  (Figura 59), ya que MAS no sinergiza con HSV-2 en la producción de TNF- $\alpha$  (Figura 57).

Paludan y colaboradores demostraron que la expresión de TNF- $\alpha$  en macrófagos infectados con HSV-2 obedece a las vías dependientes de NF- $\kappa$ B y de p38 (ATF-2/Jun) y que se requieren ambas señales para que la expresión del TNF- $\alpha$  se produzca. Por otro lado sería ese TNF- $\alpha$  producido el que llevaría al efecto sinérgico producido por la combinación de HSV e IFN- $\gamma$  (Paludan y col., 1998; Paludan, 2000).

## **Síntesis de citoquinas**

### **Inductor LPS**

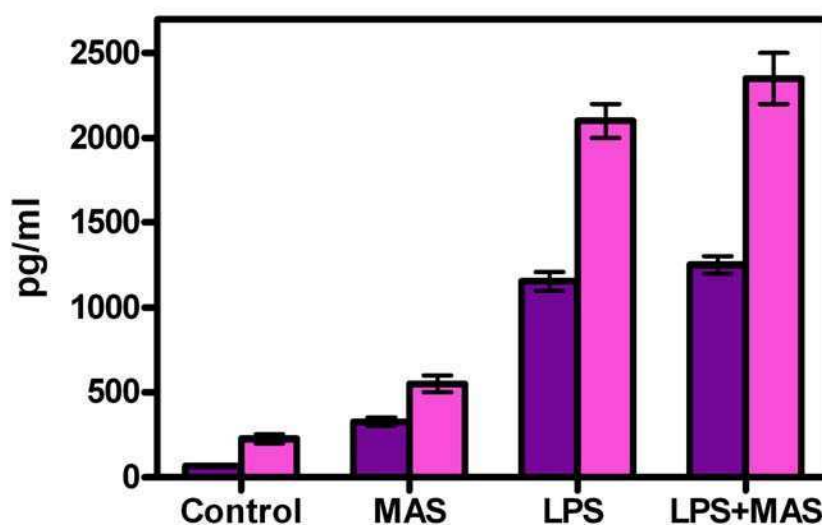
#### **Efecto modulador de MAS sobre la síntesis de citoquinas en macrófagos inducidos con LPS**

Además del TNF- $\alpha$  se ha comprobado que los lipopolisacáridos bacterianos estimulan a los macrófagos a la producción de otras moléculas proinflamatorias como el óxido nítrico, IL-6 e IL-12, como también anti-inflamatorias como IL-10 (Conboy y col., 1999). Teniendo en cuenta los resultados anteriores donde la inducción de macrófagos con MAS produjo un aumento en la producción de TNF- $\alpha$ , decidimos investigar si MAS tenía algún efecto sobre la síntesis y producción de las otras citoquinas mencionadas.

### **IL-6 e IFN- $\gamma$**

El IFN- $\gamma$  es una citoquina pleiotrópica producida por las células T y las NK. Debido a que estudios recientes han demostrado que los macrófagos también pueden producir IFN- $\gamma$  (Gessani y Belardelli, 1998) y a que esta producción está aumentada por la inducción con LPS (Fultz y col., 1993), decidimos evaluar la acción de MAS sobre su producción. Para medir la producción de IL-6 e IFN- $\gamma$ , cultivos de macrófagos peritoneales ( $10^6$  células /pocillo) cultivados durante 24 h fueron estimulados con 50  $\mu$ g/ml de MAS, 10  $\mu$ g/ml de LPS o la combinación de ambos, durante 24 h. Al cabo de

dicho tiempo se midió la concentración de las citoquinas en los sobrenadantes



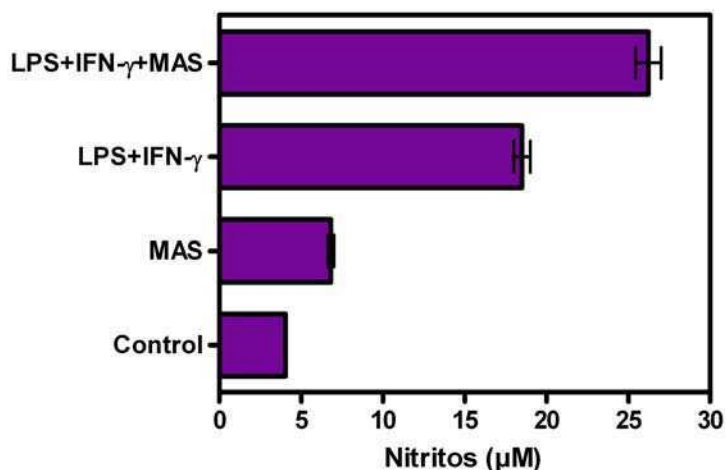
**Figura 62. Producción de IL-6 e IFN- $\gamma$  en macrófagos peritoneales inducidos con MAS.** Macrófagos peritoneales ( $10^6$  células por pocillo) fueron tratados con medio de cultivo, MAS, LPS o LPS + MAS durante 24 h, momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-6 (■) e IFN- $\gamma$  (■) por medio de ensayos de ELISA. Los datos provienen de 3 muestras independientes.

celulares utilizando la técnica de ELISA. La figura 62 muestra que MAS *per se* produjo un leve aumento de ambas citoquinas que no es comparable con el efecto del LPS, y a diferencia de lo observado con el TNF- $\alpha$  la combinación de MAS con LPS no produjo sinergismo en la producción de IL-6 y de IFN- $\gamma$ .

Este resultado indicaría que MAS no participa directamente en la inducción de IL-6 e IFN- $\gamma$ .

### Óxido nítrico

El NO es un gas que actúa como mediador en la reacción de inflamación y es producido mayormente por los macrófagos. Una forma de medir el NO indirectamente es utilizar la técnica de Griess que mide la presencia de nitritos. Para conocer si MAS influenciaba la producción de NO, cultivos de macrófagos peritoneales fueron inducidos con LPS + IFN- $\gamma$ , citoquina necesaria que permite la expresión de la enzima iNOS, responsable de la producción de NO. La figura 63 muestra que el tratamiento de los macrófagos con MAS *per se* aumentó levemente la producción de nitritos en comparación con la producción basal que muestra el control.



**Figura 63. Producción de nitritos en macrófagos peritoneales inducidos con LPS + IFN- $\gamma$  en presencia de MAS.** Cultivos de macrófagos peritoneales ( $10^6$  células por pocillo) fueron tratados con medio de cultivo, MAS, LPS + IFN- $\gamma$  o LPS + IFN- $\gamma$ + MAS durante 24 h, momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de nitritos por medio de la técnica de Griess. Los datos provienen de 3 muestras independientes

La inducción con LPS + IFN- $\gamma$  produjo una concentración 3 veces mayor de nitritos (19  $\mu$ M) que con MAS sola y la combinación del inductor con MAS aumentó de 19 a 27  $\mu$ M. Estos valores parecen indicar que si bien MAS aumenta la producción de nitritos en combinación con LPS + IFN- $\gamma$  no lo hace en una forma sinérgica sino de manera aditiva, ya que la concentración de nitritos determinada es aproximadamente la suma de los valores obtenidos en cada tratamiento por separado.

Para evaluar si el efecto observado se debía a la posibilidad de que estuviera aumentada la expresión de la enzima iNOS, se realizó un western blot. Para revelar la presencia de dicha enzima, cultivos de macrófagos fueron tratados con medio de cultivo solo, LPS+ IFN- $\gamma$ , MAS o la combinación de LPS+ IFN- $\gamma$ + MAS durante 24h, momento en el cual las células fueron cosechadas y procesadas para someterlas a una corrida electroforética. La figura 64 muestra que la inducción combinada de LPS, IFN- $\gamma$  y MAS no produce un aumento significativo en la expresión de la enzima iNOS con respecto a la inducción producida por el LPS + IFN- $\gamma$ , determinado por densitometría.

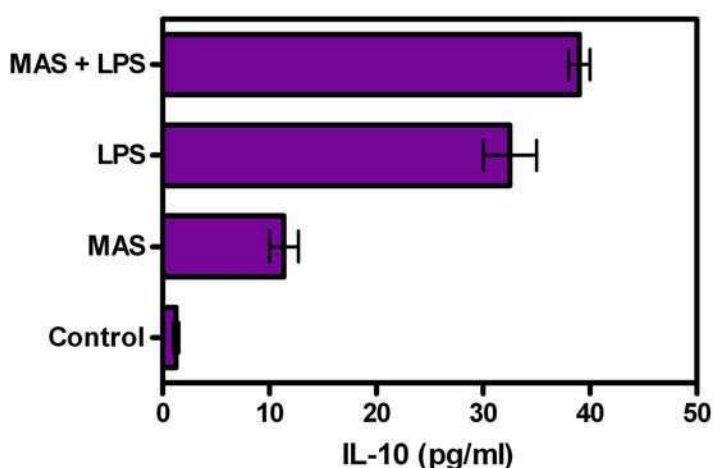


**Figura 64. Expresión de iNOS en macrófagos peritoneales.** Se realizó la técnica de Western blot para evidenciar la expresión de la enzima iNOS en macrófagos tratados con LPS+IFN- $\gamma$ , MAS o LPS+IFN- $\gamma$ +MAS durante 24 hs.

Por lo tanto, el aumento observado en la producción de nitritos no se debe a un aumento en la expresión de la enzima responsable.

## IL-10

La IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria que es producida en los macrófagos como resultado de la inducción con LPS, entre otros inductores. Como hemos observado, MAS es capaz de inducir la producción de citoquinas proinflamatorias, por lo tanto quisimos evaluar su potencial acción anti-inflamatoria. Para medir la producción de IL-10, estimulamos cultivos de macrófagos peritoneales ( $10^6$  células /pocillo) con 50  $\mu\text{g/ml}$  de MAS, 10  $\mu\text{g/ml}$  de LPS o la combinación de ambos. A las 24 h se midió la concentración de la interleuquina en los sobrenadantes celulares utilizando la técnica de ELISA.



**Figura 65. Producción de IL-10 en macrófagos peritoneales inducidos con MAS.** Macrófagos peritoneales ( $10^6$  células por pocillo) fueron tratados con medio de cultivo, MAS, LPS o LPS + MAS durante 24 h, momento en el cual se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-10 por medio de un ensayo de ELISA. Los datos provienen de 3 muestras independientes.

Como se observa en la figura 65, contrariamente con lo obtenido para la inducción con el LPS, la producción de IL-10 inducida por MAS sola fue baja (12 pg/ml) y la inducción conjunta de MAS con LPS no presentó un efecto sinérgico.

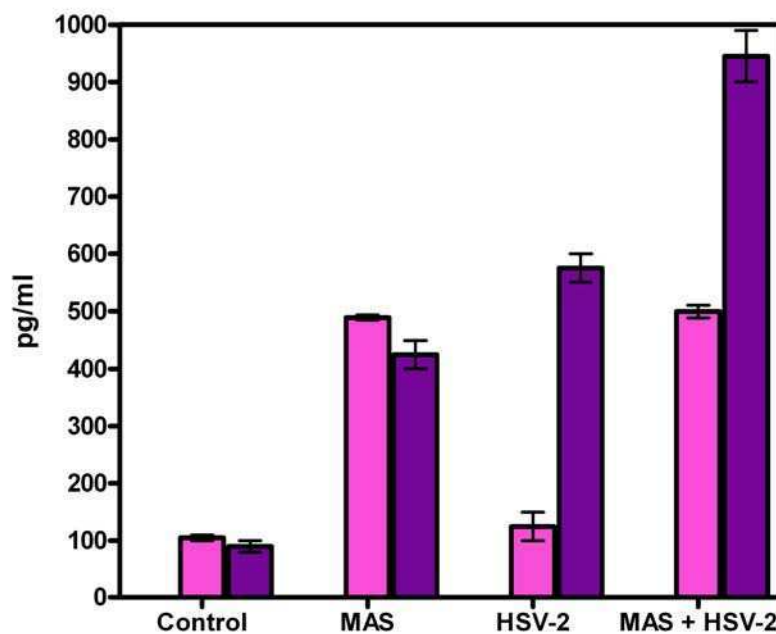
De los resultados obtenidos al estimular los macrófagos con un inductor bacteriano, podemos concluir que meliacina “per se” induce un aumento en la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, nitritos, IFN- $\gamma$  e IL-10. Si bien, la estimulación simultánea con LPS y MAS tiene un efecto sinérgico sobre la producción y mantenimiento en el tiempo de la liberación de TNF- $\alpha$ , este sinergismo no se vio en ninguno de los ensayos realizados para medir las otras citoquinas. El efecto observado en los macrófagos tratados con meliacina podría deberse a la producción inicial de TNF- $\alpha$  y ser este factor el responsable de la inducción posterior de las otras citoquinas.



## Inductor HSV-2

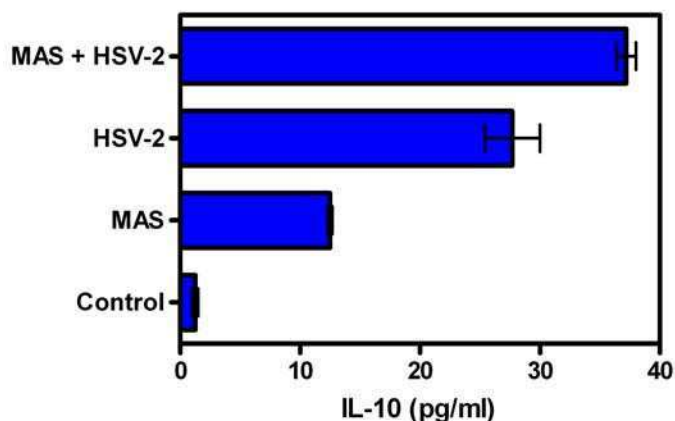
### Acción de MAS sobre la síntesis de citoquinas en macrófagos peritoneales

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al evaluar la producción de citoquinas en combinación con el LPS y considerando el hecho de que los macrófagos producen citoquinas pro-inflamatorias en respuesta al virus herpes, quisimos determinar la presencia de citoquinas en el sobrenadante de los macrófagos estimulados con MAS, HSV-2 MS o la combinación de ambos. Para ello, se sembraron  $10^6$  macrófagos peritoneales por pocillo y se trataron con MAS (50  $\mu\text{g/ml}$ ), HSV-2 MS ( $10^4$  UFP) o la combinación de ambos durante 24 hs. Una vez cumplido el tiempo de incubación se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10 utilizando la técnica de ELISA y nitritos por la técnica de Griess. La figura 66 muestra que el tratamiento con MAS produce per se una inducción significativa de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-6, mientras que HSV-2 sólo aumenta significativamente la síntesis de IFN- $\gamma$ . Cuando se trató con la combinación de MAS y HSV-2 se vio que la inducción ocasionada es de tipo aditiva en el caso del IFN- $\gamma$  y que es igual a la llevada a cabo por MAS sola en la medición de IL-6.



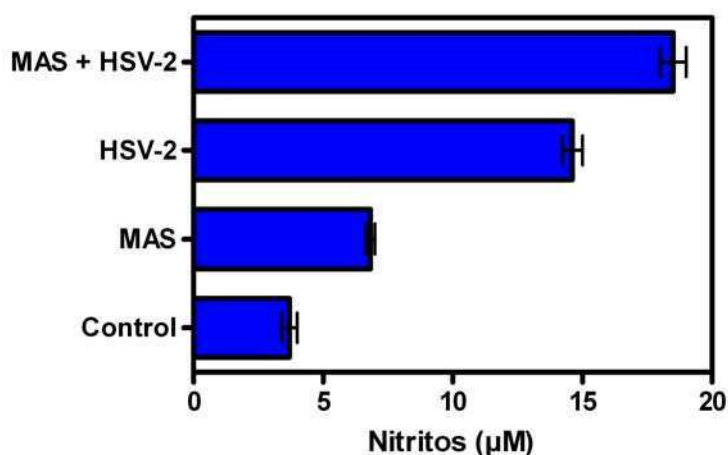
**Figura 66. Producción de citoquinas en macrófagos estimulados con HSV-2.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con MAS (50  $\mu\text{g/ml}$ ), HSV-2 MS ( $10^4$  UFP) o la combinación de ambos. A las 24 hs se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de IFN- $\gamma$  (■) e IL-6 (■) por ELISA. Los datos provienen de tres muestras independientes.

La figura 67 muestra las diferencias obtenidas al medir la presencia de IL-10 en el sobrenadante de los macrófagos tratados. Se observa que al igual que en el caso de la medición del IFN- $\gamma$ , tanto MAS como HSV-2 producen un aumento de la citoquina per se, pero su combinación parece tener un efecto aditivo.



**Figura 67. Producción de IL-10 en macrófagos estimulados con HSV-2.** Macrófagos peritoneales ( $10^6$  células / pocillo) fueron tratados con MAS (50  $\mu$ g/ml), HSV-2 MS ( $10^4$  UFP) o la combinación de ambos. A las 24 hs se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-10 por ELISA. Los datos provienen de tres muestras independientes.

Resultados similares se obtuvieron al medir la producción de nitritos en los sobrenadantes de los cultivos tratados, el tratamiento con MAS y con HSV-2 por separado aumenta la concentración de nitritos. La inducción conjunta con ambos inductores lleva a un aumento en la producción de nitritos que parece aproximarse a la suma de ambas inducciones por separado (Figura 68).



**Figura 68. Producción de nitritos en macrófagos estimulados con HSV-2.** Macrófagos peritoneales ( $10^6$  células/pocillo) fueron tratados con MAS (50  $\mu$ g/ml), HSV-2 MS ( $10^4$  UFP) o la combinación de ambos. A las 24 hs se cosecharon los sobrenadantes y se determinó la concentración de nitritos por el método de Griess. Los datos provienen de tres muestras independientes.

Al igual que en el tratamiento con LPS, no hubo diferencias en la expresión de la enzima iNOS entre los tratamientos con HSV-2 y HSV-2+MAS, como lo pudimos comprobar realizando un western para revelar la presencia de dicha proteína (resultados que no se muestran)

Los resultados obtenidos al estimular macrófagos peritoneales con MAS y HSV-2 para medir la producción de citoquinas nos muestran que si bien en la mayoría de los casos tanto MAS como HSV-2 pueden estimular la producción, no presentan una interacción entre ellos. Este hecho se debe a que en todos los casos la inducción combinada de MAS con HSV-2 provoca un aumento de la citoquina en cuestión cercano a la suma de las inducciones por separado, con lo cual creemos que no hay una interacción entre las vías de estimulación utilizadas por ambos sino que ambas estimulaciones por separado se suman. Hay una gran diferencia con algunos de los resultados observados en el caso de la estimulación con LPS donde se puede observar un efecto sinérgico.

**EFFECTO DE MELIACINA SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DEL FACTOR  
DE TRANSCRIPCIÓN NF- $\kappa$ B EN MACRÓFAGOS PERITONEALES**

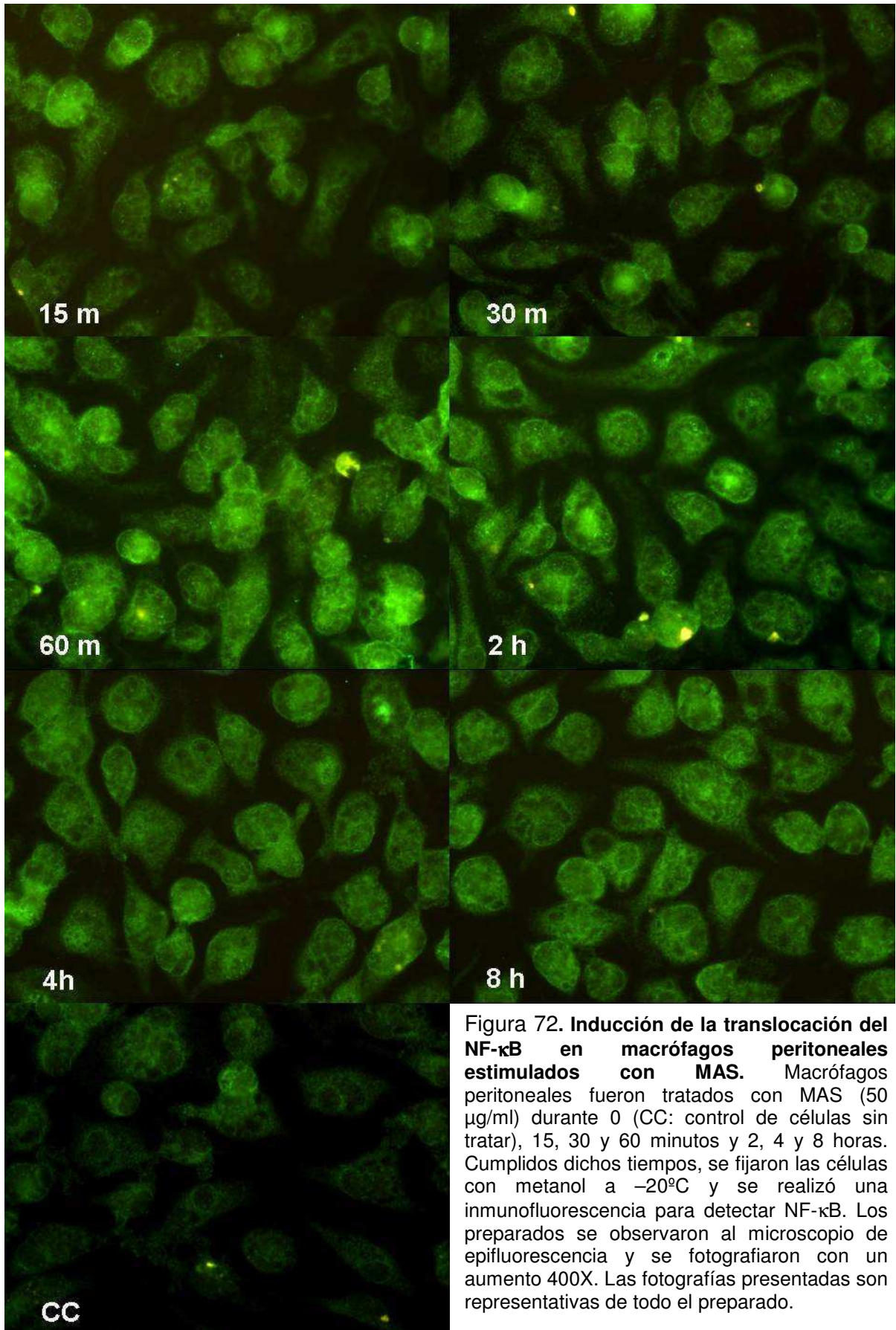
## **Introducción**

El NF- $\kappa$ B es uno de los principales factores de transcripción involucrados en la producción de citoquinas en los macrófagos. En condiciones fisiológicas este factor está secuestrado en el citoplasma por proteínas inhibitoras denominadas I $\kappa$ B que son degradadas al activarse la cascada de señal, liberando al factor y permitiendo su localización en el núcleo y posterior activación de la transcripción.

Como vimos anteriormente en esta tesis MAS puede inducir la producción de distintas citoquinas en macrófagos peritoneales murinos, por eso decidimos evaluar el efecto de este antiviral sobre la translocación del factor NF- $\kappa$ B con el objetivo de analizar la especificidad del fenómeno observado. Para evidenciar la translocación se utilizó una reacción de inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo dirigido a la subunidad p65 de dicho factor. A los efectos de comparar la acción de meliacina con inductores conocidos se trabajó también con LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y HSV-2.

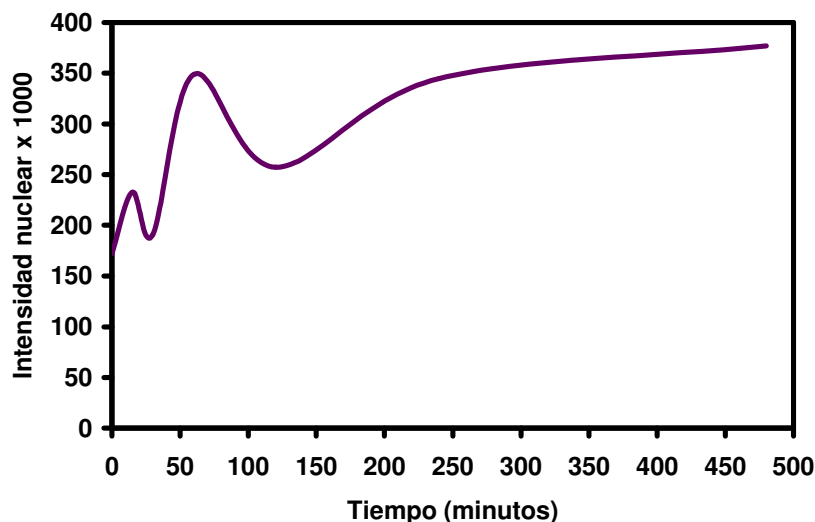
## **MAS como inductor de la translocación del factor NF- $\kappa$ B**

Primeramente, evaluamos la acción de meliacina como posible inductor de la translocación del NF- $\kappa$ B en macrófagos peritoneales murinos. Para ello, realizamos tratamientos con MAS durante distintos tiempos y determinamos la localización del factor por medio de una inmunofluorescencia indirecta. Macrófagos peritoneales fueron cultivados durante 24 h sobre cubreobjetos colocados en microplacas de 24 pocillos a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células/ pocillo. Luego de transcurrido ese tiempo, los cultivos se lavaron con PBS para remover las células no adheridas y se trataron con 50  $\mu$ g/ml de MAS durante 0, 15, 30, 60 minutos y 2, 4, y 8 horas. Cumplido el tiempo de inducción, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con metanol durante 10 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La localización intracelular del factor NF- $\kappa$ B se determinó utilizando un primer anticuerpo dirigido contra la subunidad p65 de dicho factor y un segundo anticuerpo conjugado con FITC. La figura 72 muestra la localización citoplasmática del NF- $\kappa$ B en las células control que se evidenció por la ausencia de fluorescencia en el núcleo. Sin embargo, a medida que aumentó el tiempo de exposición de los macrófagos a MAS, se observó un aumento en la intensidad de la fluorescencia total, así como también la aparición de fluorescencia en el núcleo de las células que se mantuvo hasta las 8 h después de la inducción.



**Figura 72. Inducción de la translocación del NF- $\kappa$ B en macrófagos peritoneales estimulados con MAS.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con MAS (50  $\mu$ g/ml) durante 0 (CC: control de células sin tratar), 15, 30 y 60 minutos y 2, 4 y 8 horas. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una inmunofluorescencia para detectar NF- $\kappa$ B. Los preparados se observaron al microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado.

Para confirmar esta observación, cuantificamos la intensidad de la fluorescencia nuclear de las células individuales por medio del análisis de imagen de los patrones de fluorescencia de cada fotografía (ver Materiales y Métodos). Este procedimiento fue repetido para cada célula dentro de un campo ( $n = 10$ ) y los resultados presentados son el promedio de estas mediciones. Como se puede observar en la figura 73, el tratamiento con MAS produjo un aumento leve de la intensidad nuclear a los 15 minutos que luego disminuyó y volvió a aumentar con un pico máximo a los 60 minutos. Aunque la intensidad de la fluorescencia en el núcleo volvió a disminuir a las 2 h, lo hizo aproximadamente hasta el nivel alcanzado a los 15 minutos y se mantuvo en el tiempo hasta por lo menos las 8 h de inducción.



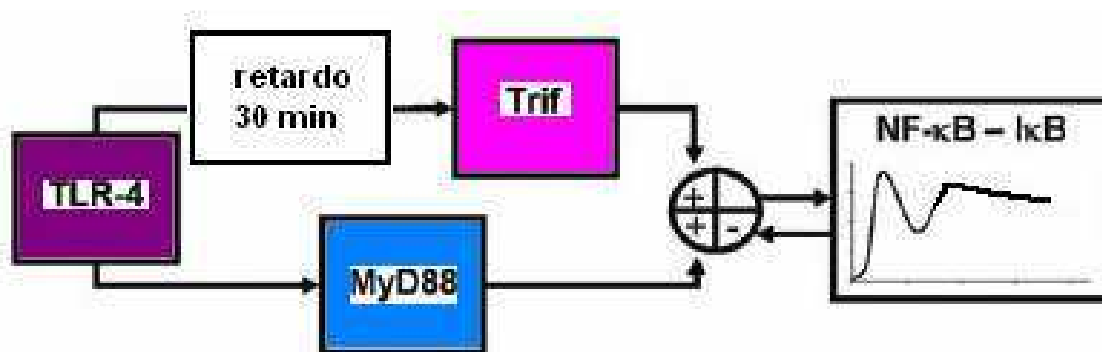
**Figura 73. Intensidad de la fluorescencia en el núcleo de macrófagos tratados con MAS.** Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de p65 observada en el núcleo de los macrófagos tratados con MAS durante distintos tiempos. Los valores son el promedio de la intensidad nuclear de cada célula individual ( $n=10$ ).

Esta medición pone en evidencia que el tratamiento de los macrófagos peritoneales con meliacina sola induce la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, y que esta inducción presenta un pico máximo de intensidad nuclear a los 60 minutos de inducción que luego, a pesar de disminuir, se mantiene hasta las 8 horas de inducción.

### **Acción de MAS sobre la translocación del NF- $\kappa$ B inducida por LPS**

La inducción producida por el LPS bacteriano se lleva a cabo a través de la unión al receptor celular TLR4, el cual se cree que puede activar dos caminos de señal cada uno de los cuales activaría directamente al NF- $\kappa$ B (Barton y Medzhitov, 2003).

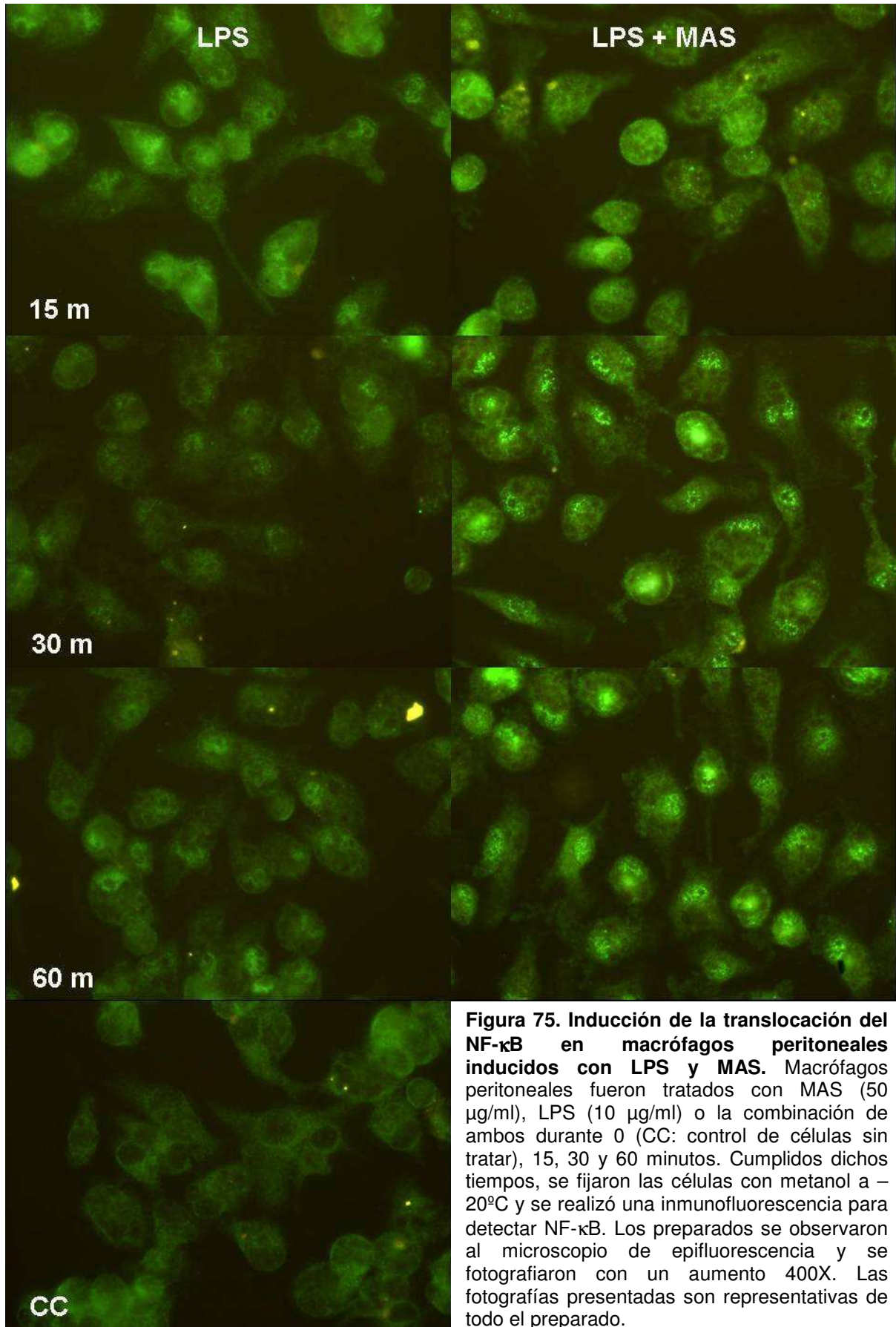
Uno es el camino dependiente de MyD88 (proteína adaptadora dependiente de mieloides) y el otro es un camino independiente de MyD88, que depende de la molécula adaptadora Trif (adaptador del IFN- $\beta$  que contiene el dominio TIR) y otras proteínas, que como resultado final llevan a la degradación del I $\kappa$ B. La activación del factor NF- $\kappa$ B a través del camino dependiente de MyD88 ocurre antes que la del camino independiente, lo que lleva en conjunto a un comportamiento no oscilatorio de la activación del NF- $\kappa$ B (Figura 74). Por lo tanto, midiendo la translocación al núcleo del factor de transcripción en función del tiempo, Baltimore y col. obtuvieron modelos computarizados que simulan la activación del NF- $\kappa$ B y hacen más fácil su estudio (Hoffmann y col., 2002; Covert y col., 2005). Nosotros quisimos evaluar el efecto del agregado de MAS sobre la inducción producida por LPS en los macrófagos peritoneales. Para esto realizamos una IFI para evidenciar la localización del NF- $\kappa$ B y cuantificamos la intensidad de la fluorescencia en función del tiempo, imitando de forma más elemental el modelo presentado por Baltimore y col.



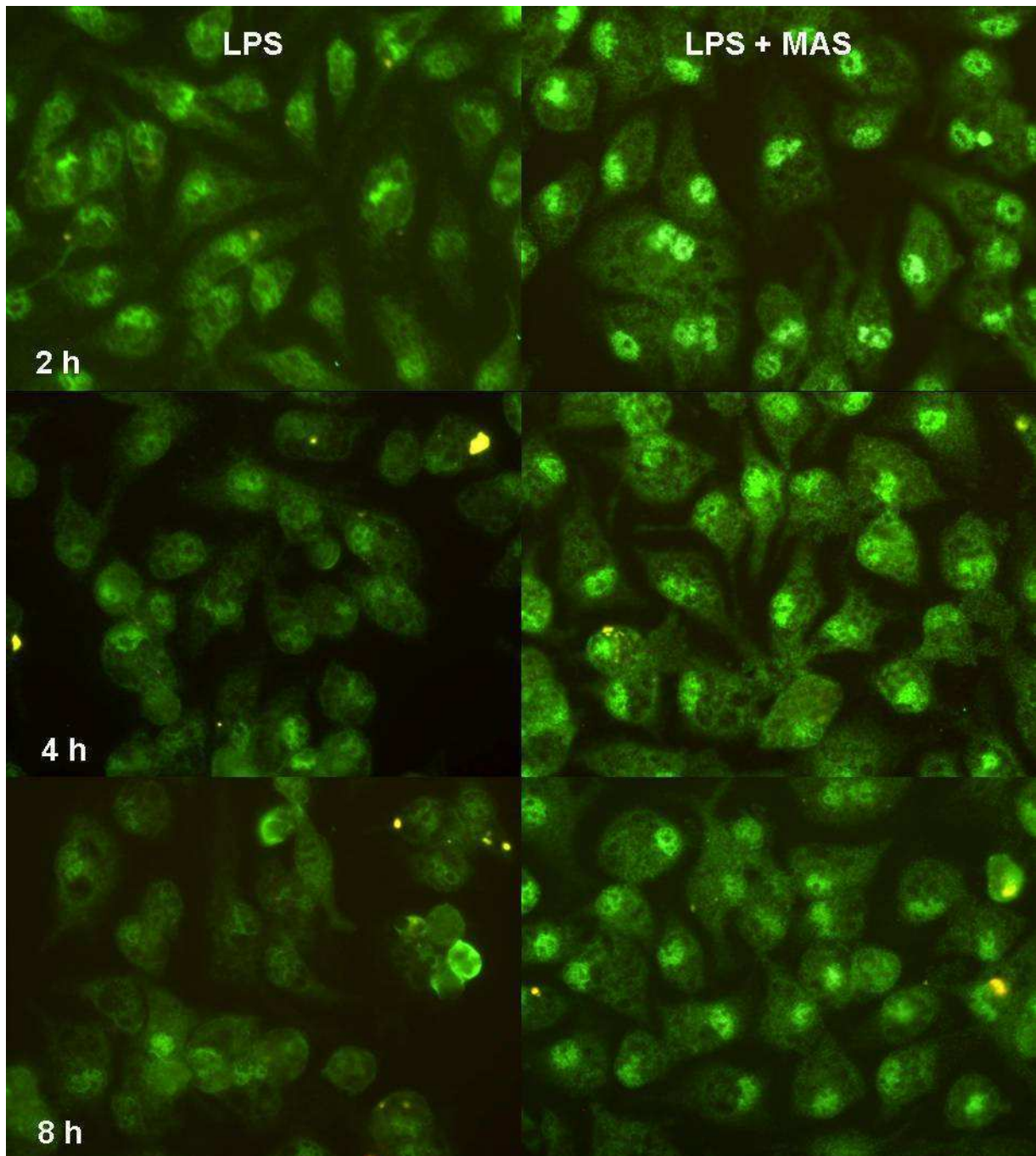
**Figura 74. Modelo de la activación del NF- $\kappa$ B inducida por LPS.** Esquema del modelo computarizado presentado por Covert y col., para la activación del NF- $\kappa$ B dependiente de TLR-4 inducida por LPS. Se presentan las dos vías de inducción, la dependiente de MyD88 y la independiente o Trif, las cuales en forma conjunta llevan al patrón no oscilatorio de activación del NF- $\kappa$ B presentado en el gráfico de la derecha.

Macrófagos peritoneales fueron cultivados sobre cubreobjetos en microplacas de 24 pocillos, luego de transcurridas 24 hs se trataron con LPS (10  $\mu$ g/ml), MAS (50  $\mu$ g/ml) o la combinación de ambos durante distintos períodos de tiempo. La figura 75 muestra los resultados de la fluorescencia indirecta realizada.





**Figura 75. Inducción de la translocación del NF- $\kappa$ B en macrófagos peritoneales inducidos con LPS y MAS.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con MAS (50  $\mu$ g/ml), LPS (10  $\mu$ g/ml) o la combinación de ambos durante 0 (CC: control de células sin tratar), 15, 30 y 60 minutos. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una inmunofluorescencia para detectar NF- $\kappa$ B. Los preparados se observaron al microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado.



**Figura 76. Inducción de la translocación del NF- $\kappa$ B en macrófagos peritoneales inducidos con LPS y MAS.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con MAS (50  $\mu$ g/ml), LPS (10  $\mu$ g/ml) o la combinación de ambos durante 2, 4 y 8 hs. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una inmunofluorescencia para detectar NF- $\kappa$ B. Los preparados se observaron al microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado.

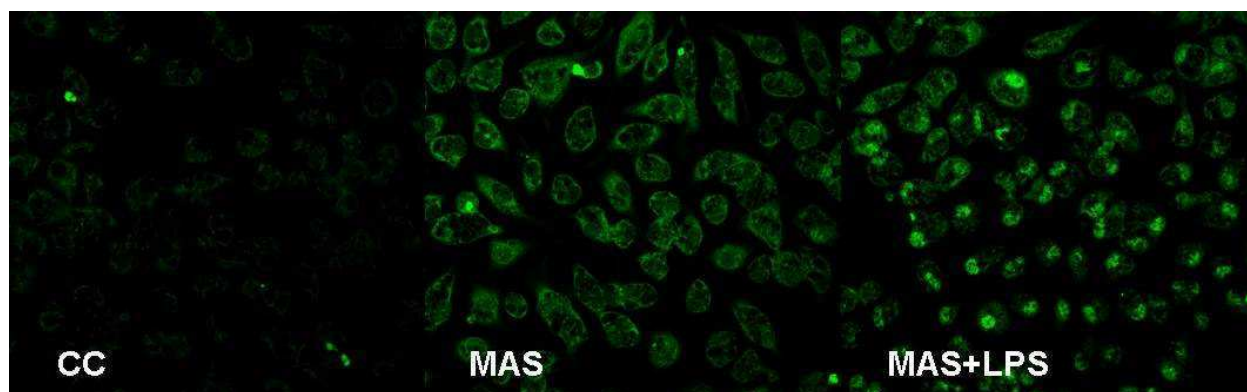
A tiempo cero minutos (CC) se puede observar que el núcleo de las células no presentó fluorescencia debido a que el factor NF- $\kappa$ B se encuentra en el citoplasma por no haber inducción. El LPS produjo la translocación del NF- $\kappa$ B a los 15 min. de agregado al cultivo, como se pudo observar por el aumento de fluorescencia en el

núcleo de las células. Luego de los 15 min. la fluorescencia se dispersó, debido a que el factor volvió al citoplasma celular aunque a los 60 min. volvió a translocar. Como era de esperar, debido al sinergismo obtenido en la producción de TNF- $\alpha$ , la combinación de MAS y LPS produjo una translocación del NF- $\kappa$ B que comenzó a los 15 min. y se mantuvo hasta los 60 min. En las fotografías de la Figura 75 se observa el aumento de intensidad en los núcleos con respecto al tratamiento con LPS solo, por lo tanto MAS estaría favoreciendo la translocación del factor al núcleo y además manteniéndolo en el tiempo. Resultados similares se obtuvieron al tratar las células con MAS durante 15 y 30 min antes de agregar el LPS (datos que no se muestran).

Debido a que a las 2 hs de realizar la inducción con MAS y LPS el NF- $\kappa$ B sigue en el núcleo celular, decidimos extender el tiempo de inducción. Por lo tanto, volvimos a realizar el mismo protocolo pero induciendo durante 2, 4 y 8 horas. Como muestra la figura 76, el NF- $\kappa$ B permaneció en el núcleo hasta las 8 h cuando se hizo la inducción conjunta de MAS con LPS.

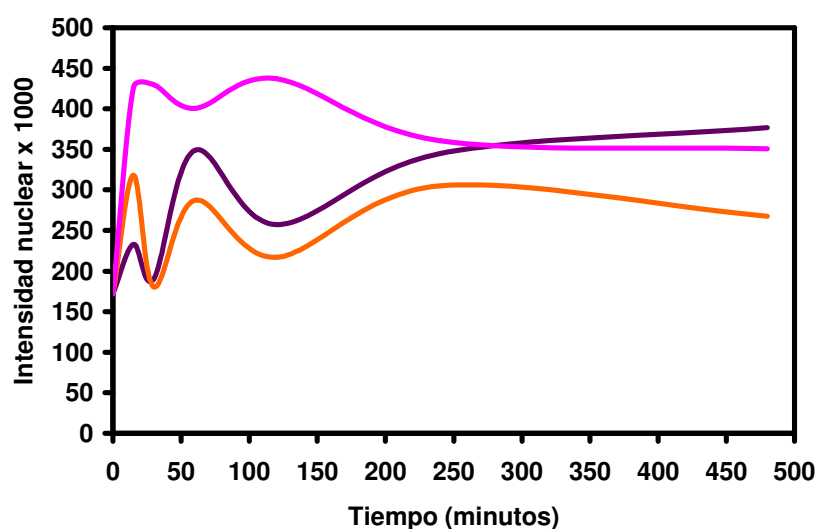
Estos resultados confirman el sinergismo observado en la producción de TNF- $\alpha$  en función del tiempo cuando se realiza la inducción conjunta con MAS + LPS (ver Figura 30). Por lo tanto, creemos que la producción de TNF- $\alpha$  observada se lleva a cabo debido a una hiperestimulación del NF- $\kappa$ B por la acción de meliacina que le obliga a permanecer en el núcleo hasta por lo menos 8 h.

La localización nuclear de la fluorescencia fue confirmada por microscopía confocal como se puede observar en la Figura 77.



**Figura 77. Localización nuclear del NF- $\kappa$ B en macrófagos peritoneales inducidos con LPS y MAS.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con medio de cultivo (CC: control de células), MAS (50  $\mu$ g/ml), o la combinación de MAS + LPS (10  $\mu$ g/ml) durante 2h. Cumplido dicho tiempo, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una inmunofluorescencia para detectar NF- $\kappa$ B. Los preparados fueron analizados por microscopía confocal. Aumento 600X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado.

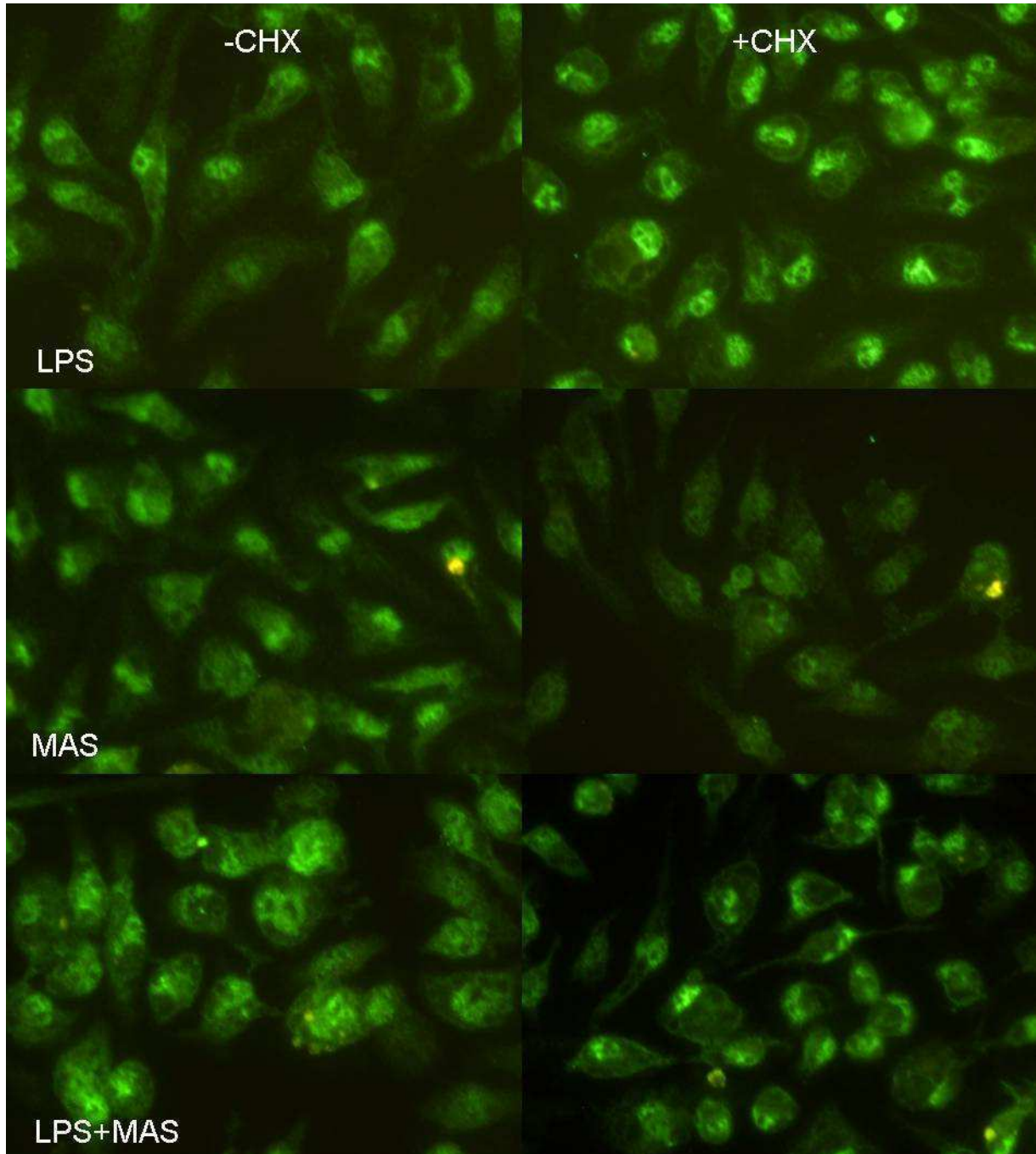
Al realizar la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia en el núcleo de los macrófagos (Figura 78) pudimos confirmar que los resultados obtenidos al inducir con LPS sólo coinciden con las predicciones del modelo de Baltimore (Covert y col., 2005). El LPS produce un aumento en la intensidad nuclear a los 15 minutos, lo cual se traduce como la translocación del NF- $\kappa$ B, luego el factor desaparece del núcleo para posteriormente volver a translocar y mantenerse en el núcleo de manera constante hasta las 8 h de inducción.



**Figura 78. Intensidad de la fluorescencia en el núcleo de macrófagos tratados con LPS y MAS.** Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de p65 observada en el núcleo de los macrófagos tratados con MAS 50 µg/ml (■), LPS 10 µg/ml (■) y LPS+MAS (■) durante distintos tiempos. Los valores son el promedio de la intensidad nuclear de cada célula individual ( $n=10$ ).

Como observamos previamente en la Figura 73, meliacina produjo la translocación del factor primeramente a los 15 min., pero de manera notablemente inferior a la producida por el LPS y luego alcanzó su máximo de intensidad nuclear a los 60 minutos. La inducción conjunta de MAS + LPS produjo un aumento en la intensidad nuclear superior a la suma de las intensidades por separado que se mantuvo en el tiempo hasta las 2 h, luego disminuyó levemente y posteriormente se mantuvo en el tiempo (Figura 78). Teniendo en cuenta el modelo de Baltimore, podríamos suponer que meliacina estaría involucrada en la vía de activación independiente de MyD88 ya que presenta un retardo en la activación del NF- $\kappa$ B con respecto al LPS. Covert y colaboradores demostraron que la vía independiente de MyD88 requiere de la síntesis proteica para activar al NF- $\kappa$ B (Covert y col., 2005). Teniendo en cuenta estos resultados, realizamos incubaciones con 50 µg/ml de MAS, 10 µg/ml de LPS y LPS + MAS durante 2 horas en presencia o ausencia de 10 µg/ml de CHX (cicloheximida). La figura 79 muestra los resultados obtenidos luego de

realizada la IFI para determinar la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Los resultados coinciden con los presentados por Covert y col., ya que el tratamiento con CHX produjo un aumento en la activación del NF- $\kappa$ B en las células inducidas con LPS.



**Figura 79 Inducción de la translocación del NF- $\kappa$ B en macrófagos peritoneales tratados con CHX.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con MAS (50  $\mu$ g/ml), LPS (10  $\mu$ g/ml) o la combinación de ambos en presencia o ausencia de CHX (10  $\mu$ g/ml) durante 2 h. Cumplido dicho tiempo, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una inmunofluorescencia para detectar NF- $\kappa$ B. Los preparados se observaron al microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado.

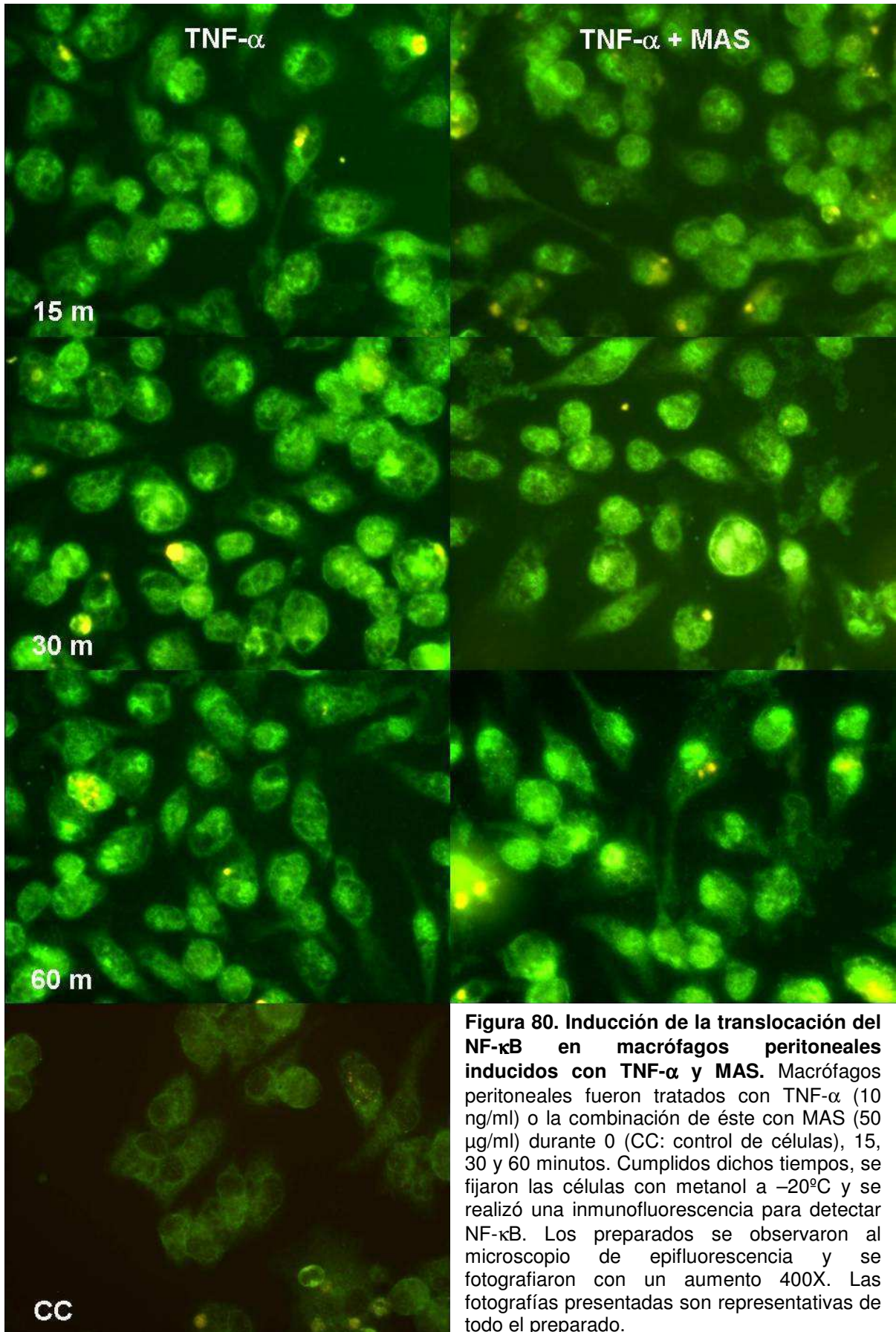
Por otro lado, en apoyo a nuestra teoría de que MAS podría actuar sobre la vía independiente de MyD88, encontramos que el tratamiento con CHX y MAS produjo una inhibición de la translocación del NF- $\kappa$ B con respecto a las células tratadas con MAS sola. Además, el tratamiento conjunto de los macrófagos con MAS, LPS y CHX presentó un patrón con menor intensidad de fluorescencia que el obtenido al tratar las células con LPS + MAS, similar al producido por el LPS + CHX.

Con estos resultados estaríamos en condiciones de postular que meliacina requeriría de la síntesis de proteínas para activar al factor NF- $\kappa$ B. Por otro lado, en el artículo previamente citado, se demostró que el camino dependiente de Trif activa la producción y secreción de TNF- $\alpha$ , y es, ese TNF- $\alpha$  el que luego se une a los receptores y activa el NF- $\kappa$ B. Por lo tanto, nos interesó evaluar la acción de meliacina en combinación con el TNF- $\alpha$  como inductor.

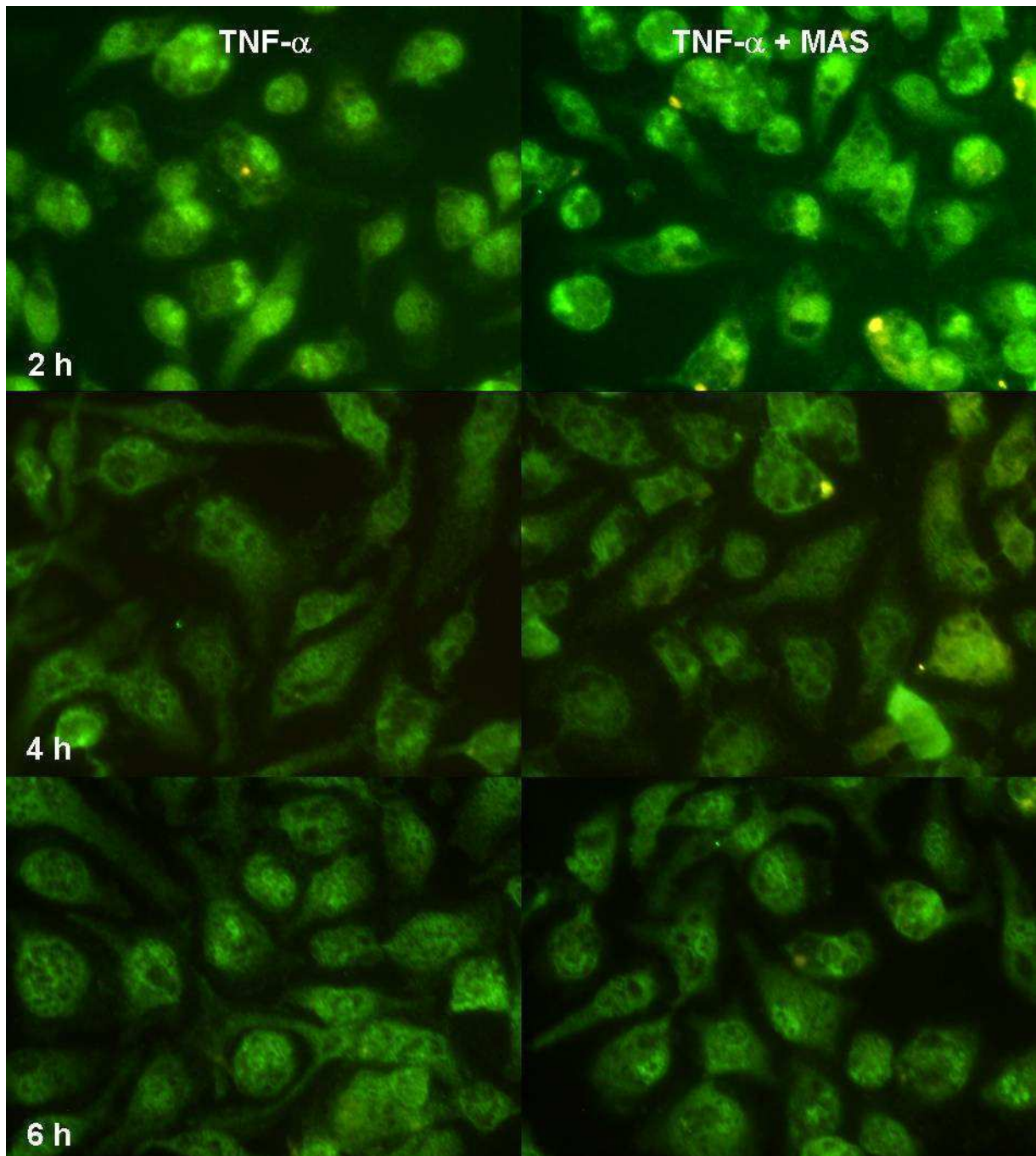
### **Acción de MAS sobre la translocación del factor NF- $\kappa$ B producida por el TNF- $\alpha$**

La actividad del factor NF- $\kappa$ B en células estimuladas con TNF- $\alpha$  muestra un comportamiento oscilatorio que se debe principalmente a la retroalimentación negativa producida por el inhibidor del NF- $\kappa$ B, la proteína I $\kappa$ B $\alpha$  (Hoffmann y col., 2002). Luego de que TNF- $\alpha$  se une a su receptor, los receptores se agregan y debido a esto se unen a proteínas adaptadoras que conducen a la activación del complejo de quinasas de I $\kappa$ B (IKK). La fosforilación de I $\kappa$ B mediada por IKK deviene en la ubiquitinización y degradación de I $\kappa$ B que permite la liberación del NF- $\kappa$ B para unirse a los genes blanco. Uno de esos genes es I $\kappa$ B $\alpha$  y su expresión vuelve a producir la inhibición del factor NF- $\kappa$ B (Brown y col., 1993). Cuando las células carecen del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$ , no hay retroalimentación negativa y el patrón de activación del NF- $\kappa$ B deja de ser oscilatorio para ser continuo (Hoffmann y col., 2002).

Teniendo en cuenta este modelo, realizamos estimulaciones sobre macrófagos peritoneales con 50  $\mu$ g/ml de MAS, 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  y MAS + TNF- $\alpha$  durante distintos tiempos. Para evaluar la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B realizamos la IFI descrita anteriormente. Las figuras 80 y 81 muestran los resultados obtenidos.



**Figura 80. Inducción de la translocación del NF-κB en macrófagos peritoneales inducidos con TNF-α y MAS.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con TNF-α (10 ng/ml) o la combinación de éste con MAS (50 µg/ml) durante 0 (CC: control de células), 15, 30 y 60 minutos. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a -20°C y se realizó una inmunofluorescencia para detectar NF-κB. Los preparados se observaron al microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado.



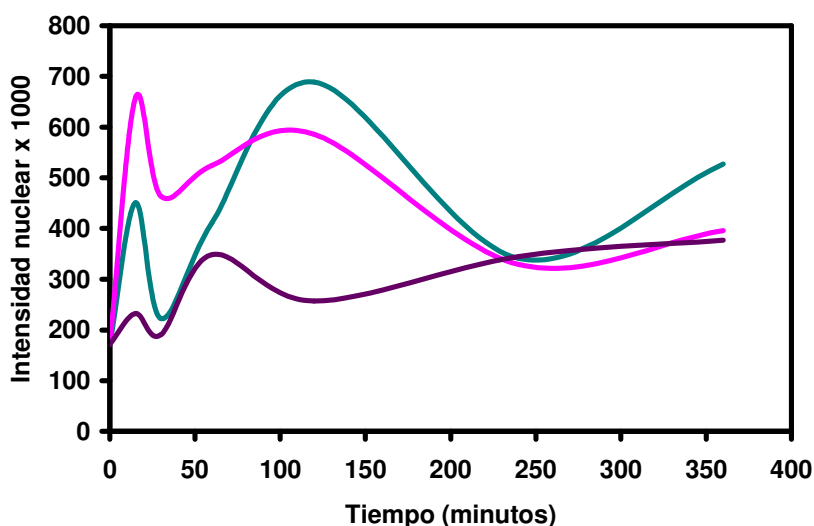
**Figura 81. Inducción de la translocación del NF- $\kappa$ B en macrófagos peritoneales inducidos con TNF- $\alpha$  y MAS.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) o la combinación de éste con MAS (50  $\mu$ g/ml) durante 2, 4 y 8 horas. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una inmunofluorescencia para detectar NF- $\kappa$ B. Los preparados se observaron al microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado.

Como se puede observar, a los 15 minutos el TNF- $\alpha$  produce la translocación al núcleo del NF- $\kappa$ B, esta translocación se mantiene en el tiempo hasta las 8 h pero con distinta intensidad, lo que estaría indicando que la cantidad de NF- $\kappa$ B presente en el núcleo



varía con el tiempo. Cuando se realizó la inducción conjunta con MAS y TNF- $\alpha$ , se observaron patrones similares a todos los tiempos analizados.

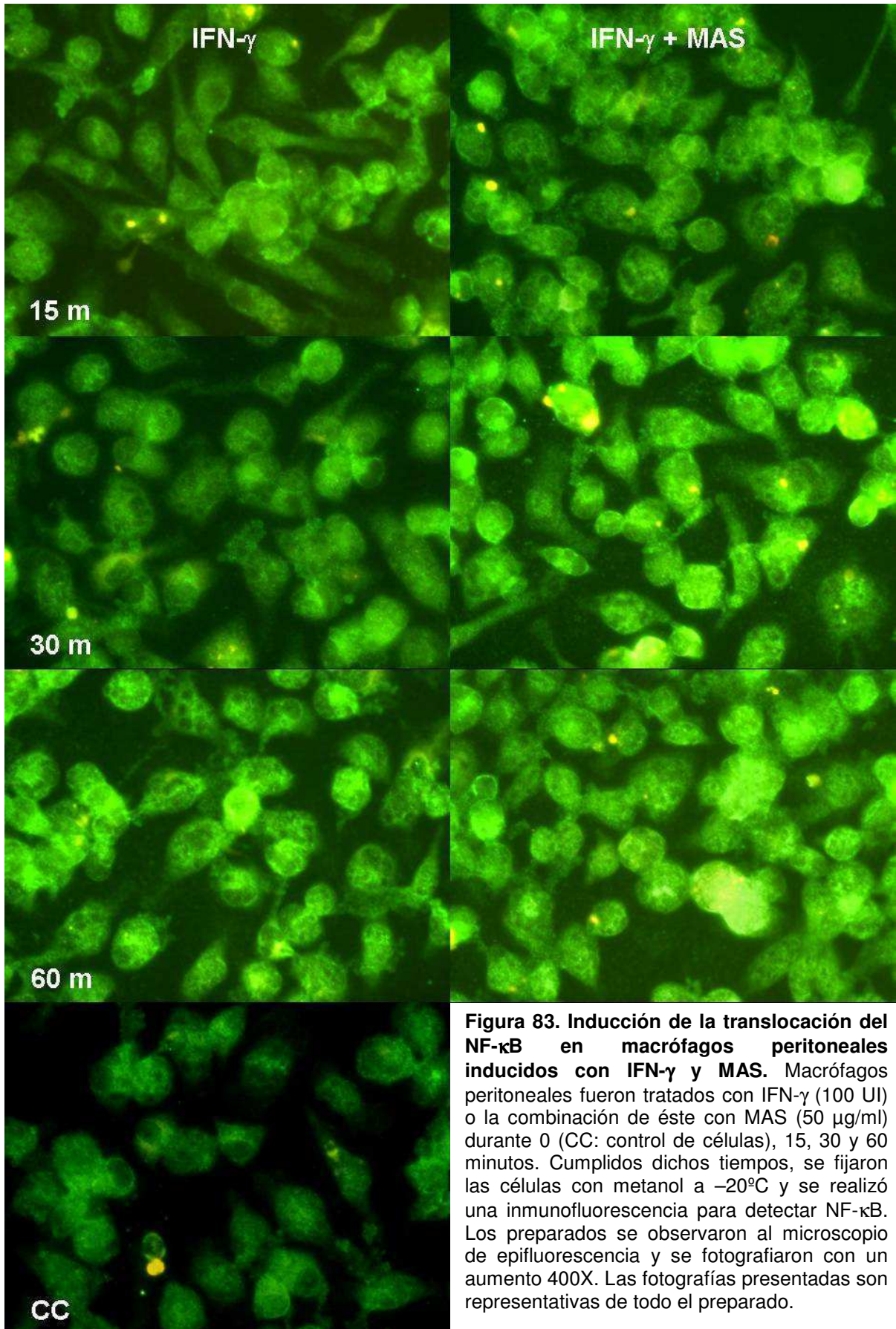
La figura 82 muestra la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia en el núcleo de cada célula del campo. Como se puede observar, el TNF- $\alpha$  presentó un patrón de activación de NF- $\kappa$ B oscilatorio, que concuerda con los resultados anteriormente publicados (Hoffmann y col., 2002) y que no es modificado al realizarse la inducción conjunta con MAS. El agregado de meliacina aumentó la intensidad nuclear con respecto al TNF- $\alpha$  solo pero mantuvo el patrón oscilatorio, por lo tanto pensamos que no estaría modificando la vía de inducción del TNF- $\alpha$ .



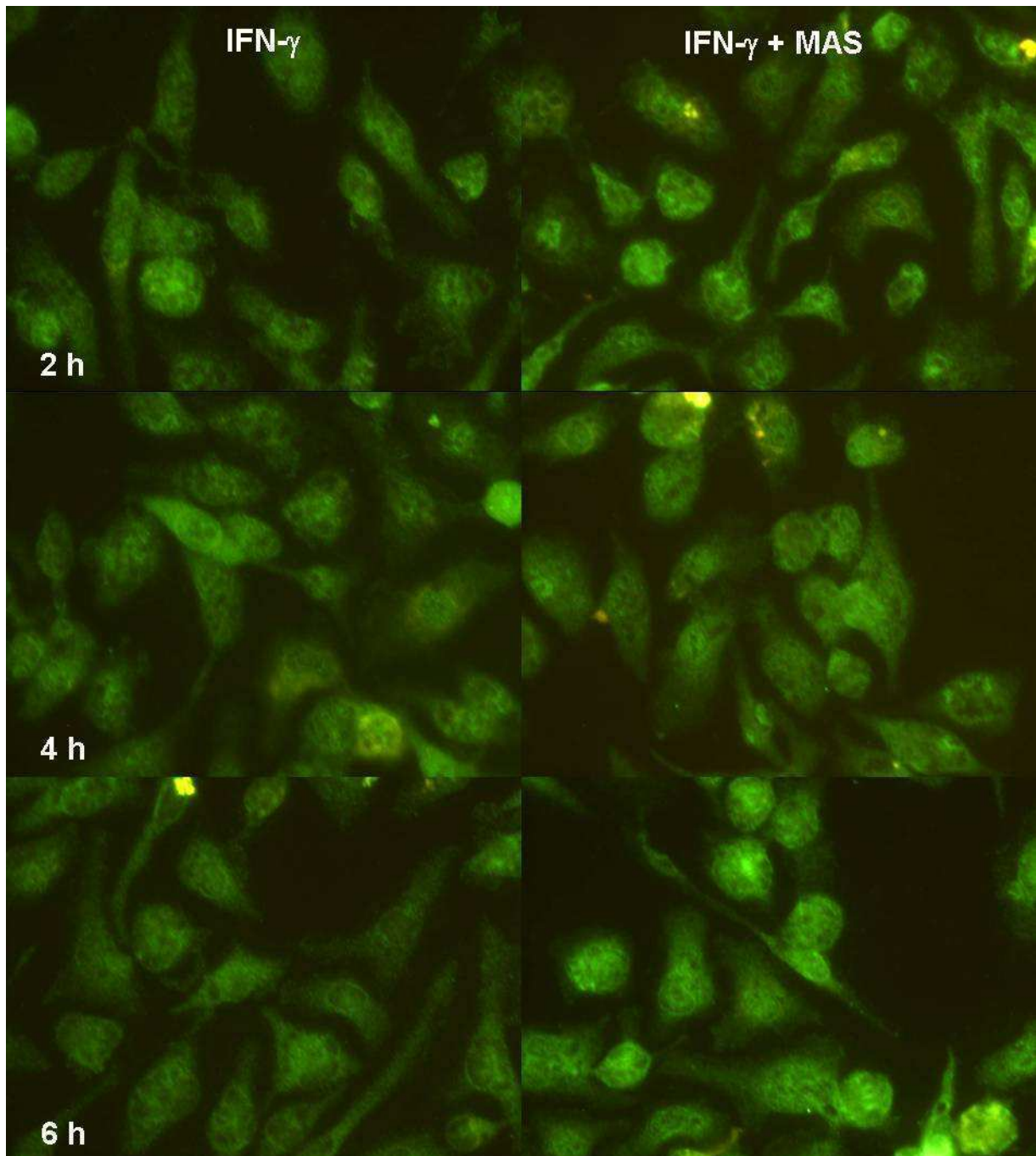
**Figura 82 Intensidad de la fluorescencia en el núcleo de macrófagos tratados con TNF- $\alpha$  y MAS.** Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de p65 observada en el núcleo de los macrófagos tratados con MAS 50  $\mu$ g/ml (■), TNF- $\alpha$  10 ng/ml (■) y TNF- $\alpha$ +MAS (■) durante distintos tiempos. Los valores son el promedio de la intensidad nuclear de cada célula individual ( $n=10$ ).

### **Acción de MAS sobre la translocación del NF- $\kappa$ B producida por el IFN- $\gamma$**

El IFN- $\gamma$  es una citoquina pleiotrópica responsable de la activación y diferenciación del macrófago con el subsiguiente desencadenamiento de la respuesta inflamatoria. El IFN- $\gamma$  no es considerado un buen inductor del NF- $\kappa$ B a pesar de que no está claro su rol en la inducción. Sin embargo, el TNF- $\alpha$  y el LPS sinergizan con IFN- $\gamma$  en la producción de TNF- $\alpha$  (Zhao y col., 2006). Por otro lado se ha demostrado que el IFN- $\gamma$  aumenta la expresión de iNOS mediante la activación del NF- $\kappa$ B, y que esta activación depende de la producción endógena de TNF- $\alpha$  quien activa al NF- $\kappa$ B (Viladell Sol y col., 2007).



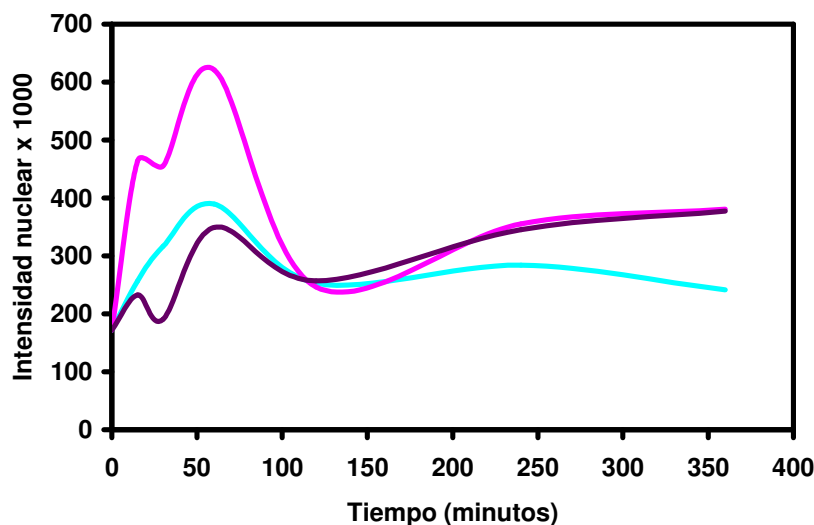
**Figura 83. Inducción de la translocación del NF-κB en macrófagos peritoneales inducidos con IFN-γ y MAS.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con IFN-γ (100 UI) o la combinación de éste con MAS (50 µg/ml) durante 0 (CC: control de células), 15, 30 y 60 minutos. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a -20°C y se realizó una inmunofluorescencia para detectar NF-κB. Los preparados se observaron al microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado.



**Figura 84. Inducción de la translocación del NF- $\kappa$ B en macrófagos peritoneales inducidos con IFN- $\gamma$  y MAS.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con IFN- $\gamma$  (100 UI) o la combinación de éste con MAS (50  $\mu$ g/ml) durante 2, 4 y 6 horas. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una inmunofluorescencia para detectar NF- $\kappa$ B. Los preparados se observaron al microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado.

Debido al efecto sinérgico sobre la producción de TNF- $\alpha$  ejercido por la inducción combinada de MAS + IFN- $\gamma$ , (Figura 60) decidimos evaluar el patrón de translocación

del NF- $\kappa$ B en macrófagos estimulados con IFN- $\gamma$  y el efecto del agregado de MAS. Para ello, tratamos los cultivos de macrófagos peritoneales con 50  $\mu$ g/ml de MAS, 100 UI de IFN- $\gamma$  murino o la combinación de ambos durante distintos tiempos y luego realizamos la IFI para determinar la presencia del NF- $\kappa$ B. Las figuras 83 y 84 muestran los resultados obtenidos a los distintos tiempos de inducción. Como se puede observar, la inducción de los macrófagos con IFN- $\gamma$  sólo presentó un patrón de fluorescencia similar al obtenido por la inducción con MAS (Figura 72), resultado que concuerda con la producción de TNF- $\alpha$  (Figura 59) donde tanto MAS como IFN- $\gamma$  presentaron una cinética equivalente. La inducción combinada de MAS e IFN- $\gamma$  no cambió el patrón de fluorescencia pero aumentó su intensidad. Si comparamos la intensidad de la fluorescencia en el núcleo de las células tratadas podemos observar que el IFN- $\gamma$  presentó un pico de translocación recién a los 60 minutos (Figura 85) estos datos coinciden con resultados previamente publicados en los cuales se demostró que el IFN- $\gamma$  induce la translocación del NF- $\kappa$ B mediante la producción endógena de TNF- $\alpha$ .



**Figura 85. Intensidad de la fluorescencia en el núcleo de macrófagos tratados con IFN- $\gamma$  y MAS.** Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de p65 observada en el núcleo de los macrófagos tratados con MAS 50  $\mu$ g/ml (■), IFN- $\gamma$  100 UI (■) y MAS+IFN- $\gamma$  (■) durante distintos tiempos. Los valores son el promedio de la intensidad nuclear de cada célula individual ( $n=10$ ).

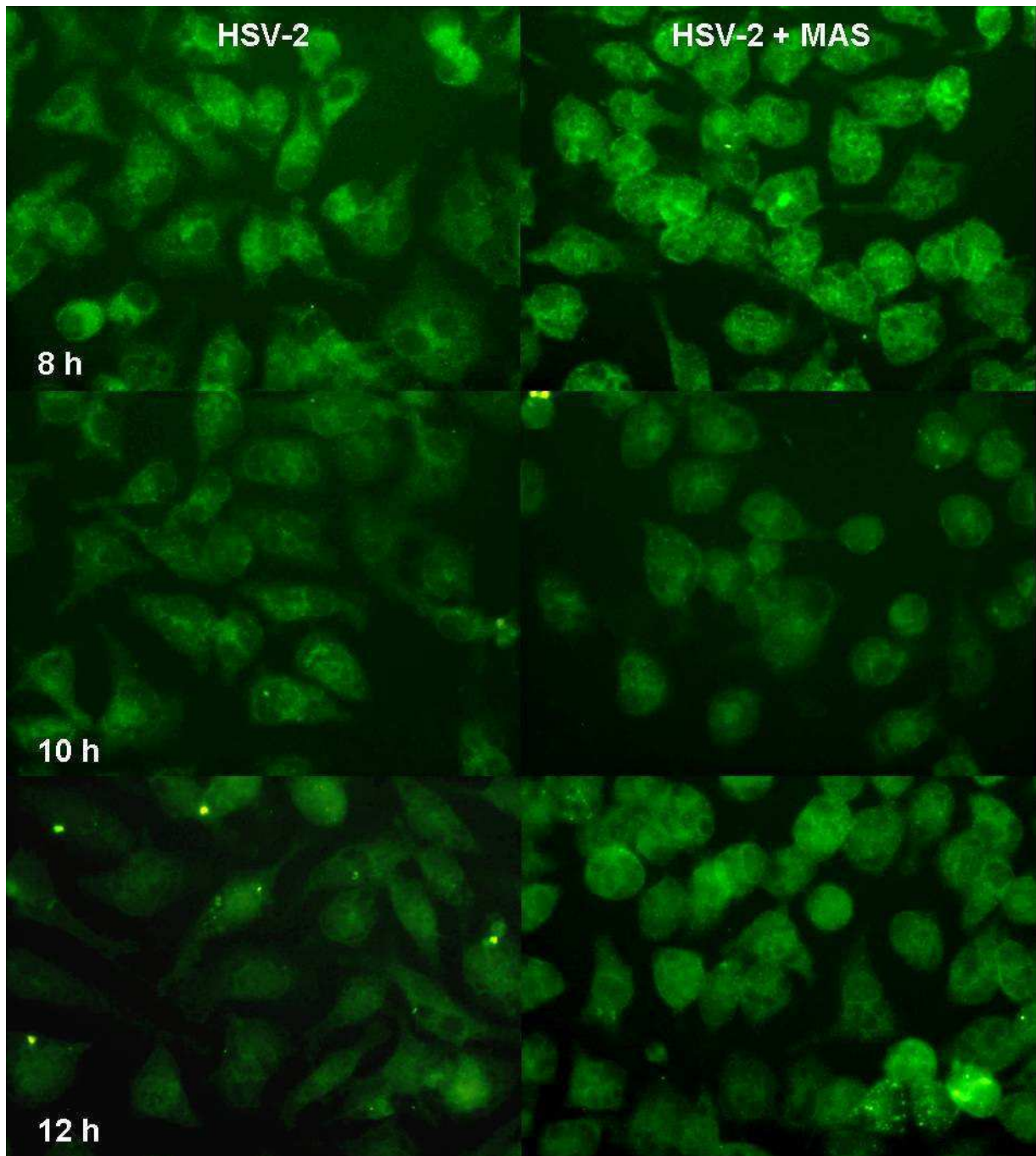
La combinación conjunta de IFN- $\gamma$  y MAS produjo un pico mayor de intensidad nuclear a los 60 minutos que si bien baja a las 2 horas, vuelve a subir y se mantiene hasta por lo menos 6 horas después de comenzada la inducción (Figura 85). Esta translocación al núcleo del NF- $\kappa$ B, que se mantiene en el tiempo, podría deberse y a la vez ser responsable en parte del aumento sinérgico observado en la medición del TNF- $\alpha$ .

(Figura 59), ya que como se ha mencionado el TNF- $\alpha$  regula la translocación al núcleo del factor de transcripción.

### **HSV-2 MS como inductor de la translocación**

Se ha descrito que HSV interacciona con los receptores celulares TLR de distintas maneras, las glicoproteínas interactúan con el TLR2 y los motivos CpG (citosina-guanina) presentes en el genoma viral estimulan al TLR9 que se encuentra en vesículas intracelulares (Herbst-Kralovetz y Pyles, 2006). Por lo tanto, el virus puede estimular los receptores de membrana por interacción directa con éstos o estimular los receptores intracelulares luego de producida la infección.

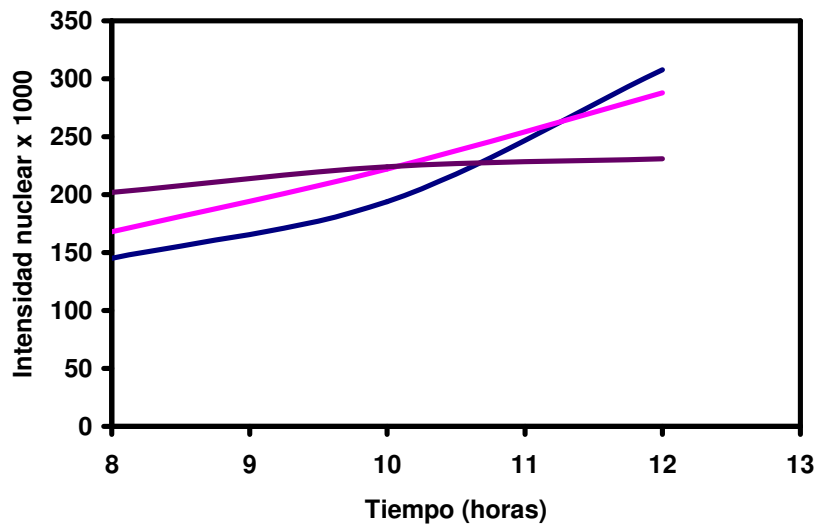
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al medir la producción de TNF- $\alpha$  en los macrófagos peritoneales, y debido a que se ha reportado previamente que el HSV-2 induce la expresión de TNF- $\alpha$  a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Paludan y col, 2001), decidimos evaluar la translocación en macrófagos inducidos con MAS y HSV-2. Para ello, tratamos los macrófagos peritoneales con MAS (50  $\mu$ g/ml), HSV-2 MS ( $10^6$  UFP) o la combinación de ambos y realizamos la inmunofluorescencia previamente descrita a distintos tiempos para poder determinar en que momento se producía la translocación por la inducción con HSV-2. Como se puede observar en la figura 86, en los macrófagos tratados con HSV-2 la translocación del NF- $\kappa$ B se observó sólo a las 12 h. El patrón de fluorescencia es muy diferente al obtenido con el LPS como inductor, esto puede deberse a que la inducción producida por el virus es mucho menor que la del LPS. Se puede observar que este patrón se parece más al patrón producido por la inducción con MAS que con el LPS, ya que la fluorescencia aumenta en toda la célula sin agruparse específicamente en el núcleo. En cuanto al tratamiento con MAS sola, no hubo diferencias con respecto a lo observado en la figura 72, a las 12 hs se obtiene el mismo patrón de fluorescencia que a las 8 h, donde hay un aumento de intensidad en toda la célula (datos que no se muestran).



**Figura 86. Inducción de la translocación del NF- $\kappa$ B en macrófagos peritoneales inducidos con HSV-2 MS y MAS.** Macrófagos peritoneales fueron tratados con MAS (50  $\mu$ g/ml), HSV-2 MS ( $10^6$  UFP) o la combinación de ambos durante 8, 10 y 12 hs. Cumplidos dichos tiempos, se fijaron las células con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se realizó una inmunofluorescencia para detectar NF- $\kappa$ B. Los preparados se observaron al microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron con un aumento 400X. Las fotografías presentadas son representativas de todo el preparado.

El análisis de la intensidad de la fluorescencia en los núcleos de las células tratadas pone en evidencia la baja inducción producida por el virus (Figura 87), esto podría

deberse al hecho de que el virus es agregado como inductor y aunque no podemos asegurarlo parece no estar infectando a las células.



**Figura 87. Intensidad de la fluorescencia en el núcleo de macrófagos tratados con HSV-2 MS y MAS.** Cuantificación de la intensidad de la fluorescencia de p65 observada en el núcleo de los macrófagos tratados con MAS 50 µg/ml (■), HSV-2 MS 10<sup>6</sup>UFP (■) y MAS+ HSV-2MS (■) durante distintos tiempos. Los valores son el promedio de la intensidad nuclear de cada célula individual (n=10).

Los resultados obtenidos al estimular los macrófagos con MAS y HSV-2 difieren significativamente de lo observado con el LPS. Se observó que, si bien a las 12 h hay translocación del NF-κB, ésta no es tan marcada y se observa que hay un aumento de la fluorescencia en toda la célula. El patrón de fluorescencia obtenido parece ser una combinación del aumento de intensidad producido con el tratamiento con MAS sola y la translocación producida con HSV-2.

### Conclusión

Meliacina *per se* induce la translocación al núcleo del NF-κB, aumenta su actividad en combinación con el LPS y la mantiene en el tiempo, y este efecto es dependiente de la síntesis de proteínas. Por el contrario, no ejerce diferencias en el patrón de activación del factor al combinarse con TNF-α o IFN-γ aunque en ambos casos aumenta la intensidad de la fluorescencia.

## **DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

Se estima que en los países desarrollados hay 500.000 casos nuevos por año de infección sintomática con HSV-2 (Xu y col., 2002). Debido a que no hay vacunas aprobadas para prevenir estas infecciones, que además de ser recurrentes duran toda la vida, el tratamiento estándar de la infección herpética genital consiste en la administración de drogas antivirales específicas contra la replicación de HSV-2, tales como el aciclovir, y otros análogos de guanosina (De Clercq, 2000). Una estrategia alternativa en la terapéutica antiviral es el refuerzo de la respuesta inmune del huésped mediante la administración de citoquinas exógenas o de sustancias diseñadas para proteger la mucosa genital contra la infección. Desde hace varios años se han probado drogas microbicidas, que pueden ser aplicadas tópicamente en la mucosa genital, y tienen la capacidad de matar los microorganismos produciendo su muerte directamente o aumentando la respuesta inmune local (Milligan y col., 2002; Catalone y col., 2004). Algunos de estos microbicidas actúan directamente uniéndose a los receptores celulares TLR llevando a la activación de factores de transcripción tales como el NF- $\kappa$ B y el factor regulador de Interferón. Estos compuestos son potentes estimuladores de la respuesta inmune innata que restringe la infección con HSV-2 (Herbst-Kralovetz y Pyles, 2006).

Los ensayos realizados *in vivo* en este trabajo de tesis, demostraron que la administración tópica de meliacina formulada en ungüento en ratones BALB/c hembras infectados con HSV-2 por la vía intravaginal produce un efecto terapéutico. La aplicación de MAS aumentó la supervivencia de los animales, redujo la severidad de la enfermedad, extendió el tiempo de vida de los ratones y disminuyó la liberación de virus en la vagina. La protección ejercida sobre animales infectados con la cepa G de HSV-2 fue evidente ya que duplicó el porcentaje de sobrevivientes del 40 al 80% (Figura 15), redujo la severidad de la enfermedad (Figura 16) y disminuyó el título de virus en los fluidos vaginales a niveles aproximados a los producidos por el aciclovir (Figura 17). La administración de meliacina a los animales infectados con la cepa MS de HSV-2 desencadenó también un efecto terapéutico pero en menor medida. Cabe señalar que las condiciones de la infección en los animales controles fueron muy severas. Todos los animales infectados y tratados sólo con vehículo murieron al día 8 p.i. y el tratamiento con MAS aumentó la supervivencia al 20% con una sobrevivencia de 12

días con respecto a los animales control (Figura 18). Si bien este efecto protector parece ser leve, debemos tener en cuenta que las condiciones fueron extremas ya que el 100% de los animales control murió 4 días después de aparecidas las primeras lesiones (Figura 19). Nos pareció muy interesante observar que el efecto de meliacina sobre la infección fue distinto del ejercido por el aciclovir, el cual redujo el título de virus en forma inmediata después de la infección lo que permitió la supervivencia de más del 80% de los animales (Figura 20). Sin embargo, a pesar de que meliacina no logró reducir el título de virus rápidamente, la aparición de las lesiones resultó estar retardada con respecto a los animales sin tratar (Figura 19). Así lo confirma la tinción de los cortes de tejido de las vaginas de los animales. Mientras que el tejido vaginal de un animal infectado y tratado con vehículo presentó inflamación y desorganización de la lámina superficial por la presencia de pústulas al día 4 p.i. (Figura 21B), los animales tratados con MAS o aciclovir no exhibieron lesiones aunque se puede visualizar la presencia del virus, mediante inmunofluorescencia específica (Figura 21 G y H). Los animales tratados con MAS presentaron menor cantidad de virus en el cerebro al momento de la muerte que los animales sin tratar. Los animales controles presentaron una media geométrica del título de virus de 3 logaritmos, los tratados con MAS 1,75 y con ACV 0,8 log. (Figura 22). Este resultado prueba que la administración de meliacina inhibe la replicación viral, sin embargo, una vez que el virus arriba al cerebro la encefalitis resulta inevitable y es por eso que si se considera como índice de protección sólo la supervivencia de los animales estaremos cometiendo un error de interpretación en cuanto a la potencialidad de meliacina como antiviral.

Para evaluar la posibilidad de que meliacina pudiera ejercer parte de su efecto terapéutico modulando la respuesta inmune, determinamos la presencia de citoquinas en los fluidos vaginales de los ratones infectados. Encontramos un aumento significativo de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en los lavados vaginales de los ratones infectados y tratados con MAS que no se observó ni en los animales control ni en los tratados con aciclovir (Figuras 23 y 24).

Hay un consenso general sobre el rol fundamental que desempeña la respuesta inmune innata en la protección de los ratones infectados con HSV-2. Los macrófagos son unos de los actores más importantes en esta respuesta, debido a que exhiben distintas acciones antiherpéticas por medio de la producción de citoquinas. La

liberación de citoquinas se lleva a cabo en dos etapas, primero, se produce el TNF- $\alpha$  y luego los interferones de tipo I que tienen un efecto antiviral directo contra el virus. Luego, junto con otras citoquinas se produce el IFN- $\gamma$  (Ellermann-Eriksen, 2005). Debido a que estudios previamente publicados mostraron que el TNF- $\alpha$  aumenta el efecto antiviral del IFN- $\gamma$  contra HSV-2 (Adams y col, 2004) pensamos que tal vez este aumento de las citoquinas al día 5 p.i. pudiera estar relacionado con la disminución de la severidad de las lesiones y la sobrevida de los animales.

Estudios recientes mostraron que la co-activación de los receptores de IFN $\alpha/\beta$  e IFN- $\gamma$  vuelven a las células altamente resistentes a la replicación de HSV-1 (Sainz y Halford, 2002) y que éste parece ser un fenómeno general debido a que el efecto antiviral sinérgico producido por la combinación de IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  fue demostrado también para otros miembros de la familia *Herpesviridae* (Sainz y Halford, 2002; Pierce y col., 2005; Halford y col., 2005) y para una variedad de RNA virus como el coronavirus responsable del SARS (síndrome respiratorio agudo severo) (Sainz y col., 2004), Lassa virus (Asper y col., 2004) y HCV (Sainz y col., 2005). Considerando la importancia de este efecto sinérgico en cuanto a la inhibición del virus HSV-1, investigamos si la combinación de interferones inhibía de manera sinérgica la replicación de HSV-2 en células Vero, dato sobre el que no había publicaciones, y si la presencia de meliacina podía estar afectando el estado antiviral producido por IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  o su combinación.

Cuando una célula es infectada por un virus, el ARN viral activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B con la concomitante expresión de IFN. El IFN es excretado de la célula y actúa sobre las células vecinas activando la expresión de genes antivirales, de esta manera logra producir el estado antiviral. Debido a que meliacina también produce un estado refractario a la infección en las células tratadas, nos preguntamos si su presencia podría estar inhibiendo el estado antiviral inducido por el tratamiento con los interferones. Determinamos que MAS sola tiene una actividad antiherpética alta cuando es agregada luego de la infección, aunque el pretratamiento de 2 o 16 h no influye demasiado sobre la replicación viral (Figura 34). Sorprendentemente, el tratamiento de las células Vero infectadas durante el tiempo completo de inducción utilizado por los interferones lleva a una inhibición del título de HSV-2 de 4 logaritmos, 10000 veces con respecto al control sin tratar. Al realizar distintos tratamientos en forma separada o conjunta con MAS o

CDM e IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ , se observó que no hay interferencias entre ellos y que además el efecto antiviral está aumentado por el agregado de MAS o CDM (Figura 36). Por lo tanto, podemos suponer que las alteraciones en los procesos celulares producidas por la exposición a CDM (Barquero y col., 2004) no interfieren con el establecimiento del estado refractario a la infección con HSV-2 producido por el tratamiento con IFN. La alta actividad antiviral ejercida por CDM *per se* complica la interpretación de los resultados obtenidos en presencia de los interferones (Figuras 41, 42, 43 y 44), los cuales en comparación reducen la cantidad de virus, inclusive en combinación, menos de 100 veces. Para eludir este inconveniente, realizamos un experimento usando bajas concentraciones de CDM que fueron agregadas luego de la infección viral hasta la cosecha del virus, en combinación con 100 UI/ml de IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ . Se pudo observar un claro efecto aditivo tanto de CDM con IFN- $\alpha$  como con IFN- $\gamma$  a todas las concentraciones testeadas (Figura 45). Los resultados indican que la presencia de CDM no altera la actividad biológica de IFN- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  o la combinación de ambos, sino que la aumenta. Se puede postular que esta acción se manifiesta también en la infección genital de los ratones si tenemos en cuenta que la administración de meliacina produce un aumento del IFN- $\gamma$  en los fluidos vaginales. No sabemos sobre que tipo de células induce MAS la producción de IFN- $\gamma$  en el modelo *in vivo*, pero creemos que el efecto del antiviral podría depender del tipo celular sobre el que actúa. Si fuera así meliacina podría aumentar la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en las células del sistema inmune y por otro lado ejercer su actividad antiviral en forma conjunta con estas citoquinas sobre otros tipos celulares como ser las células epiteliales similares a las células Vero.

Esta hipótesis fue sustentada por los resultados obtenidos al evaluar la acción de meliacina sobre los macrófagos que son uno de los principales efectores de la respuesta inmune (Ellermann-Eriksen, 2005). Los resultados muestran que MAS *per se* aumenta en bajos niveles la producción de: TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , NO e IL-10 en los macrófagos peritoneales tratados. Sorprendentemente, la combinación de meliacina con LPS o IFN- $\gamma$  provocó un efecto sinérgico en la producción de TNF- $\alpha$ , incrementando la expresión de la citoquina y manteniéndola en el tiempo (Figuras 50 y 59). Este sinergismo no se observó al inducir en forma combinada con HSV-2, a pesar

de que la producción de TNF- $\alpha$  aumentó en relación con las inducciones por separado (Figura 57). Tampoco hubo sinergismo en la producción de las otras citoquinas.

Debido a que el factor de transcripción NF- $\kappa$ B juega un rol muy importante en la producción de citoquinas en los macrófagos, evaluamos la posibilidad de un efecto de MAS sobre su translocación. Como muestran las figuras 72 y 73 meliacina produce *per se* la translocación del factor NF- $\kappa$ B, lo que explicaría la producción de TNF- $\alpha$  y las demás citoquinas. Cuando inducimos los macrófagos con LPS pudimos comprobar que la activación del NF- $\kappa$ B sigue el modelo presentado por Covert y col., donde la translocación inicial es a los 15 minutos. Pero al realizar la inducción combinada de MAS con LPS la translocación se mantuvo en el núcleo por lo menos durante 8 h (Figura 78), en coincidencia con los resultados obtenidos al medir la producción de TNF- $\alpha$  en función del tiempo (Figura 50).

Se ha postulado que la activación del NF- $\kappa$ B por medio de la inducción con el LPS seguiría dos vías distintas, la vía dependiente y la independiente de MyD88. El camino dependiente de MyD88 lleva a la activación rápida del NF- $\kappa$ B, en cambio la otra vía, dependiente de TRIF, necesita de la síntesis previa de proteínas por lo tanto presenta un retardo de aproximadamente 30 minutos en la translocación del factor (Covert y col., 2005). Debido a que la combinación de MAS con LPS produce la activación casi ininterrumpida del factor NF- $\kappa$ B, pensamos que MAS podría estar actuando sobre una de las vías descritas previamente. Si bien MAS sola produce la translocación del factor NF- $\kappa$ B a los 15 minutos, esta translocación es casi imperceptible, en cambio tiene su pico máximo a los 60 minutos. Debido a este retardo, es probable que MAS no actúe sobre la vía dependiente de MyD88 sino que podría actuar sobre la vía independiente, que requiere de la síntesis previa de proteínas para poder producir la translocación del factor. Para profundizar esta hipótesis decidimos hacer inducciones con MAS, LPS, LPS+MAS en presencia o ausencia de cicloheximida. Los resultados demostraron que la inhibición de la síntesis de proteínas aumentó la translocación al núcleo del NF- $\kappa$ B al inducir con LPS solo, tal como describieron Covert y col., y podría deberse a que no hay síntesis de las proteínas inhibitoras. En cambio, hubo una disminución muy marcada en la translocación producida por MAS en presencia de CHX, lo que indicaría que MAS necesita de la síntesis previa de proteínas para activar al NF- $\kappa$ B y por lo tanto podría estar

involucrada en la vía independiente de MyD88. Por otro lado, la activación del NF- $\kappa$ B por medio de la vía dependiente de TRIF parecería resultar como una respuesta secundaria a la producción previa de TNF- $\alpha$  por medio de la activación del factor de transcripción IRF3 (factor de regulación del interferón) (Covert y col., 2005). De forma similar meliacina podría estar produciendo TNF- $\alpha$  y ese TNF- $\alpha$  llevar a la activación del NF- $\kappa$ B, si así fuera, al inducir en forma conjunta con TNF- $\alpha$  esperaríamos una respuesta mayor pero sin variaciones en el patrón. Con estos datos evaluamos la acción de MAS sobre macrófagos estimulados con TNF- $\alpha$  y encontramos que MAS aumenta la intensidad nuclear de la fluorescencia pero no varía el patrón de activación del NF- $\kappa$ B producido por el TNF- $\alpha$  solo. Este resultado apoyaría nuestra teoría.

Recientemente se ha publicado que el IFN- $\gamma$  aumenta la expresión de la enzima iNOS mediante la activación del factor NF- $\kappa$ B, siendo el TNF- $\alpha$  endógeno el responsable de la translocación del factor (Vila-del Sol y col., 2007). Por otro lado, se ha descrito que el sinergismo observado en la expresión de genes de la respuesta inflamatoria por la inducción con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  se debe a que el IRF-1 inducido por el IFN- $\gamma$  interactúa físicamente con el NF- $\kappa$ B aumentando la transcripción de los promotores activados (Wesemann y Benveniste, 2003; Paludan, 2000). En nuestros estudios, al estimular los macrófagos con la combinación de MAS + IFN- $\gamma$  obtuvimos una producción sinérgica de TNF- $\alpha$ , resultado que nos llevó a comparar la inducción del NF- $\kappa$ B producida por el IFN- $\gamma$  y la causada por el agregado de meliacina. MAS e IFN- $\gamma$  por separado presentaron patrones de activación del NF- $\kappa$ B similares (Figura 85), que coinciden con la cinética de producción de TNF- $\alpha$  (Figura 59), y al agregarse en forma combinada no produjeron cambios en el patrón sino un aumento de la intensidad de la fluorescencia. Si consideramos que la activación del NF- $\kappa$ B en macrófagos inducidos con IFN- $\gamma$  se lleva a cabo a través de la producción endógena de TNF- $\alpha$  y que meliacina produce el mismo patrón de activación del NF- $\kappa$ B que el IFN- $\gamma$ , podríamos deducir que MAS ejercería su efecto a través del TNF- $\alpha$ .

Al evaluar el efecto de meliacina sobre la inducción del factor NF- $\kappa$ B producida por el virus HSV-2 encontramos que el patrón obtenido es igual a la suma de los patrones por separado. Estos resultados junto con los datos obtenidos en la determinación de las citoquinas, nos lleva a pensar que el efecto aditivo que se observa

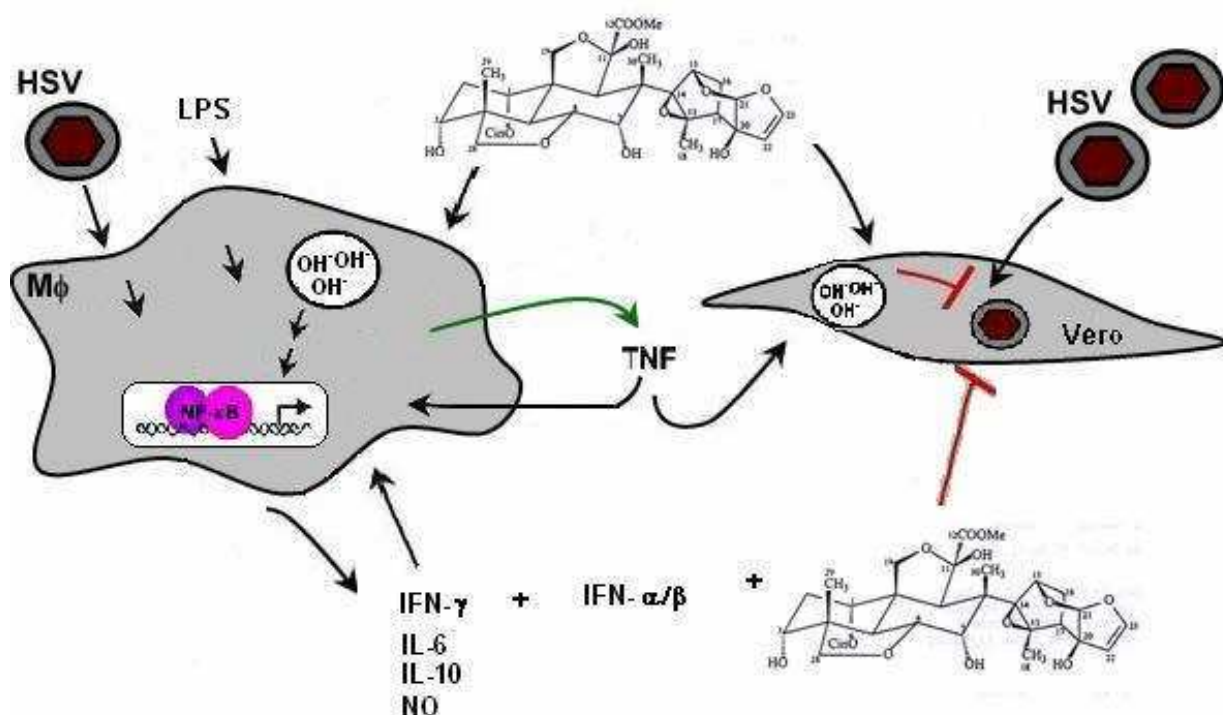
en la producción de las citoquinas se debe a que MAS y HSV-2 pueden producir la translocación del NF- $\kappa$ B pero utilizando distintas vías. Este hecho llevaría al aumento total de las citoquinas pero no porque MAS ejerza un efecto sobre la activación producida por HSV-2, sino porque se suman los efectos por separado. Recientemente se ha reportado que HSV-1 produce TNF- $\alpha$  en macrófagos peritoneales por medio de la interacción con distintos receptores TLR pero siempre utilizando la vía dependiente de MyD88, ya que macrófagos de ratones deficientes en esta vía no pueden producir esta citoquina (Mansur y col., 2005). También se ha reportado que HSV-2 actuaría de manera similar en la mucosa genital (Duerst y Morrison, 2003). Considerando estos datos y los resultados presentados antes, podríamos pensar que meliacina no aumenta la translocación del NF- $\kappa$ B inducida por HSV-2 debido a que no estaría actuando sobre la vía dependiente de MyD88, y por lo tanto no podría producir un efecto sinérgico.

El mantenimiento de la homeostasis es muy importante para el buen funcionamiento celular, es por eso que las células poseen distintos mecanismos de regulación como bombas protónicas que mantienen el pH<sub>i</sub> celular, canales iónicos, etc. Trabajos publicados previamente han revelado que la inhibición de la ATPasa de Ca<sup>+</sup> del retículo endoplásmico, o de la V-ATPasa (ATPasa de H<sup>+</sup>) aumentan la expresión de TNF- $\alpha$  por medio de la activación del factor NF- $\kappa$ B (Kmoníčková y col., 2005, Conboy y col., 1999). Como hemos comentado anteriormente, el tratamiento con meliacina produce la basificación de los endosomas celulares, efecto que se cree está involucrado en la acción antiviral. Debido a los resultados obtenidos en los macrófagos, parecería ser que la acción moduladora de MAS se debe a la producción temprana de TNF- $\alpha$ , por lo tanto pensamos que este aumento de TNF- $\alpha$  dependiente de la activación del NF- $\kappa$ B tal vez sea consecuencia de la basificación de los endosomas, que también ocurre en los macrófagos.

Desde que algunas cepas de HSV-2 han desarrollado resistencia a las drogas (Naesens & De Clercq, 2001) se ha visto una tendencia a la inducción de inmunidad protectora contra HSV-2 mediante la estimulación de la respuesta innata de la mucosa. Un ejemplo de esto es el uso de CpG oligodeoxinuclótidos (Harandi y col., 2003; McCluskie y col., 2006). Debido al aumento de la resistencia a las drogas antimicrobianas en uso, la utilización de compuestos derivados de plantas ofrece una alternativa válida que está ganando importancia. Tal vez, el incremento en los niveles

de citoquinas en los animales tratados con meliicina nos indique que un refuerzo de la respuesta inmune innata contribuye a inhibir la replicación del virus.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permitieron postular el modelo presentado en la Figura 88. En el modelo se muestra la acción dual de meliicina sobre dos tipos celulares distintos, macrófagos y células epiteliales. MAS, representada por la fórmula de su principio activo CDM, basifica los endosomas del macrófago y activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B. La translocación del factor al núcleo permite la expresión de TNF- $\alpha$ , que vuelve a activar al NF- $\kappa$ B con la concomitante expresión de citoquinas. El LPS induce la translocación del NF- $\kappa$ B por dos vía distintas, una de ellas es sinergizada por la acción de MAS con el consecuente aumento en la síntesis de TNF- $\alpha$ . El IFN- $\gamma$  activa al NF- $\kappa$ B a través de la síntesis de TNF- $\alpha$ , en combinación con MAS sinergizan la producción de TNF- $\alpha$ . El HSV-2 activa al NF- $\kappa$ B pero utilizando una vía distinta a la de MAS, por lo tanto aumenta la producción de citoquinas pero en menor medida. Por otro lado, MAS basifica los endosomas de la célula epitelial inhibiendo la replicación de HSV-2. Entre las citoquinas producidas por el macrófago se encuentra el IFN- $\gamma$  que combinado con MAS y con el IFN- $\alpha/\beta$ , liberado por la inducción de HSV-2, aumenta la inhibición de la replicación de HSV-2 en la célula epitelial.



**Figura 88.** Modelo postulado con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.



## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo de tesis ponen en evidencia el efecto dual de meliacina, un compuesto que además de presentar actividad antiviral *in vitro* como *in vivo*, modula la producción de citoquinas en macrófagos peritoneales murinos activando al factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

Debido a la pujante búsqueda de antivirales de origen natural y teniendo en cuenta las propiedades inmunomoduladoras de meliacina, este compuesto derivado de las hojas de *M. azedarach* L., es un antiviral de uso potencial en la infección genital.

Los resultados de este trabajo de tesis fueron publicados en forma parcial en los siguientes artículos:

“Effect of meliacine, a plant derived antiviral, on tumor necrosis factor alpha”. (2003) E. Petrerá and C. E. Coto. **Fitoterapia 74: 77-83**

“The synergistic effect of IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  against HSV-2 replication in Vero cells is not interfered by the plant antiviral 1-cinnamoyl-3, 11-dihydroxymeliacarpin”. Erina Petrerá and Celia E. Coto. (2006) **Virology Journal 3: 45. doi: 10.1186/1743-422X-3-45**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdelgaleil SA, Iwagawa T, Doe M, Nakatani M. Antifungal limonoids from the fruits of *Khaya senegalensis*. *Fitoterapia*. 2004 75(6):566-72.
- Abdel-Haq N, Chearskul P, Al-Tatari H, Asmar B. New antiviral agents. *Indian J Pediatr*. 2006 73(4):313-21.
- Adams O, Besken K, Oberdorfer C, MacKenzie CR, Russing D, Daubener W. Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect* 2004 (9): 806-12.
- Alché LE, Barquero AA, Sanjuán N, Coto CE. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains Herpes simplex virus type 1 propagation. *Phytotherapy Res*. 2002 16(4): 348-52.
- Alché LE, Ferek GA, Meo M, Coto CE, Meier MS. An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L. *Z. Naturforsch.58c* (2003) 215-219.
- Alché LE, Berra A, Beloso MJ, Coto CE. Treatment with meliacine, a plant derived antiviral, prevents the development of herpetic stromal keratitis in mice. *J. Med. Virol*. 61 (2000) 474-480.
- Arabiah FA, Sacks SL New antiherpesvirus agents. Their targets and therapeutic potential *Drugs*. 1996 Jul;52(1):17-32
- Andrei G, Couto AS, de Lederkremer RM, Coto CE. Purification and partial characterization of an antiviral active peptide from *Melia azedarach* L., *Antivir. Chem. Chemother*. 5 (1994) 105-110.
- Andrei GM, Coto CE, de Torres RA. Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extractos crudos y semipurificados de hojas verdes de *Melia azedarach* L. *Rev. Arg. Microbiol*. 17 (1985) 187-194.
- Andrei GM, Coulombié FC, Courregès MC, de Torres RA, Coto CE. Meliacine, an antiviral compound from *Melia azedarach* L. inhibits Interferon production. *J. Interferon Res*. 10 (1990) 469-475.
- Andrei GM, E.B. Damonte, R.A de Torres, C.E. Coto, Induction of a refractory state to viral infection in mammalian cells by a plant inhibitor isolated from leaves of *Melia azedarach* L., *Antivir. Res*. 9 (1988) 221-231.
- Andrighetti-Fröhner CR, Sincero TC, da Silva AC, Savi LA, Gaido CM, Bettiga JM, Mancini M, de Almeida MT, Barbosa RA, Farias MR, Barardi CR, Simões CM. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia*. 2005 76(3-4):374-8.
- Ashkar AA, Rosenthal KL. Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *J Virol*. 2003;77:10168–10171.
- Asper M, Sternsdorf T, Hass M, Drosten C, Rhode A, Schmitz H, and Günther S: Inhibition of different Lassa virus strains by alpha and gamma interferons and comparison with a less pathogenic arenavirus. *J Virol* 2004, 78:3162-3169.
- Balish MJ, Abrams ME, Pumfery AM and Brandt CR: Enhanced inhibition of herpes simplex virus type 1 growth in human corneal fibroblasts by combinations of interferon-alpha and -gamma. *J Infect Dis* 1992, 166:1401-3.

Bancroft GJ, Schreiber RD, Bosma GC, Bosma MJ, Unanue ER. A T cell-independent mechanism of macrophage activation by interferon-gamma. *J Immunol.* 1987;139:1104–1107.

Barquero AA, Alché LE and Coto CE: Block of vesicular stomatitis virus endocytic and exocytic pathways by 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin, a tetranortriterpenoid of natural origin. *J Gen Virol* 2004, 85:483-93.

Barquero AA, Alché LE, Coto CE. Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase-deficient mutant of herpes simplex virus type 1, *Int. J. Antimicrob. Agents* 9 (1997b) 49-55.

Barquero AA, Michelini FM, Alché LE. 1-Cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin is a natural bioactive compound with antiviral and nuclear factor- $\kappa$ B modulating properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006 344 (3): 955-62.

Barquero AA, Villamil SM. Estudio de la acción combinada de meliacina y foscarnet contra distintas cepas de virus Herpes simplex tipo 1 empleando un modelo tridimensional. *Rev. Argen. Microb.* 28 (1997a) 32-37.

Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways. *Science.* 2003 5625:1524-5.

Beilby JO, Cameron CH, Catterall RD, Davidson D. Herpesvirus hominis infection of the cervix associated with gonorrhoea. *Lancet.* 1968;1(7551):1065-6

Benencia F, Courregès MC, Coto CE, Coulombié FC. Immunomodulatory activities of *Melia azedarach* L. leaf extracts on human monocytes. *J. Herbs Spices and Med. Plants* 5 (1997) 7-13.

Benencia F, Courregès MC, Coulombié FC, Massouh E. Effect of *Melia azedarach* L. fresh leaf aqueous extract on mice haematological parameters. *Fitoterapia* 63 (1992) 411-414.

Benencia F, Courregès MC, Coulombié FC. In vitro activities of *Cedrela tubiflora* aqueous leaf extracts on murine macrophages polymorphonuclear leukocytes and complement. *Phytotherapy Res* 1996 10: 37-41.

Benencia F, Courregès MC, Massouh E, Coulombié FC. Effect of *Melia azedarach* L. leaf extracts on human complement and polymorphonuclear leukocytes. *J. Ethnopharmacol* 41 (1994) 53-57.

Benencia F, Courregès MC, Nores MM, Coulombié FC. Immunomodulatory activities of *Cedrela tubiflora* leaf aqueous extracts. *J of Ethnopharm* 1995 41: 53-57.

Boddingius J, Dijkman H, Hendriksen E, Schiff R, Stolz E: HSV-2 replication sites, monocyte and lymphocytic cell infection and virion phagocytosis by neutrophils, in vesicular lesions on penile skin. Electronoptical studies of a biopsy. *J Cutan Pathol* 1987, 14:165-175.

Braunstein J, Brutsaert S, Olson R, Schindler C: STATs dimerize in the absence of phosphorylation. *J Biol Chem* 2003, 278:34133-34140.

Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U. Mutual regulation of the transcriptional activator NF- $\kappa$ B and its inhibitor, I  $\kappa$ B- $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 (6):2532-6.

Cai SQ, Wang R, Yang X, Shang M, Ma C, Shoyama Y. Antiviral flavonoid-type C-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis*. *Chem Biodivers.* 2006 Mar;3(3):343-8.

Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. NF- $\kappa$ B1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem* 36 (2006) 26041-50.

Carpinella C, Ferrayoli C, Valladares G, Defago M, Palacios S. Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002 66(8):1731-6.

Carpinella MC, Giorda LM, Ferrayoli CG, Palacios SM. Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *J Agric Food Chem* 2003 51(9): 2506-11.

Carpinella MC, Miranda M, Almiron WR, Ferrayoli CG, Almeida FL, Palacios SM. In vitro pediculicidal and ovicidal activity of an extract and oil from fruits of *Melia azedarach* L. *J Am Acad Dermatol* 2007 56(2): 250-6.

Cassady KA, Gross M and Roizman B: The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the gamma134.5 genes precludes shutoff of protein synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2alpha. *J Virol* 1998, 72:7005-11.

Castilla V, Barquero AA, Mersich SE, Coto CE. In Vitro anti-Junin virus activity of a peptide isolated from *Melia azedarach* L leaves. *Int. J. of Antimicrob. Agents*. 10 (1998) 67-75.

Catalone, B. J., T. M. Kish-Catalone, L. R. Budgeon, E. B. Neely, M. Ferguson, F. C. Krebs, M. K. Howett, M. Labib, R. Rando, B. Wigdahl. Mouse model of cervicovaginal toxicity and inflammation for preclinical evaluation of topical vaginal microbicides. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004 (48):1837-1847.

Chen CY, Ballard RC, Beck-Sague CM, et al. Human immunodeficiency virus infection and genital ulcer disease in South Africa: the herpetic connection. *Sex Transm Dis* 2000; 1:21-29.

Chiang LC, Cheng HY, Liu MC, Chiang W, Lin CC. In vitro anti-herpes simplex viruses and anti-adenoviruses activity of twelve traditionally used medicinal plants in Taiwan. *Biol Pharm Bull*. 2003 26(11):1600-4.

Claus JD, Coto CE, de Torres RA. Natural resistance of BALB/c mice to herpes simplex virus type 1 intraperitoneal infection is abrogated by a plant extract with in Vitro anti-herpes activity. *Phytother. Res*. 12 (1998) 250-254.

Conboy IM, Manoli D, Mhaskar V, Jones PP. Calcineurin and vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase modulate macrophage effector functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 6324-6329.

Córdoba M, Coto CE, Damonte EB. Virucidal activity in aqueous extracts from *Cedrela tubiflora* leaves. *Phytotherapy Res* 1991 5: 250-253.

Coto CE, de Torres RA. El paraíso (*Melia azedarach* L.): fuente de productos bioactivos. *Dominguezia* 1999 15 (1): 5-19.

Coulombié FC, Andrei GM, Laguens RP, de Torres RA, Coto CE. Partially purified leaf extracts of *Melia azedarach* L inhibit tacaribe virus growth in neonatal mice. *Phytother. Res*. 6 (1992) 15-19.

Courregès MC, Benencia F, Coto CE, Massouh E, Coulombié FC. In Vitro antiphagocytic effect of *Melia azedarach* L. leaf extracts on mouse peritoneal exudates cells. *J. Ethnopharmacology*. 43 (1994) 135-140.

Courregès MC, Benencia F, Coulombié FC, Coto CE. In-vitro and in-vivo activities of *Melia azedarach* L. aqueous leaf extracts on murine lymphocytes. *Phytomedicine* 5 (1998) 47-53.

Covert MW, Leung TH, Gaston JE, Baltimore D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science*. 2005 (5742):1854-7.

Cowan FM, French RS, Mayaud P, Gopal R, Robinson NJ, de Oliveira SA, Faillace T, Uuskula A, Nygard-Kibur M, Ramalingam S, Sridharan G, El Aouad R, Alami

K, Rbai M, Sunil-Chandra NP, Brown DW. Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco, and Sri Lanka. *Sex Transm Infect.* 2003;79:286–290.

Dai J, Megjugorac NJ, Amrute SB, Fitzgerald-Bocarsly P. Regulation of IFN regulatory factor-7 and IFN- $\alpha$  production by enveloped virus and lipopolysaccharide in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2004;173:1535–1548.

D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M, Chan SH, Kobayashi M, Young D, Nickbarg E, Chizzonite R, Wolf SF, Trinchieri G. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med.* 1992;176:1387–1398.

De Clercq E.. Guanosine analogues as anti-herpesvirus agents. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* (2000) 19, 1531-1541

Descalzo A, Coto CE. Inhibición del virus de pseudorrabia (Suid herpesvirus 1) por acción de un antiviral aislado de hojas de *Melia azedarach* L. *Rev. Argen. Microbiol.* 21 (1989) 133-140.

Dolan A, Jamieson FE, Cunningham C, Barnett BC, McGeoch DJ. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. *J Virol.* 1998;72:2010–2021.

Duerst RJ, Morrison LA. Innate immunity to herpes simplex virus type 2. *Viral Immunol.* 2003; (4):475-90.

Ellermann-Eriksen S. Autocrine secretion of interferon- $\alpha$ /beta and tumour necrosis factor- $\alpha$  synergistically activates mouse macrophages after infection with herpes simplex virus type 2. *J Gen Virol.* 1993;74:2191–2199.

Ellermann-Eriksen S.. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology* (2005) 2, 59-89.

Engelberg R, Carrell D, Krantz E, Corey L, Wald A: Natural history of genital herpes simplex virus type 1 infection. *Sex Transm Dis* 2003, 30:174-177.

Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization.* 1985, 63 (6): 965-81.

Feduchi E, Carrasco L. Mechanism of inhibition of HSV-1 replication by tumor necrosis factor and interferon gamma. *Virology.* 1991;180:822–825.

Flewett TH, Parker RG, Philip WM. Acute hepatitis due to Herpes simplex virus in an adult. *J Clin Pathol.* 1969;22:60–66.

Fultz, M. J., Barber, S. A., Dieffenbach, C. W., Vogel, S. N. Induction of IFN- $\gamma$  in macrophages by lipopolysaccharide. *Int. Immunol.* 1993 (5): 1383–1392.

Galanos C, Freudenberg MA. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology.* 1993 (187):346-56.

Gamba G, Cavalieri H, Courreges MC, Massouh EJ, Benencia F: Early inhibition of nitric oxide production increases HSV-1 intranasal infection. *J Med Virol* 2004, 73:313-322.

Gessani S, Belardelli F. IFN- $\gamma$  expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998 (9):117– 23.

Ghanekar S, Zheng L, Logar A, Navratil J, Borowski L, Gupta P, Rinaldo C. Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. *J Immunol.* 1996;157:4028–4036.

Gill N, Rosenthal KL, Ashkar AA. NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. *J Virol.* 2005;79:4470–4478.



Halford WP, Halford KJ, Pierce AT: Mathematical analysis demonstrates that interferons-beta and -gamma interact in a multiplicative manner to disrupt herpes simplex virus replication. *J Theor Biol* 2005, 234:439-54.

Hanifa Moursi SA, Al-Khatib IM. Effect of *Melia azedarach* fruits on gipsing-restraint stress-induced ulcers in rats. *Jpn J Pharmacol*. 1984 36(4):527-33.

Harandi A. M., Eriksson K., Holmgren J. A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. *J. Virol.* (2003) 77, 953-62.

Härle P; Sainz B; Carr DJ and Halford WP: The immediate-early protein, ICP0, is essential for the resistance of herpes simplex virus to interferon alpha/beta. *Virology* 2002; 293:295-304.

Hayward GS, Frenkel N, Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA: strain differences and heterogeneity in the locations of restriction endonuclease cleavage sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72:1768-1772.

Herbein G, O'Brien WA. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;223:241-257.

Herbst-Kralovetz M, Pyles R. Toll-like receptors, innate immunity and HSV pathogenesis. *Herpes*. 2006 (2):37-41.

Herbst-Kralovetz MM, Pyles RB. Quantification of Poly(I:C)-Mediated Protection against Genital Herpes Simplex Virus Type 2 Infection. *J of Virol*, 2006, (80): 9988-9997.

Hillard P, Seeds J, Cefalo R. Disseminated herpes simplex in pregnancy: two cases and a review. *Obstet Gynecol Surv*. 1982;37:449-453.

Hodge-Dufour J, Marino MW, Horton MR, Jungbluth A, Burdick MD, Strieter RM, Noble PW, Hunter CA, Pure E. Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:13806-13811.

Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*. 2002 (5596):1241-5.

Holmberg SD, Stewart JA, Gerber AR, Byers RH, Lee FK, O'Malley PM, Nahmias AJ. Prior herpes simplex virus type 2 infection as a risk factor for HIV infection. *JAMA*. 1988 ;259(7):1048-50.

Hook EW, Cannon RO, Nahmias AJ, Lee FF, Campbell CH, Glasser D, Quinn TC. Herpes simplex virus infection as a risk factor for human immunodeficiency virus infection in heterosexuals. *J Infect Dis*. 1992;165(2):251-5.

Huang KL, Lai YK, Lin CC, Chang JM. Inhibition of hepatitis B virus production by *Boehmeria nivea* root extract in HepG2 2.2.15 cells. *World J Gastroenterol*. 2006 Sep 21;12(35):5721-5.

Huang, RC, Tadera K, Yagi F, Minami Y, Okamura H, Iwagawa T, Nakatani M. Limonoids from *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 1996 43 (3): 581-583.

Hurgin V, Novick D, Werman A, Dinarello CA, Rubinstein M. Antiviral and immunoregulatory activities of IFN- $\gamma$  depend on constitutively expressed IL-1 $\alpha$ . *PNAS* 2007 (104): 5044-5049.

Ichiyama K, Tai A, Yamamoto I. Augmentation of antigen-specific antibody production and IL-10 generation with a fraction from Rooibos (*Aspalathus linearis*) tea. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007 71(2):598-602.

Josey WE, Nahmias AJ, Naib ZM. The epidemiology of Type 2 (genital) herpes simplex virus infection. *Obstet Gynecol Surv.* 1972;27(4):suppl:295-302

Kanangat S, Babu J S, Knipe D M, Rouse B T. HSV-1-mediated modulation of cytokine gene expression in a permissive cell line: selective upregulation of IL-6 gene expression. *Virology.* 1996;219:295–300.

Kaushic C, Ashkar AA, Reid LA, Rosenthal KL. Progesterone increases susceptibility and decreases immune responses to genital herpes infection. *J Virol.* 2003 (8):4558-65.

Keys JD. *Chinese Herbs. Their botany, Chemistry & Pharmacodynamics*, Charles Tuttle, Tokio (1976)

Khan MR, Kihara M, Omoloso AD. Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchensis*. *Fitoterapia.* 2001 Nov;72(7):825-8.

Khory RN and Katrak NN. *Materia Medica od India and their Therapuetics*. Neeraj Pub. House, Delhi (1981).

Kim M, Kim SK, Park BN, Lee KH, Min GH, Seoh JY, Park CG, Hwang ES, Cha CY, Kook YH. Antiviral effects of 28-deacetylSENDANIN on herpes simplex virus-1 replication. *Antiviral Res.* 1999 43(2):103-12.

Kim S, Elkon KB, Ma X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity.* 2004;21:643–653.

Kimberlin DW, Lin CY, Jacobs RF, Powell DA, Corey L, Gruber WC, Rathore M, Bradley JS, Diaz PS, Kumar M, Arvin AM, Gutierrez K, Shelton M, Weiner LB, Sleasman JW, de Sierra TM, Weller S, Soong SJ, Kiell J, Lakeman FD, Whitley RJ. Safety and efficacy of high-dose intravenous acyclovir in the management of neonatal herpes simplex virus infections. *Pediatrics.* 2001;108:230–238

Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex infection. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:1–13.

Kmoníčková E, Kutinová Canová N, Farghalib H, Holýc A, Zídeka Z. Modulator of intracellular Ca<sup>2+</sup>, thapsigargin, interferes with *in vitro* secretion of cytokines and nitric oxide. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005, (2):321–4.

Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med.* 1989;170:827–845

Koelle DM, Posavad CM, Barnum GR, Johnson ML, Frank JM, Corey L. Clearance of HSV-2 from recurrent genital lesions correlates with infiltration of HSV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* 101 (1998) 1500-1508.

Kokuba H, Aurelian L, Neurath AR. 3-Hydroxyphthaloyl b-lactoglobulin. IV. Antiviral activity in the mouse model of genital herpesvirus infection. *Antivir Chem Chemother* 9 (1998) 353-357.

Kovacevic N, Colic M, Backovic A, Doslov-Kokorus Z. Immunomodulatory effects of the methanolic extract of *Epimedium alpinum* in vitro. *Fitoterapia.* 2006 77(7-8):561-7.

Kuo YC, Lin YL, Liu CP, Tsai WJ. Herpes simplex virus type 1 propagation in HeLa cells interrupted by *Nelumbo nucifera*. *J Biomed Sci.* 2005;12(6):1021-34.

Leib DA, Harrison TE, Laslo KM, Machalek MA, Moorman NJ and Virgin HW: Interferons regulate the phenotype of wild-type and mutant herpes simplex virus in vivo. *J Exp Medicine* 1999, 189:663-672.

Leib DA, Machalek MA, Williams BR, Silverman RH and Virgin HW: Specific phenotypic restoration of an attenuated virus by knockout of a host resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:6097-101.

Leist TP, Heuchel R, Zinkernagel RM. Increased bactericidal macrophage activity induced by immunological stimuli is dependent on interferon (IFN)-gamma. Interference of anti-IFN-gamma but not anti-IFN-alpha/beta with modulation of macrophage activity caused by lymphocytic choriomeningitis virus infection or systemic graft-vs.-host reactions. *Eur J Immunol*. 1988;18:1295–1298.

Linehan MM, Richman S, Krummenacher C, Eisenberg RJ, Cohen GH, Iwasaki A: In vivo role of nectin-1 in entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and HSV-2 through the vaginal mucosa. *J Virol* 2004, 78:2530-2536.

Linnemann CCJ, First MR, Alvira MM, Alexander JW, Schiff GM. Herpesvirus hominis type 2 meningoencephalitis following renal transplantation. *Am J Med*. 1976;61:703–708

Liu J, Guan X, Ma X. Regulation of IL-27 p28 gene expression in macrophages through MyD88- and interferon- $\gamma$ -mediated pathways. *J Expe Med* 2007 (204): 141-152.

Malmgaard L, Paludan SR, Mogensen SC, Ellermann-Eriksen S. Herpes simplex virus type 2 induces secretion of IL-12 by macrophages through a mechanism involving NF-kappaB. *J Gen Virol*. 2000;81:3011–3020.

Malmgaard L, Paludan SR. Interferon (IFN)-alpha/beta, interleukin (IL)-12 and IL-18 coordinately induce production of IFN-gamma during infection with herpes simplex virus type 2. *J Gen Virol*. 2003;84:2497–2500.

Mansur DS, Kroon EG, Nogueira ML, Arantes RM, Rodrigues SC, Akira S, Gazzinelli RT, Campos MA. Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with herpes simplex virus 1. *Am J Pathol*. 2005 (5):1419-26.

Marriott I, Bost KL, Huet-Hudson YM. Sexual dimorphism in expression of receptors for bacterial lipopolysaccharides in murine macrophages: A possible mechanism for gender-based differences in endotoxic shock susceptibility. *J Reprod Immun* 2006 (71): 12-27.

McCluskie MJ, Cartier JL, Patrick AJ, Sajic D, Weeratna RD, Rosenthal KL, Davis HL. Treatment of intravaginal HSV-2 infection in mice: a comparison of CpG oligodeoxynucleotides and resiquimod (R-848). *Antiviral Res*. 2006 69(2):77-85.

McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*. 1988;69:1531–1574.

Milligan, G. N., K. L. Dudley, N. Bourne, A. Reece, and L. R. Stanberry. Entry of inflammatory cells into the mouse vagina following application of candidate microbicides: comparison of detergent-based and sulphated polymer-based agents. *Sex. Transm. Dis*. 2002 (29):597–605.

Mogensen SC, Virelizier JL. The interferon-macrophage alliance. *Interferon*. 1987 (8):55-84.

Moller B, Ellermann-Eriksen S, Storgaard M, Obel N, Bendtzen K, Petersen CM. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors conserve TNF bioactivity in meningitis patient spinal fluid. *J Infect Dis*. 1996;174:557–563

Moller M, Suschke U, Nolkemper S, Schneelee J, Distl M, Sporer F, Reichling J, Wink M. Antivacterial, antiviral, antiproliferative and apoptosis-inducing properties of *Brackenridgea zanguebarica* (Ochnaceae). *J Pharm Pharmacol* 2006 58(8): 1131-8.

Morahan PS, Morse SS, McGeorge MG. Macrophage extrinsic antiviral activity during herpes simplex virus infection. *J Gen Virol*. 1980;46:291–300.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1983) 55-63.

Mossmann KL, Sherburne R, Lavery C, Duncan J and Smiley JR: Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol* 2000,74:6287-99.

Naesens L., De Clercq E.. Recent developments in herpesvirus therapy. *Herpes* (2001) 8, 12-16.

Nahmias AJ, Lee FK, Beckman-Nahmias S. Sero-epidemiological and -sociological patterns of herpes simplex virus infection in the world. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1990;69:19–36.

Nahmias AJ, Von Reyn CF, Josey WE, et al. Genital herpes simplex virus infection and gonorrhoea: Association and analogies. *Br J Vener Dis* 1973;49:306–309.

Nakatani M, Huang RC, Okamura H, Iwagawa T, Tadera K. Degraded limonoids from *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 1998 49: 1773-1776.

Nguyen VT, Benveniste EN. Critical role of TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B in IFN- $\gamma$ -induced CD40 expression in microglia/macrophages. *J Biol Chem* 2002 (277):13796.

Nolkemper S, Reichling J, Stintzing FC, Carle R, Schnitzler P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Planta Med*. 2006 Dec;72(15):1378-82. Epub 2006 Nov 7

Nores MM, Courregès MC, Benencia F, Coulombié FC. Immunomodulatory activities of *Cedrela lilloi* and *Trichilia elegans* aqueous leaf extracts. *J Ethnopharmacol* 1997 55 (2): 99-106.

Omarsdottir S, Freysdottir J, Olafsdottir ES. Immunomodulating polysaccharides from the lichen *Thamnia vermicularis* var. *subuliformis*. *Phytomedicine*. 2007 14(2-3):179-84.

Oritani K, Tomiyama Y: Interferon-zeta/limitin: novel type I interferon that displays a narrow range of biological activity. *Int J Hematol* 2004, 80:325-331.

Paludan SR, Ellermann-Eriksen S, Kruys V, Mogensen SC. Expression of TNF- $\alpha$  by Herpes Simplex Virus-infected macrophages is regulated by a dual mechanism: transcriptional regulation by NF- $\kappa$ B and activating transcription factor 2/Jun and translational regulation through the AU-rich region of the 3' untranslated region. *J Immunol* 167 (2001) 2202-2208.

Paludan SR, Ellermann-Eriksen S, Mogensen SC. NF- $\kappa$ B activation is responsible for the synergistic effect of herpes simplex virus type 2 infection on interferon-gamma-induced nitric oxide production in macrophages. *J Gen Virol*. 1998;79:2785–2793.

Paludan SR, Lovmand J, Ellermann-Eriksen S, Mogensen SC. Effect of IL-4 and IL-13 on IFN-gamma-induced production of nitric oxide in mouse macrophages infected with herpes simplex virus type 2. *FEBS Lett*. 1997;414:61–64.

Paludan SR, Mogensen SC. Virus-cell interactions regulating induction of tumor necrosis factor alpha production in macrophages infected with herpes simplex virus. *J Virol*. 2001;75:10170–10178.

Paludan SR. Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects. *J Leukoc Biol*. 2000 (1):18-25.

Parrota JA, Chaturvedi AN. *Azadirachta indica* A. Juss. Neem, margosa. 1994, Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. New Orleans, LA.8p

Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004;202:8–32.

Pierce AT, De Salvo J, Foster TP, Kosinski A, S  ller SK and Halford WP: Beta interferon and gamma interferon synergize to block DNA and virion synthesis in herpes simplex virus-infected cells. *J Gen Virol* 2005, 86:2421-2432.

Pifarré MP, Berra A, Coto CE, Alch   LE. Therapeutic action of meliacine, a plant antiviral, on HSV-induced ocular disease in mice. *Exp. Eye Res.* 75 (2002) 327-334.

Ramana, C. V., Gil, M. P., Schreiber, R. D., Stark, G. R. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-  -dependent signaling. *Trends Immunol.* (2002) (23): 96–101.

Ramprasath VR, Shanthi P, Sachdanandam P. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Semecarpus anacardium* LINN. Nut milk extract in experimental inflammatory conditions. *Biol Pharm Bull.* 2006 29(4):693-700.

Rawls WE, Gardner HL, Flanders RW, et al. Genital herpes in two social groups. *Am J Obstet Gynecol* 1971;110:682–689.

Rawls WE, Gardner HL. Herpes genitalis: Venereal aspects. *Clin Obstet Gynecol* 1972;15:912–918.

Richards JT, Kern ER, Overall JC, Glasgow LA. Differences in neurovirulence among isolates of Herpes simplex virus types 1 and 2 in mice using four routes of infection. *J Infect Dis.* 1981;144(5):464-71.

Roest RW, van der Meijden WI, van Dijk G, Groen J, Mulder PG, Verjans GM, Osterhaus AD: Prevalence and association between herpes simplex virus types 1 and 2-specific antibodies in attendees at a sexually transmitted disease clinic. *Int J Epidemiol* 2001, 30:580-588.

Roner MR, Sprayberry J, Spinks M, Dhanji S. Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Molina). *J Gen Virol* 2007 88 (1): 275-85.

Roy A, Saraf S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom., *Biol Pharm Bull.* 2006 29(2):191-201.

Sainz B, Jr and Halford W: Alpha/beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. *J of Virol* 2002, 76:11541-11550.

Sainz Jr B, Mossel EC, Peters CJ and Garry RF: Interferon-beta and interferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). *Virol* 2004, 329:11-17.

SainzB, Jr, LaMarca HL Garry RF and Morris C: Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alpha/beta and interferon-gamma. *Virol J* 2005, 2:14

Saleem R, Ahmed SI, Shamim SM, Faizi S, Siddiqui BS. Antibacterial effect of *Melia azedarach* flowers on rabbits. *Phytother Res.* 2002 Dec;16(8):762-4.

Samuel CE: Antiviral action of interferons. *Clinical Microbiology Reviews* 2001, 14:778-809.

Sarisky RT, Quail MR, Clark PE, Nguyen TT, Halsey WS, Wittrock RJ, O'Leary Bartus J, Van Horn MM, Sathe GM, Van Horn S, Kelly MD, Bacon TH, Leary JJ. Characterization of Herpes Simplex Viruses Selected in Culture for Resistance to Penciclovir or Acyclovir. *J Virol* 2001, 75(4): 1761-1769.

Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol.* 2007 (8):1.

Shin YW, Bae EA, Cai XF, Lee JJ, Kim DH. In vitro and in vivo antiallergic effect of the fructus of *Evodia rutaecarpa* and its constituents. *Biol Pharm Bull.* 2007 30(1):197-9.

Skoldenberg B. Herpes simplex encephalitis. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1996;100:8–13.

Smee DF, Martin JC, Verheyden JP, Matthews TR. Anti-herpesvirus activity of the acyclic nucleoside 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;23(5):676-82.

Solomon L, Cannon MJ, Reyes M, Graber JM, Wetherall NT, Reeves WC. Epidemiology of recurrent genital herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex Transm Infect.* 2003;79:456–459.

Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, Bernstein DI, Mindel A, Sacks S, Tyring S, Aoki FY, Slaoui M, Denis M, Vandepapeliere P, Dubin G; GlaxoSmithKline Herpes Vaccine Efficacy Study Group. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med.* 2002 Nov 21;347(21):1652-61

Steward WE, Gosser LB, Lockart RZJ. The effect of priming with interferon on interferon production by two lines of L cells. *J Gen Virol.* 1972;15:85–87.

Strutt M, Bailey J, Tenant-Flowers M, Graham D, Zuckerman M. Ethnic variation in type of genital herpes simplex virus infection in a South London genitourinary medicine clinic. *J Med Virol.* 2003;69:108–110.

Suligoi B, Torri A, Grilli G, Tanzi E, Palu G. Seroprevalence and seroincidence of herpes simplex virus type 1 and herpes simplex virus type 2 infections in a cohort of adolescents in Italy. *Sex Transm Dis.* 2004;31:608–610.

Sunthitikawinsakul A, Kongkathip N, Kongkathip B, Phonnakhu S, Daly JW, Spande TF, Nimit Y, Napaswat C, Kasisit J, Yoosook C. Anti-HIV-1 limonoid: first isolation from *Clausena excavata*. *Phytother Res.* 2003 17(9):1101-3.

Svensson A, Nordstrom I, Sun JB, Eriksson K. Protective immunity to genital herpes simplex virus type 2 infection is mediated by T-bet. *J Immunol.* 2005;174:6266–6273.

Szewczuk VD, Mongelli ER, Pomilio AB. In vitro anthelmintic activity of *Melia azedarach* naturalized in Argentina. *Phytother Res.* 2006 20(11):993-6.

Tada K, Takido M, Kitanaka S. Limonoids from fruit of *Melia toosendan* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry.* 1999 Jul;51(6):787-91.

Tan SL, Katze MG: HSV.com: maneuvering the internetworks of viral neuropathogenesis and evasion of the host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:5684-5686.

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., Tanaka, N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 2001, (19): 623–655.

Tolo FM, Rukunga GM, Muli FW, Njagi EN, Njue W, Kumon K, Mungai GM, Muthaura CN, Muli JM, Keter LK, Oishi E, Kofi-Tsekpo MW. Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against herpes simplex virus. *J Ethnopharmacol.* 2006 104(1-2):92-9.

Tran T, Druce JD, Catton MC, Kelly H, Birch CJ. Changing epidemiology of genital herpes simplex virus infection in Melbourne, Australia, between 1980 and 2003. *Sex Transm Infect.* 2004;80:277–279.

Trombone AP, Silva CL, Lima KM, Oliver C, Jamur MC, Prescott AR, Coelho-Castelo AA. Endocytosis of DNA-Hsp65 Alters the pH of the Late Endosome/Lysosome and Interferes with Antigen Presentation. PLoS ONE. 2007; 2(9):e923.

Trybala E, Liljeqvist JA, Svennerholm B, Bergstrom T. Herpes simplex virus types 1 and 2 differ in their interaction with heparan sulfate. J Virol. 2000;74:9106–9114.

Tyring SK, Arany I, Stanley MA, Tomai MA, Miller RL, Smith MH, McDermott DJ, Slade HB A randomized, controlled, molecular study of condylomata acuminata clearance during treatment with imiquimod. J Infect Dis. 1998 178(2):551-5.

Van Damme L, Ramjee G, Alary M, Vuylsteke B, Chandeying V, Rees H, Sirivongrangsorn P, Mukenge-Tshibaka L, Ettiègne-Traoré V, Uaheowitchai C, Karim SS, Mâsse B, Perriens J, Laga M; COL-1492 Study Group. Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. Lancet. 2002 360(9338):971-7.

van Furth R, Cohn ZA: The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. J Exp Med 1968, 128:415-435.

van PV, Lanaya H, Renauld JC, Michiels T. Characterization of the murine alpha interferon gene family. J Virol. 2004;78:8219–8228.

Vila-del Sol V, Fresno M. Involvement of TNF and NF-kappa B in the transcriptional control of cyclooxygenase-2 expression by IFN-gamma in macrophages. J Immunol. 2005 (5):2825-33.

Villamil SM, Alché LE, Coto CE. Inhibition of Herpes simplex type 1 multiplication by meliacine, a peptide of plant origin. Antiv. Chem. Chemother. 6 (1995) 239-244.

Virginia Vila-del Sol, Manuel D. Díaz-Muñoz, Manuel Fresno. Requirement of tumor necrosis factor  $\alpha$  and nuclear factor- $\kappa$ B in the induction by IFN- $\gamma$  of inducible nitric oxide synthase in macrophages. JI of Leuk Biol 2007 (81): 272-283.

Wachsman MB, Andrei GM, Daelli MG, Coto CE. Actividad antiviral asociada a una fracción polipeptídica obtenida de extractos de *Melia azedarach* L. Acta Farm Bonaerense 1984, 3(1):27-31.

Wachsman MB, Castilla V, Coto CE. Inhibition of foot and mouth disease virus (FMDV) uncoating by a plant-derived peptide isolated from *Mela azedarach* L. leaves. Arch. Virol. 143 (1998) 581-590.

Wachsman MB, Damonte EB, Coto CE, de Torres RA. Antiviral effects of *Melia azedarach* L. leaves extracts on Sindbis virus-infected cells. Antivir. Res. 8 (1987) 1-12.

Wachsman MB, Martino V, Gutkind GO, Coussio JD, Coto CE, de Torres RA, Antiviral activity of a *Melia azedarach* L. plant extract. Fitoterapia 53 (1982) 167-170.

Walev I, Dienes H P, Bohl J, Podlech J, Falke D. Correlation of virus replication, cytokine (TNF- $\alpha$  and IL-1) producing cells, neuronal necrosis and inflammation after intranasal infection of mice with herpes simplex virus strains of different virulence. Arch Virol. 1995;140:1957–1967.

Walz MA, Price RW, Hayashi K, Katz BJ, Notkins AL. Effect of immunization on acute and latent infections of vaginouterine tissue with herpes simplex virus types 1 and 2. J Infect Dis. 1977;135(5):744-52.

Wandscheer CB, Duque JE, da Silva MA, Fukuyama Y, Wohlke JL, Adelman J, Fontana JD. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. Toxicon. 2004 44(8):829-35.

Whitley RJ: Neonatal herpes simplex virus infections: is there a role for immunoglobulin in disease prevention and therapy? *Pediatr Infect Dis J* 1994, 13:432-438.

Wiat C, Kumar K, Yusof MY, Hamimah H, Fauzi ZM, Sulaiman M. Antiviral properties of ent-labdene diterpenes of *Andrographis paniculata* nees, inhibitors of herpes simplex virus type 1. *Phytother Res.* 2005 19(12):1069-70.

World Health Organization. Traditional medicine strategy. 2002-2005.

Wu BW, Pan TL, Leu YL, Chang YK, Tai PJ, Lin KH, Horng JT. Antiviral effects of *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) against enterovirus 71. *Am J Chin Med.* 2007; 35 (1):153-68.

Xiao WL, Tian RR, Pu JX, Li X, Wu L, Lu Y, Li SH, Li RT, Zheng YT, Zheng QT, Sun HD. Triterpenoids from *Schisandra lancifolia* with anti-HIV-1 activity. *J Nat Prod.* 2006 Feb; 69 (2):277-9.

Xu, F., J. A. Schillinger, M. R. Sternberg, R. E. Johnson, F. K. Lee, A. J. Nahmias, L. E. Markowitz. 2002. Seroprevalence and coinfection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988–1994. *J. Infect. Dis.* 185:1019–1024.

Yanes A, Finol HJ, Hasegawa M. Effects of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts from leaves on *Trypanosoma cruzi* growth and ultrastructure. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2004 36(2):149-54.

Yuan HL, Yang M, Li XY, You RH, Liu Y, Zhu J, Xie H, Xiao XH. Hepatitis B virus inhibiting constituents from *Herpetospermum caudigerum*. *Chem Pharm Bull (Tokio)* 2006 54 (11): 1592-4.

Zakir-ur-Rahman, Ahmad S, Qureshi S, Atiq-ur-Rahman, Badar Y. Toxicological studies of *Melia azedarach* L. (flowers and berries). *Pak J Pharm Sci.* 1991 4(2):153-8.

Zeitlin L, Whaley KJ. Microbicides for preventing transmission of genital herpes. *Herpes.* 2002 9(1):4-9.

Zeng X, Dong Y, Sheng G, Dong X, Sun X, Fu J. Isolation and structure determination of anti-influenza component from *Mahonia bealei*. *J Ethnopharmacol.* 2006 Dec 6;108(3):317-9.

Zhao J, Kong HJ, Li H, Huang B, Yang M, Zhu C, Bogunovic M, Zheng F, Mayer L, Ozato K, Unkeless J, Xiong H. IRF-8/interferon (IFN) consensus sequence-binding protein is involved in Toll-like receptor (TLR) signaling and contributes to the cross-talk between TLR and IFN-gamma signalling pathways. *J Biol Chem.* 2006 (15):10073-80.