

Tesis Doctoral

Un terpenoide natural con actividades inmunomoduladora y antiangiogénica como potencial agente antiherpético

Bueno, Carlos Alberto

2010

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

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

Cita tipo APA:

Bueno, Carlos Alberto. (2010). Un terpenoide natural con actividades inmunomoduladora y antiangiogénica como potencial agente antiherpético. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Bueno, Carlos Alberto. "Un terpenoide natural con actividades inmunomoduladora y antiangiogénica como potencial agente antiherpético". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

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

**UN TERPENOIDE NATURAL CON ACTIVIDADES
INMUNOMODULADORA Y ANTIANGIOGÉNICA COMO
POTENCIAL AGENTE ANTIHERPÉTICO**

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

Carlos Alberto Bueno

Director de tesis: Dra. Laura Edith Alché

Consejero de estudios: Dra. Laura Edith Alché

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

Buenos Aires, 2010

Un terpenoide natural con actividades inmunomoduladora y antiangiogénica como potencial agente antiherpético

La Queratitis Estromal Herpética (QH) se produce por una respuesta inflamatoria que ocurre en el ojo humano como secuela de la infección causada por el virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), siendo la primera causa epidemiológica de ceguera infecciosa en los países desarrollados. Uno de eventos característicos de la evolución de la QH es la neovascularización.

Para limitar la progresión de la enfermedad se utilizan los corticosteroides y el aciclovir (ACV) que mitigan la inflamación e impiden la diseminación viral, respectivamente. Teniendo en cuenta los efectos adversos generados por los corticoides y el fenómeno de emergencia de mutantes del HSV-1 resistentes al ACV, se pone de relieve la necesidad de encontrar nuevas drogas antivirales. La búsqueda no sólo debería estar orientada a la obtención de compuestos que interfieran con alguna etapa del ciclo de multiplicación viral, sino que también contemple el hecho que la droga en cuestión interfiera con alguna señal intracelular, produciendo un efecto final tanto antiviral como inmunomodulador.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que un extracto parcialmente purificado obtenido a partir de hojas de *Melia azedarach* L., denominado meliacina (MA), inhibe la multiplicación de virus pertenecientes a distintas familias, en condiciones *in vitro* y en ausencia de citotoxicidad. *In vivo*, MA inhibe la incidencia y la severidad de la QH murina, lo cual sugiere que ejercería un efecto antiinflamatorio, además de actuar como antiviral. Uno de los principios antivirales presentes en dichos extractos es el tetranortriterpenoide 1-cinamoil-3,11-dihidroxi meliacarpina (CDM), que inhibe la multiplicación del HSV-1 *in vitro*, basifica los endosomas, y afecta el transporte de las glicoproteínas virales a la membrana plasmática.

En el presente trabajo de tesis se investigó el mecanismo de acción antiviral e inmunomodulador de CDM en células epiteliales del tejido ocular y en células inflamatorias, así como también el efecto antiangiogénico del compuesto en células endoteliales. Así fue posible avanzar en la comprensión de mecanismos moleculares y celulares que podrían explicar el efecto curativo de MA en la enfermedad ocular inducida por HSV-1 en ratón.

Palabras claves: plantas medicinales; herpes simplex; antiviral; inmunomodulador; antiangiogénico; citoquinas; inmunopatología; queratitis estromal herpética.

A natural terpenoid with immunomodulatory and antiangiogenic activities as a potential antiherpetic agent

Ocular Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1) infection may result in a inflammatory lesion in the eye termed Herpetic stromal keratitis (HSK). Such HSK lesions represent the commonest infectious cause of blindness in developed countries. Neovascularization stands for a major step in HSK pathogenesis.

The current standard of care includes topical corticosteroids and acyclovir (ACV). Corticosteroids are used to combat the inflammatory component of the disease, and the antiviral prevents viral dissemination. Considering the adverse effects caused by steroids and the phenomenon of emergence of mutant HSV-1 strains resistant to ACV, highlights the need for new antiviral drugs. The search should not only be aimed at obtaining compounds that interfere with some stage of viral multiplication cycle, but should also affect an intracellular signal, gathering together both antiviral and immunomodulatory effects.

Our laboratory has demonstrated that a partially purified extract obtained from leaves of *Melia azedarach* L., called meliacine (MA), inhibits the multiplication of viruses belonging to different families in the absence of cytotoxicity, *in vitro*. *In vivo*, MA inhibits the incidence and severity of the murine HSK, suggesting that it exerts an anti-inflammatory effect in addition to its antiviral action. One of the main antiviral principles obtained in these extracts is the 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin (CDM), which inhibits HSV-1 multiplication *in vitro* provokes the basification of the endosomal vesicles, and affects the trafficking of viral glycoproteins.

In this thesis we investigated the antiviral and immunomodulatory activities of CDM in epithelial cells of ocular tissue and inflammatory cells, as well as its antiangiogenic effect in endothelial cells. Thus, it was possible to advance in the understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in the healing effect of MA in the ocular HSV-1 infection in mice.

Keywords: medicinal plants; herpes simplex; antiviral; immunomodulatory; antiangiogenic; cytokine; immunopathology; herpetic stromal keratitis.

Agradecimientos

A Laura por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis de doctorado y por haberme enseñado muchísimo durante estos años de trabajo.

A Andrea, por sus consejos, buena onda, y por estar siempre dispuesta a ayudar.

A Flavia, que desde el primer día que entré al laboratorio siempre me ayudó en todo lo que podía y siempre con muy buena onda y predisposición.

A Erina, por toda su ayuda y buena onda.

A Guille, por su muy buena onda (excepto cuando le pedía melia...), sus consejos sinceros...y por festejar mis chistes.

A Isa, por toda su ayuda desinteresada, y por encontrar siempre lo que buscamos..."¿qué van a hacer cuándo yo me jubile?"...

Al Dr. Alejandro Berra, por haberme contactado con Laura, y darme la oportunidad de trabajar con ella.

A toda la gente que forman o formaron parte del Laboratorio de Virología: Maru, Cata, Diego, Caro, Ceci, Cybele, Susana, Mercedes, Luis, Mónica, Elsa, Nelly, Vivi, Jose, Carlos, Ana, Sandra, Laurita, Pablo, Flor, Eli, Guada y Clau.

A mi familia, por todo su amor y apoyo incondicional. Gracias mamá, papá, Pablo, abuelos, tíos y primos.

A Vir, por toda su ayuda, apoyo y todo su amor, y por recordarme lo que es verdaderamente importante.

A mis amigos Belchi, Cabe, Palu, Matu, Casco, Martin, Nico, y Juan, por haber estado siempre cuando los necesité.

A mis amigos Idehuísticos: Daniela, Guille, Petite, Griselda, Sofi, Ale y Julia.

Ale y Daniel, muchas gracias por tener tan buena predisposición, aguantarme, asesorarme y ayudarme en los experimentos que hicimos juntos.

Los resultados de esta Tesis han sido publicados en forma parcial en las siguientes revistas científicas:

Bueno, CA, Barquero, AA, Di Cónsoli, H, Maier, MS, Alché, LE (2009). A natural tetranortriterpenoid with immunomodulating properties as a potential anti-HSV agent. *Virus Res* 141, 47-54.

Bueno, CA, Alché, LE, Barquero, AA, (2010). 1-Cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin delays glycoprotein transport restraining virus multiplication without cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 32-7.

El presente trabajo se realizó con la financiación proveniente de:

- Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad de Buenos Aires (UBA)

Abreviaturas	iv
Introducción	1
1. Patogenia de las infecciones virales	2
2. Mecanismos de la respuesta inmune a la infección viral	4
2.1. Respuesta inmune innata y adaptativa en las infecciones virales	4
2.2. Factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune innata frente a infecciones virales	8
3. Inmunopatologías virales	10
4. Herpesvirus de relevancia para la salud humana. HSV-1	15
4.1. Patologías oculares debidas a la infección con HSV-1. Queratitis herpéticas	16
4.2. Mecanismos patogénicos durante la QH	19
5. Antivirales	25
5.1. Mecanismo de acción de los antivirales	25
5.2. Proteínas celulares como blanco de los antivirales	27
5.3. Drogas antiherpéticas	31
5.4. Nuevas moléculas antiherpéticas	35
6. Plantas medicinales	37
6.1. Actividad antiviral de plantas medicinales	39
6.2. Meliáceas	43
6.3. <i>Melia azedarach</i> L.	44
6.4. Compuestos bioactivos aislados de <i>Melia azedarach</i> L.	44
6.5. Principio activo de MA	49
Objetivos	53
Materiales y Métodos	55
1. Células	56
2. Virus	57
3. Protocolo de obtención de MA y CDM	57
4. Reactivos	58
5. Ensayo de citotoxicidad y antiproliferativo	59
6. Inhibición del rendimiento viral	60

7.	Titulación viral por plaqueo en medio semisólido	60
8.	Tinción de naranja de acridina para células vivas	60
9.	Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	61
10.	Análisis cuantitativo de la fluorescencia	61
11.	Transfecciones	62
12.	Incorporación de transferrina	63
13.	Western blot (WB)	63
14.	Cuantificación de citoquinas	63
15.	Ensayo de migración celular en Transwell	64
16.	Ensayo de formación de tubos capilares en Matrigel	64
17.	Ensayo de inflamación cutánea inducida por radiación ultravioleta (UV) en ratones	65
	Resultados	66
	Capítulo 1. Evaluación de la actividad antiviral e inmunomoduladora de CDM	67
1.1.	Evaluación de la actividad antiviral de CDM en células epiteliales e inmunes	68
1.2.	Evaluación de la actividad inmunomoduladora de CDM en células epiteliales e inmunes	73
1.2.1.	¿CDM ejerce algún efecto en la activación de NF- κ B en células epiteliales e inmunes infectadas con HSV-1?	74
1.2.2.	¿CDM afecta la producción de citoquinas en células epiteliales y macrófagos infectados con HSV-1?	80
1.2.3.	Efecto de CDM sobre la activación de NF- κ B en las células NHC, HCLE y J774A.1 estimuladas con inductores no virales	83
1.2.4.	Efecto de CDM sobre la producción de citoquinas en células NHC, HCLE y J774A.1 estimuladas con inductores no virales	90
1.2.5.	Efecto inmunomodulador de MA en un modelo murino de inflamación cutánea inducida por radiación ultravioleta (UV)	93

Capítulo 2. Efecto de CDM sobre el transporte de glicoproteínas virales y celulares	96
2.1. Efecto de CDM en la localización intracelular del TfR-GFP	97
2.2. Efecto de CDM y agentes acidotrópicos sobre el transporte del TNF- α	104
2.3. Efecto de CDM en las proteínas virales de HSV-1	107
Capítulo 3. Evaluación de la actividad antiangiogénica de CDM	112
3.1. Efecto de CDM sobre la expresión de VEGF	114
3.2. Efecto de CDM sobre la supervivencia y migración de las células endoteliales y la formación de los tubos capilares	119
3.3. Efecto de CDM sobre la producción de citoquinas en cultivos de células HUVEC crecidas en matrigel	125
Discusión	132
Bibliografía	146

ACV : aciclovir
AINE : antiinflamatorio no esteroide
AMD: degeneración macular relacionada con la edad
CC: control de células
CC₅₀: concentración citotóxica 50/
CCDA : citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CCR: correceptor celular
CD : célula dendrítica
CDM: 1-cinamoil-3,11-dihidroxi meliacarpina
CDK : quinasa dependiente de ciclina
CE₅₀: concentración efectiva 50/
CFP: proteína cian fluorescente
CHX: cicloheximida
CI₅₀: concentración inhibitoria 50/
CMH : complejo mayor de histocompatibilidad
CON: concanamicina A
COX: ciclooxigenasa
CPA : célula presentadora de antígenos
CTC: complejo quelante de cobalto
DT1: diabetes tipo 1
DO: densidad óptica
EBV: virus Epstein Barr
ER: endosomas de reciclaje
FDA: Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos(U.S. Food and Drug Administration)
FMDV: virus de la aftosa
GalT2-GFP: plásmido conteniendo el cDNA de la galactosil transferasa 2 fusionada con la GFP
gB, gC, gD, gH, gL.: glicoproteínas de HSV-1
GFP: proteína verde fluorescente
Gvsv: glicoproteína G de VSV
GTOV: virus Guanarito
h: hora
HBV: virus de la hepatitis B
HCLE: línea celular de córnea humana

HCMV: citomegalovirus humano
HCV: virus de la hepatitis C
HEDS: Herpetic Eye Disease Study
HHV: herpesvirus humano
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
HPLC : cromatografía líquida de alta presión
HPV: papilomavirus humano
HSV: virus herpes simplex humano
HTLV: virus de las leucemias de células T del humano
HUVEC: células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano
ICP: proteínas de la célula infectada (proteínas de HSV)
IE: proteína inmediata temprana
IFI: inmunofluorescencia indirecta
IFN: interferón
I κ B: inhibidor kappa B
IKK: quinasa del I κ B
IL: interleuquina
iNOS : óxido nítrico sintasa inducible
INNTI: inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa
IRF: factores de regulación del interferón
JNK: c-Jun N-terminal kinase
JUNV: virus Junín
J774A.1: línea celular de macrófagos murinos
LAT: transcripto asociado a latencia
LB: Linfocito B
LPS: lipopolisacárido
LTC: linfocito T citotóxico
LTh: linfocito T colaborador (helper)
LUC: luciferasa
MA: meliacina
MACV: virus Machupo
MAPK: quinasas activadas por mitógenos
m.i. : multiplicidad de infección
MIP: proteína inflamatoria de macrófagos

MM : medio de mantenimiento
MMPs: metaloproteínasa de la matriz
MNK: quinasas de interacción con MAPK
MON: monensín
NEI: National Eye Institute
NF- κ B: factor nuclear kappa B
NHC: línea celular de conjuntiva humana
NK: células agresoras naturales (natural killers)
OMS : Organización Mundial de la Salud
ON : óxido nítrico
PAMPs : patrones asociados a patógenos
PBM: proteína básica de mielina
PBS : buffer fosfato salino
PCI : inhibidores de CDKs
PECAM: molécula de citoadhesión endotelial plaquetaria
PGE : prostaglandina
PGI: prostaciclina
p.i. : post infección
p.t.: post tratamiento
PK: proteína quinasa
PLA2: fosfolipasa A2
PMA: 13-acetato-forbol-12-miristato
PMN: célula polimorfonuclear
QH: queratitis estromal herpética
RRP: receptores de reconocimiento de patrones
SABV: virus Sabia
SARS: severe acute respiratory síndrome
SFB: suero fetal bovino
SIDA: síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
TEDDY: The Environmental Determinants of Diabetes in the Young
TG: ganglio trigémino
TGF- β : factor transformante del crecimiento beta
Tf: transferrina
TfR: receptor de la transferrina

TLR: receptor Toll-like
TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
TQ: timidino quinasa
TX: tromboxano
UFP: unidades formadoras de placas
URL: unidades relativas de luciferasa
UV: ultravioleta
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular
VIH: virus de la inmunodeficiencia humana
VLCM: virus de la coriomeningitis
VSV: virus de la estomatitis vesicular
VZV: virus varicela-zóster
WB: western blot
YFP: proteína amarilla fluorescente

INTRODUCCIÓN

1. Patogenia de las infecciones virales

La naturaleza intrínseca de los virus los convierte en parásitos intracelulares obligatorios ya que necesitan de la maquinaria celular y de sus procesos metabólicos para su replicación.

En la interacción del virus con la célula, algunos virus producen un daño directo capaz de dar lugar a la muerte celular debido al efecto citopático viral. La infección viral puede comprometer numerosas funciones celulares, como la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, el mantenimiento de la arquitectura del citoesqueleto o la conservación de la integridad de la membrana celular. La lesión de la membrana plasmática se puede producir por alteración de la permeabilidad o por la formación de sincicios. Los herpesvirus, el virus Sendai y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) forman sincicios celulares por la acción de las glicoproteínas de su superficie. Ciertos rotavirus atípicos son causales de gastroenteritis asociadas a la formación de sincicios gigantes en el epitelio de las vellosidades intestinales. Algunos virus producen daño celular a través de la inhibición de la síntesis de macromoléculas del hospedador, entre las cuales pueden mencionarse los picornavirus, herpesvirus y poxvirus (Tyler y Nothanson *et al*, 2001). La muerte celular también se puede producir por apoptosis inducida por el mismo virus, para favorecer la liberación y propagación viral, o por la célula hospedadora, como parte del mecanismo de defensa innata o natural para disminuir la carga viral y la diseminación del virus (Knipe *et al*, 2001).

Asimismo, algunos virus infectan células sin provocar su lisis. Así, por ejemplo, diversos arenavirus y ciertos retrovirus no son citopáticos. Las células pueden dividirse continuamente a pesar de la liberación permanente de la progenie viral. Por otro lado, puede producirse la transformación maligna de la célula (por ejemplo, con el retrovirus HTLV-1), por modificación del genoma de la célula hospedadora, o por desregulación del ciclo celular. Los virus oncogénicos pueden contener genoma ARN (retrovirus), o genoma ADN, tales como el virus del papiloma humano (HPV), el virus Epstein Barr (EBV), el virus de la Hepatitis B (HBV) y otros (Nevins *et al*, 2001; Azam y Koulaouzidis, 2008).

El desenlace de una infección viral en el organismo humano es variable, dado que puede ocurrir una infección subclínica o bien desarrollarse signos y síntomas inducidos por la alteración celular ocasionada por el virus y/o la respuesta del hospedador. La capacidad de un virus de producir enfermedad depende de una serie de factores tanto virales como del hospedador, como por ejemplo la dosis infectante, la ruta de entrada, la vía de diseminación, la edad, el estado nutricional e inmunitario, la carga genética del hospedador y su respuesta inespecífica y específica frente al agente (Tyler y Nathanson *et al*, 2001).

Así como en algunas infecciones virales es el efecto directo del virus el causante del desarrollo de la enfermedad produciendo una lesión directa en el tejido al cual infecta, en otras el daño lo produce la respuesta inmune del hospedador como respuesta a la presencia del virus. Es decir, que producen daño a través del desencadenamiento de una inmunopatología. En muchos casos, no existen vacunas para prevenir este tipo de patologías, y por tanto, las mismas son de difícil tratamiento.

La mayoría de los virus que producen enfermedad por efecto directo o por transformación de las células infectadas también poseen la capacidad de inducir una respuesta inmune que contribuye a la patología viral, es decir, que la enfermedad que causan es consecuencia de más de un mecanismo patogénico. El virus Ébola, el HBV, el EBV, el HSV (virus Herpes simplex) son ejemplos de ellos.

Algunos virus producen diferentes patologías según el tejido que infectan y el mecanismo de patogénesis que desencadenan. Por ejemplo, el HSV-1, además de producir lesiones ulcerosas en mucosas, desencadena una inmunopatología cuando el sitio de infección es el ojo. En este caso, la respuesta inflamatoria que se origina para eliminar el virus provoca daños irreversibles en la córnea que comprometen seriamente la visión (Carr *et al*, 2001; Deshpande *et al*, 2002; Wickham *et al*, 2004; Biswas y Rouse, 2005). Las características y mecanismos de esta inmunopatología serán abordados extensamente más adelante.

2. Mecanismos de la respuesta inmune a la infección viral

Para comprender la naturaleza de las inmunopatologías de origen viral, en primer lugar es indispensable conocer los diferentes mecanismos que se ponen en marcha frente a una infección viral.

Como resultado de la infección viral, la replicación del material genético y la síntesis de productos virales extraños para el hospedador activan diferentes mecanismos de inmunidad en el organismo infectado.

2.1. Respuesta inmune innata y adaptativa en las infecciones virales

La primera respuesta que se produce frente a la infección viral es la respuesta de inmunidad innata. Esta primera instancia de la respuesta inmune no sólo representa una barrera a la infección viral y a la diseminación del virus *per se*, sino que, además, los factores celulares y humorales involucrados en la respuesta innata son necesarios como inductores y colaboradores de la respuesta inmune adaptativa (Abbas *et al*, 2007).

El sistema inmunitario innato consta de barreras epiteliales y de células y proteínas circulantes que reconocen a los virus o a las sustancias producidas en las interacciones e inician los mecanismos necesarios para eliminarlos.

Las células del sistema inmune innato reconocen estructuras que son características de los virus y de otros patógenos microbianos, como las bacterias y hongos, y que no están presentes en las células de los mamíferos. Las diferentes respuestas inmunitarias innatas son específicas de dichas estructuras compartidas por determinadas clases de microorganismos. Los blancos microbianos de la inmunidad innata se han descrito como “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs), y son algunas proteínas virales, los ácidos nucleicos específicos de patógenos, como el ARN bicatenario que se encuentra en los virus en replicación, las secuencias no metiladas CpG de ADN, o el ARN monocatenario del genoma de algunos virus. Los receptores que se unen a estas estructuras conservadas se denominan “receptores de reconocimiento de patrones” (RRPs), que comprenden los receptores Toll-like

(RTL), entre otros (Medzhitov y Janeway, 2002; Pasare y Medzhitov, 2005). Las células activadas por la interacción de los RTL con los virus liberan citoquinas y quemoquinas que reclutan células inflamatorias hacia el sitio de infección, inician la inflamación y dan lugar a la respuesta innata.

Por otro lado, los RTL también están implicados en el desencadenamiento de muchos desórdenes inflamatorios crónicos, que si bien son iniciados por agentes infecciosos, son conducidos a cronicidad a través de un mecanismo dependiente de los RTL. Así es que los RTL están implicados en numerosas enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoidea, la psoriasis, la esclerosis múltiple y en varias enfermedades inflamatorias oculares, como por ejemplo las queratitis infecciosas (Chang *et al*, 2006).

Las superficies epiteliales intactas forman barreras físicas entre los virus del medio externo y los tejidos del hospedador, por lo que la pérdida de integridad del epitelio predispone habitualmente a la infección.

Además de las barreras epiteliales, en la respuesta inmune innata también participan los monocitos/macrófagos, las células dendríticas (CD), las células NK y los neutrófilos. En cuanto a la función que cumple cada tipo celular, las células NK producen la lisis y muerte de las células infectadas y son una fuente inmediata de interferón- γ (IFN- γ), que también desempeña un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune antiviral. Los macrófagos y las CD, llamadas genéricamente células presentadoras de antígenos (CPA), fagocitan y/o endocitan las partículas y antígenos virales. Éstos son degradados en los lisosomas celulares, y los péptidos son expresados en las membranas de las CPA, asociados a las proteínas del CMH-II, para ser presentados a los linfocitos LT helper (LTh). Las CD también presentan péptidos antigénicos asociados al CMH-I, derivados de la expresión endógena de las proteínas virales en éstas células (Gatti y Pierre *et al*, 2003; Iannello *et al*, 2006). Al interactuar con los patógenos a través de los RTL, los macrófagos y las CD se activan y como consecuencia producen citoquinas e incrementan la expresión de los CMH-II y de moléculas coestimuladoras. Por ejemplo, las CD se activan al interactuar los RTL-9 con CpG-ADN del HSV y

del citomegalovirus humano (HCMV) produciendo Interferón tipo I (INF-I), α y β , y en macrófagos y CD infectadas con HSV-1 e Influenza se induce la producción de IFN- α a través del reconocimiento del ARNsc por los RTL-7 y RTL-8 (Kumar *et al*, 2006).

La presentación de antígenos virales también ocurre en las membranas de las células infectadas. Casi todas las células del organismo expresan moléculas CMH-I y tienen la capacidad de presentar antígenos peptídicos asociados a estas moléculas. Cualquier célula en la que se esté sintetizando un antígeno viral podrá ser reconocida por los LT citotóxicos (LTc) (Abbas *et al*, 2007).

La activación de las proteínas del complemento es un proceso que también interviene en la respuesta innata contribuyendo a la fagocitosis de las partículas virales por medio de la opsonización de las mismas que, además, induce la activación de diferentes células inflamatorias como los neutrófilos y los mastocitos (Abbas *et al*, 2007).

Luego de la activación de la respuesta innata a la infección, y favorecida por ésta, se desarrollan los mecanismos de defensa inmunitarios específicos, celulares y humorales, los cuales constituyen la respuesta inmune adaptativa.

Entre los mecanismos involucrados en la respuesta inmune adaptativa mediada por células, la respuesta mediada por los LTc es una de las principales protagonistas. Cuando las células LTc reconocen antígenos virales asociados a las moléculas CMH-I de las CD o de las células infectadas, se produce la activación, la expansión clonal y la diferenciación de los LTc (Iannello *et al*, 2006). Los LTh, que reconocen antígenos presentados en moléculas CMH-II, producen citoquinas y mediadores inflamatorios que contribuyen a la diferenciación y activación de los LTc. Asimismo, los LTh también desempeñan un papel importante en la generación de los LT de memoria, esenciales para el desarrollo eficiente de futuras respuestas específicas contra el virus. Los efectos antivirales de los LTc son varios. Por un lado, liberan perforinas, citolisinas y algunas citoquinas que provocan la lisis de las células infectadas. También producen la estimulación dentro de la misma célula infectada de enzimas que degradan su propio ADN, desencadenando la

apoptosis. Finalmente, los LTc también son capaces de secretar citoquinas con actividad de interferón. (Iannello *et al*, 2006).

En la infección con el virus Influenza se detectan LTc activados dirigidos contra la mayoría de las proteínas virales, y principalmente, contra la nucleoproteína. Asimismo, en las infecciones con el virus respiratorio sincicial, sarampión, parotiditis, VIH y HCMV también se activan LTc que reconocen péptidos de antígenos virales. Existen múltiples evidencias experimentales que indican que los LTc que reaccionan con epitopes de la nucleocápside del HBV expresados por el CMH-I del hepatocito son responsables tanto de la lesión celular como de la limpieza viral en esas células. Otros estudios han demostrado que los LTc pueden reconocer epitopes de la proteína no estructural NS5 (ARN-polimerasa) del virus de la Hepatitis C (HCV) en asociación con CMH-I (Carballal y Oubiña, 1998; Fujinami *et al*, 2006; Guidotti *et al*, 2006).

Los linfocitos B (LB) forman parte de la respuesta inmune adaptativa, siendo las encargadas de la secreción de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser neutralizantes, es decir que se unen a proteínas de la envoltura o de la cápside viral, bloqueando así la unión del virus a los receptores de la membrana celular y la entrada del virus a la célula. Asimismo, mediante el proceso de opsonización, las inmunoglobulinas unidas a las partículas virales provocan la agregación de las mismas, facilitando su fagocitosis por parte de los macrófagos y demás células fagocíticas. Los anticuerpos que específicamente se unen a los antígenos virales expresados en la superficie de la célula infectada, desencadenan la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA). Estas inmunoglobulinas interactúan a través de su porción Fc con los receptores para el Fc de las células NK, activándolas y provocando la destrucción de la célula infectada. El fenómeno de CDDA representa un mecanismo significativamente importante de eliminación de las células infectadas, especialmente en los casos de las infecciones con el virus de la VIH y los herpesvirus (Ahmad y Menezes, 1996).

Si bien los anticuerpos participan de la eliminación del virus, en algunos casos la unión de un anticuerpo a la partícula viral aumenta la eficiencia de

entrada del virus a las células que tienen receptores para la región Fc de la inmunoglobulina en sus membranas plasmáticas, tal como ocurre en el caso del virus del dengue hemorrágico (Rodenhuis-Zybert *et al*, 2010).

Entonces, los virus que eventualmente invaden el torrente sanguíneo o linfático podrán perder su infectividad si el hospedador desarrolla una respuesta adecuada de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, en muchas ocasiones, sólo a través de mecanismos mediados por células se podrá erradicar la infección. La mayoría de los virus inducen una respuesta mixta humoral y celular. El grado de activación de cada una de ellas dependerá del virus en cuestión.

2.2. Factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune innata frente a infecciones virales

Cuando los virus son reconocidos por los RRP's se disparan señales intracelulares que originan cambios en la expresión génica celular para aumentar la expresión de moléculas efectoras y de adhesión (Ghosh *et al*, 1998; Zhang y Ghosh *et al*, 2001). Todos estos procesos dependen de la activación de varios factores de transcripción. Entre ellos, uno de los que reviste mayor importancia es el factor de translocación nuclear kappa B (NF- κ B), que cumple un papel esencial en el desencadenamiento de la respuesta inmune innata (Baeuerle y Henkel *et al*, 1994; Ghosh y Karin *et al*, 2002; Pomerantz y Baltimore, 2002). Cuando las células efectoras de la respuesta inmune innata reconocen productos virales por medio de los RTLs, se induce la activación del NF- κ B que lleva a la producción de citoquinas proinflamatorias, y a la activación de las CPAs. Las citoquinas tales como el TNF- α y la IL-6, liberadas luego de la inducción del NF- κ B, estimulan el reclutamiento de células inflamatorias en el sitio de la infección (Pomerantz y Baltimore, 2002). El NF- κ B no se encuentra sólo en las células inflamatorias, sino que además está presente en todos los tipos celulares.

El NF- κ B está compuesto por homo y heterodímeros de cinco miembros de la familia Rel, NF- κ B 1 (p50), NF- κ B 2 (p52), RelA (p65), RelB y c-Rel, que

contienen dominios de unión al ADN y dominios de dimerización (Baeuerle y Henkel, 1994; Ghosh *et al*, 1998; Pomerantz y Baltimore, 2002). El NF- κ B se encuentra inactivo en el citoplasma celular, anclado a su inhibidor, el I κ B. La llegada de un estímulo a las células, como por ejemplo la infección con numerosos tipos de virus, produce la activación del complejo quinasas específicas de I κ B, IKK. Estas quinasas fosforilan al inhibidor I κ B, lo cual lleva a su ubiquitinación y degradación vía proteosoma. La fosforilación y degradación del I κ B permiten al NF- κ B liberarse y migrar al núcleo celular, donde se une a secuencias consenso del ADN e induce la expresión de diversos genes, que además de estar involucrados en la inflamación y en la respuesta inmune, también están vinculados con la proliferación celular, la apoptosis, y la progresión del ciclo celular (Baeuerle y Henkel, 1994; Ghosh *et al*, 1998, 2002; Pomerantz y Baltimore, 2002; Yamamoto y Gaynor, 2004). La activación del NF- κ B ocurre muy rápidamente durante los primeros minutos de exposición al inductor y no requiere síntesis *de novo* de la proteína. En el caso de muchas infecciones virales, resulta en una estimulación transcripcional potente de numerosos genes virales y celulares (Hiscott *et al*, 2001). Los virus han desarrollado diferentes estrategias de modulación de la vía de activación del NF- κ B, para aumentar así la replicación viral, la supervivencia de la célula infectada y la evasión de la respuesta inmune. Incluso algunos virus explotan las propiedades anti apoptóticas del NF- κ B para evadir los mecanismos de defensa que limitan la replicación viral produciendo la muerte de la célula infectada (Hiscott *et al*, 2001). Durante la infección con HSV-1, por ejemplo, la transcripción del gen viral ICP0 induce la apoptosis de la célula infectada (Aubert *et al*, 1999; Sanfilippo *et al*, 2004; Sanfilippo y Blaho, 2006). Sin embargo, entre las 3 y las 6 horas post infección (p.i.) existe una “ventana de prevención” de la apoptosis durante la cual las proteínas celulares y virales bloquean el proceso de muerte celular programada (Aubert *et al*, 1999). El NF- κ B participa de este bloqueo de la apoptosis (Goodkin *et al*, 2003).

Si bien el NF- κ B es un factor de transcripción clave en la producción de citoquinas proinflamatorias, otros factores de transcripción también están involucrados en el desencadenamiento de la respuesta inmune. Al interactuar

productos microbianos con los RTLs también se activan las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) que finalmente inducen la translocación nuclear del factor de transcripción AP-1. Asimismo, los RTLs también pueden conducir a la activación de los factores de regulación del interferón (IRF). Todos estos factores de transcripción gatillan la producción de citoquinas proinflamatorias y de los IFN-I, el IFN- α y el IFN- β (Kumagai *et al*, 2008). En cuanto a los mecanismos intracelulares en la señalización de los RTLs se describió que tanto el IRF-3 como el IRF-7 se activan cuando las señales de los RTL se inician a nivel de los endosomas, mientras que la activación del NF- κ B o de las MAPK puede ser gatillada tanto en endosomas como en la membrana plasmática (Carty *et al*, 2010).

Por otro lado, recientemente se propusieron regulaciones post-transcripcionales como elementos claves en la regulación de las vías de señalización involucradas en la respuesta inmune, por ejemplo en la respuesta al TNF- α . El comportamiento de los genes expresados por la estimulación con TNF- α no puede ser explicada solamente en función de la inducción de la transcripción génica, dado que los genes también son regulados por el silenciamiento secundario a la inducción transcripcional y por la estabilidad intrínseca de los ARNm. Estos tres parámetros interactúan influyendo en la expresión génica de la respuesta inflamatoria al TNF- α (Hao *et al*, 2009). Resulta importante continuar estudiando las regulaciones post-transcripcionales para poder comprenderse la totalidad de la señalización intracelular implicada en la respuesta inmune (Kumagai *et al*, 2010).

3. Inmunopatologías virales

En muchas infecciones virales, el daño es una consecuencia de la respuesta inmune, dando lugar a lo que se conoce como inmunopatología. Para muchos virus no citopáticos la respuesta inmune es la principal causa de enfermedad (Abbas *et al*, 2007).

Los mecanismos inmunológicos que conducen a la aparición de daño en los órganos y tejidos se denominan *fenómenos de hipersensibilidad*. En las

infecciones virales, la hipersensibilidad participa de manera visible en la producción del daño. Algunas veces representa el mecanismo principal, en tanto que en otras sólo juega un papel menor pero que contribuye a la aparición de las lesiones. Además, algunos virus pueden provocar modificaciones inmunológicas que pueden llevar a la aparición de *fenómenos de autoinmunidad* (Carballal y Oubiña, 1998).

La infección del ratón causada por el virus de la coriomeningitis (VLCM) representa el prototipo de daño producido por mecanismos inmunológicos celulares. Su conocimiento es de interés, no solamente como modelo de inmunopatología, sino porque a la misma familia de virus pertenecen los virus Junín (JUNV), el Machupo (MACV), el Guanarito (GTOV), y el Sabia (SABV), agentes etiológico de fiebres hemorrágicas en América del Sur (Kunz, 2009). La infección de ratones inmunosuprimidos con el VLCM conduce a la persistencia viral, con replicación activa del virus sin producción de daño. Una situación completamente diferente ocurre cuando la infección con el VLCM se lleva a cabo en un animal inmunológicamente maduro y competente. En este caso, sobreviene una enfermedad letal, de corta duración, caracterizada por meningitis con encefalitis. Asimismo, la inmunosupresión inducida en un ratón adulto previene el daño celular pero no la infección. El mecanismo de daño se puede esquematizar de la siguiente manera: el virus infecta células meníngeas, pero no es citopático y no daña las células que infecta directamente. Pero el virus estimula el desarrollo de LTc específicos que matan las células meníngeas infectadas en un intento fisiológico por erradicar la infección. En los animales inmunocompetentes, se desarrolla una fuerte inmunidad celular a expensas de los LTc, que reconocen como extraños a los antígenos virales y destruyen las células infectadas por un mecanismo de citotoxicidad. Por otro lado, en este contexto, las células muertas, las células T CD8+ y las células inflamatorias (macrófagos) liberan citoquinas tales como el TNF- α , la linfotoxina y el óxido nítrico (ON), que pueden provocar la muerte no específica de las células vecinas no infectadas (Fujinami *et al*, 2006; Oldstone, 2006). Esta observación parece contradictoria a la situación usual, en el que los individuos

inmunodeficientes son más susceptibles a las enfermedades infecciosas que los individuos inmunocompetentes.

Las infecciones con el HBV y el HCV en humanos muestran algunas similitudes con la infección murina debida a VLCM. La replicación de los virus HBV y HCV no causa efecto citopático en los hepatocitos, siendo la respuesta inmune adaptativa la responsable de todos los daños hepáticos asociados a la hepatitis viral. Si bien la apoptosis es un proceso que permite la remoción de células sin causar inflamación, existen evidencias de que los hepatocitos apoptóticos secretan factores quimiotácticos que provocan el reclutamiento de leucocitos. Además, la fagocitosis de los hepatocitos apoptóticos por parte de las células de Kupffer, producen la estimulación de la secreción de citoquinas pro inflamatorias, y pro fibrogénicas que participan en el desarrollo de la fibrosis hepática (Canbay *et al*, 2003; Duffield *et al*, 2005; Takehara *et al*, 2004; Azam y Koulaouzidis, 2008). Asimismo, la hepatitis crónica está caracterizada por una respuesta de LTc ineficiente, incapaz de eliminar completamente al virus del hígado, lo que lleva a continuos ciclos sostenidos de destrucción celular. El daño hepático mediado por la respuesta inmune recurrente contribuye al desarrollo de un proceso necroinflamatorio crónico, que resulta en fibrosis hepática, cirrosis y hepatocarcinoma (Cooper y Nemerow, 1984; Burton *et al*, 2000; Kakimi *et al*, 2001; Guidotti y Chisari, 2006). Además, las infecciones provocadas por HBV y HCV están asociadas a una gran variedad de desórdenes extrahepáticos que presentan causas inmunológicas. Entre los órganos y tejidos afectados podemos mencionar el riñón, la piel, vasos sanguíneos y las articulaciones. Estas manifestaciones clínicas extrahepáticas están principalmente relacionadas a la deposición de inmunocomplejos circulantes en estos órganos, que activan el sistema de complemento y la secreción de citoquinas por parte de LT activados y macrófagos (Guidotti y Chisari, 2006).

El daño en el pulmón producido como consecuencia de la infección con el virus Influenza depende tanto del virus como de la respuesta inmune. El virus lisa las células que infecta, y por otro lado, la función citotóxica de los LTc específicos para el virus es matar las células infectadas. Sin embargo, y como

consecuencia de la lisis celular producida tanto por el virus como por el sistema inmune, se liberan factores que atraen una mayor cantidad de LT al sitio de infección, contribuyendo a la enfermedad respiratoria. Estos factores disparan señales para atraer más neutrófilos y macrófagos, potenciando el daño pulmonar. Además, las citoquinas y quemoquinas liberadas juegan un rol importante en causar las manifestaciones sistémicas, dando lugar a lo que se conoce como “tormenta de citoquinas”. La “tormenta de citoquinas” se ha documentado tanto en animales experimentales infectados con los virus influenza 1918/1919 A H1N1 y A H5N1 así como en humanos que fallecieron infectados con H5N1 (Marsolais *et al*, 2008).

Por otra parte, existen proteínas virales que contienen secuencias aminoacídicas que también están presentes en proteínas del hospedador. Entonces se ha postulado, que como consecuencia del “mimetismo molecular”, la inmunidad antiviral puede desencadenar una respuesta inmune contra antígenos propios (Fujinami *et al*, 2006).

Ejemplos de ello son la fosfoproteína del virus del sarampión y la proteína ICP6 fosforilada de HSV-1, que comparten epitopes con una proteína celular, la vimentina. La polimerasa del HBV comparte un epitope inmunogénico con la proteína básica de mielina (PBM). Se han propuesto numerosos virus tales como el parvovirus B19, HCMV, EBV y retrovirus como agentes o factores desencadenantes de enfermedades autoinmunes (Fujinami *et al*, 2006). Las infecciones por herpesvirus, en particular el EBV, se han relacionado con enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple o la artritis reumatoidea, a través del fenómeno de mimetismo molecular (Posnett *et al*, 2008).

La reactividad cruzada entre los virus y el hospedador es relativamente común. Sin embargo, la reactividad cruzada virus-hospedador debe ocurrir en un epitope “relacionado a enfermedad” para que una enfermedad autoinmune se establezca. Éstos son epitopes presentes en autoantígenos que pueden ser presentados en el CMH-II de las CPAs a las células Th autorreactivas. (Fujinami *et al*, 2006).

La activación no específica de células autorreactivas precebadas denominada “bystandard activation” es otro mecanismo que puede conducir a una enfermedad autoinmune. Las infecciones virales en un tejido determinado pueden llevar a la inducción de la inmunidad innata local que recluta leucocitos y resulta en la activación de las CPAs del tejido. Éstas, a su vez, expresan coestimuladores y secretan citoquinas que activan a los LT autorreactivos, que pueden desencadenar finalmente la enfermedad inmune.

La diabetes tipo 1 (DT1) ha sido asociada con numerosas infecciones virales, tales como las infecciones con enterovirus, rubeola, paperas, rotavirus y HCMV (van der Werf et al, 2007; Hober y Sauter, 2010; Jaidane *et al*, 2010). La DT1 es una enfermedad autoinmune que resulta de la destrucción de las células β productoras de insulina del páncreas por parte de los LT. Los resultados que se obtuvieron mediante estudios clínicos epidemiológicos y experimentales utilizando modelos animales de la DT1, indican que estos virus son capaces de modular el desarrollo de la DT1 a través de diversos mecanismos, dependiendo del tipo de virus implicado. Entre los mecanismos propuestos se incluye la lisis por el efecto citopático viral de las células β pancreáticas infectadas, la pérdida de tolerancia por alteración del balance de LT regulatorios y LT autorreactivos, el mimetismo molecular, y la activación no específica de LT autorreactivos precebados (van der Werf et al, 2007; Richer y Horwitz, 2009). A pesar de que muchos estudios epidemiológicos han demostrado una correlación entre la presentación clínica de la DT1 y la ocurrencia de una infección viral previa, la causalidad de la infección con la enfermedad no ha sido totalmente probada en humanos. Resulta difícil asociar la infección viral con el desarrollo de la DT1 dado que, probablemente, para precipitar la enfermedad en individuos genéticamente susceptibles tengan que ocurrir muchas infecciones con diferentes virus a lo largo de la vida. Actualmente, se está desarrollando un estudio multicéntrico prospectivo llamado TEDDY (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young) con el objetivo de identificar los factores genéticos y ambientales (incluyendo los virus) que están asociados a la inducción de la DT1 en chicos. Este estudio

probablemente permita identificar los agentes virales causantes de la DT1 humana (van der Werf et al, 2007)

La infección ocular debida al HSV-1 es otro ejemplo de una infección viral que da lugar a una inmunopatología. A pesar de que el HSV-1 es un virus altamente citolítico, usualmente está ausente en el ojo durante el desarrollo de la enfermedad clínica. La enfermedad que se origina se denomina Queratitis Estromal Herpética (QH) y se produce como consecuencia de la respuesta inflamatoria a la infección viral. Esta respuesta que en principio se genera con el objeto de eliminar al virus del sitio de la infección, más tarde ocasiona serios daños en la córnea infectada provocando dificultades en la visión y hasta incluso ceguera (Biswas y Rouse, 2005).

Habida cuenta de los ejemplos presentados en los cuales el virus no es el único factor que produce daño celular y dado que la respuesta inmune actúa en detrimento del hospedador, resulta de vital importancia el tratamiento no sólo de la infección viral, sino también de la patología inflamatoria o inmunopatología que ésta origina.

4. Herpesvirus de relevancia para la salud humana. HSV-1

Los herpesvirus humanos están extensamente distribuidos en la población y son una de las causas más frecuente de infecciones virales en el mundo. Hasta hoy se han aislado ocho herpesvirus humanos, que incluyen los virus HSV-1 y HSV-2, el virus varicela-zóster (VZV), HCMV, EBV y los herpesvirus humanos 6, 7 y 8 (HHV-6, 7 y 8). Una característica común a todos ellos es su capacidad para establecer infecciones latentes luego de la infección primaria, y de reactivarse intermitentemente, en particular en aquellos individuos que poseen el sistema inmune seriamente comprometido (Villarreal, 2001; Rawls y Campione-Piccardo, 1981).

Así como todos los demás herpesvirus, el HSV-1 está ampliamente diseminado en la población humana, y ésta es el único reservorio natural de dicho virus. Aproximadamente el 70-80% de la población humana adulta es seropositiva para HSV-1, por lo que se deduce que éste es un patógeno

exitoso (Looker *et al*, 2005; Dolar *et al*, 2006; Smith *et al*, 2006; Papadogeorgakis *et al*, 2008; Arama *et al*, 2010; Horowitz *et al*, 2010; Young *et al*, 2010).

Al igual que en la mayoría de las infecciones con herpesvirus, el HSV-1 no representa una complicación para los pacientes inmunocompetentes, dado que muchas de las infecciones con este virus son autolimitadas y las lesiones originadas por la infección se recuperan sin complicaciones (Biswas y Rouse, 2005; Villarreal, 2001). Sin embargo, éste puede causar una gran variedad de desórdenes, como enfermedades gastrointestinales, esofágicas, y el 25% de todos los herpes genitales. Asimismo, el HSV-1 es el principal agente causante de encefalitis viral en los Estados Unidos en individuos inmunocompetentes ya que representa entre el 10-20% de todos los casos reportados, con aproximadamente 2000 nuevos casos por año. La encefalitis herpética se caracteriza por una severa destrucción de los lóbulos temporales y frontales debido a una necrosis celular y a un proceso inflamatorio provocado por la replicación del virus. La mortalidad alcanza al 70% de los casos sin terapia antiviral, mientras que con terapia antiviral el 20% de los pacientes mueren. El alto índice de mortalidad descrito en pacientes con terapia antiviral está vinculado a la reactivación del virus luego del tratamiento, lo que dificulta la terapéutica de esta enfermedad (Perng y Jones, 2009).

En los individuos inmunosuprimidos infectados con HSV-1 se pueden desarrollar enfermedades severas que amenazan la vida, y por lo tanto requieren pronto tratamiento antiviral (De Clercq, 1997, 2010; Onunu y Uhumwangho, 2004; Didkovskii *et al*, 2007).

4.1. Patologías oculares debidas a la infección con HSV-1. Queratitis herpéticas

Cuando el ojo se convierte en el sitio de infección del HSV-1 puede desencadenarse la inmunopatología de la QH, que provoca severas dificultades en la visión. La QH se desarrolla sólo en el 2% de las primoinfecciones con HSV-1, pero representa el 60% de los casos en los que

ocurren reactivaciones (Knickelbein *et al*, 2009). Debido a estos episodios de recurrencias, la enfermedad conduce a la ceguera, siendo la principal causa de ceguera infecciosa en países desarrollados (Biswas y Rouse, 2005). Se ha estimado que en Estados Unidos 400.000 personas están afectadas y que ocurren 50.000 casos nuevos de QH por año. (Knickelbein *et al*, 2009).

Cuando el HSV-1 alcanza la superficie ocular queda inicialmente suspendido en la película lacrimal y se enfrenta tanto al continuo lavado de la superficie por las lágrimas como a un número de sustancias, principalmente proteicas, con actividad antiviral, tales como lisozima, inmunoglobulina A, complemento, lactato dehidrogenasa, amilasa y peroxidasa, entre otras. Los IFNs, particularmente α y β , también se hallan en las lágrimas durante la infección viral. Si bien esta primera línea de defensa es efectiva, no constituye una barrera impenetrable (Carr *et al*, 2001).

La capa más externa de la córnea está compuesta por células epiteliales terminales, sin capacidad de división, que están siendo constantemente eliminadas en las lágrimas y reemplazadas por células de capas inferiores a ellas. El epitelio intacto es una efectiva barrera física frente a la infección por virus. Por otro lado, debido a su alto grado de diferenciación y a su incapacidad de división, estas células son pobres hospedadores para la multiplicación viral, ya que el HSV-1 replica mejor en células metabólicamente activas (Klyce y Beuerman, 1998; Schang *et al*, 1998, 2000).

Aún en presencia de un amplio espectro de defensas físicas, mecánicas y bioquímicas que limitarían la infección viral, el HSV-1 puede establecer una infección en la capa epitelial de la córnea, siempre y cuando el virus logre atravesar la barrera de las células más superficiales e infectar las células subyacentes que están metabólicamente activas (Carr *et al*, 2001, Deshpande *et al*, 2004).

La infección aguda, en la que se produce el daño y destrucción epitelial, es autolimitada, y se resuelve dentro de los 7 a 10 días de iniciada la infección (Klyce y Beuerman, 1998). Durante esta infección inicial, el virus ingresa en la terminal nerviosa del epitelio de la córnea y es transportado vía retrógrada hacia el ganglio trigémino (TG) donde logra replicar y lisar las células

infectadas o bien entrar en latencia indefinidamente (Enquist *et al*, 1998, Shimeld *et al*, 2001, Wagner y Bloom, 1997).

La latencia puede ser interrumpida en respuesta a una variedad de estímulos (stress, drogas inmunosupresoras, radiación UV), y cuando esto ocurre, el virus reingresa en el ciclo productivo. La progenie viral es transportada vía anterógrada a través del nervio hacia el sitio inicial de infección, donde se produce la recurrencia de la lesión. Puede ocurrir que la puerta de entrada no sea el ojo, y luego se produzca el transporte del virus desde la neurona al ojo. Dicha recurrencia puede ser subclínica o clínica, y dar origen a lesiones secundarias en el epitelio ocular o causar una reacción inflamatoria crónica en el estroma subyacente (Biswas y Rouse, 2005).

Las lesiones ulcerosas causadas por la replicación viral activa durante la infección aguda, ya sea primaria o recurrente, constituyen la queratitis epitelial herpética (Wickham y Carr, 2004). En cambio, cuando la enfermedad es la QH, se produce un síndrome inmunoinflamatorio crónico caracterizado por la ulceración, la aparición de un denso infiltrado inflamatorio y la necrosis en el estroma de la córnea, con o sin daño epitelial visible (Carr *et al*, 2001; Claoue *et al*, 1988; Streilein *et al*, 1997; Wickham y Carr, 2004).

Se supone que los ciclos de reactivación de HSV-1 desde neuronas infectadas, acompañado por el transporte axonal a la córnea, conduce a infecciones recurrentes y al daño en la córnea. (Shimeld *et al*, 2001). Sin embargo, no necesariamente la recurrencia depende del transporte anterógrado desde células neuronales, sino que puede haber una recurrencia local desde las mismas células de la córnea. Hay evidencia sustancial que indica que el HSV-1 puede persistir tanto como virus infectivo como en un estado latente por largos períodos dentro de las células de córnea (Kaye *et al*, 2006). En lágrimas humanas y en córneas removidas para trasplante se encuentra ADN viral e infectividad. Además, el virus infeccioso puede causar daño a las córneas durante el almacenamiento o ser transmitido al que recibe el trasplante. De forma similar, en ratones y conejos se detectó genoma de HSV en las córneas mucho tiempo después de ocurrida la infección aguda. Asimismo, se construyó un HSV US9⁻ mutante que replica normalmente en las

células de córnea pero es incapaz de retornar a la córnea desde ganglios sensoriales, dado que la proteína US9 participa en el movimiento de las glicoproteínas virales en dirección al terminal axonal. Este HSV-1 mutante introducido en la córnea de ojos de ratón es capaz de causar QH. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la QH puede ser provocada por HSV latente en la córnea (Polcicova *et al*, 2005; Kaye *et al*, 2006).

4.2. Mecanismos patogénicos durante la QH

La QH humana puede ser reproducida mediante el modelo de infección ocular con HSV-1 en ratones. En dicho modelo, la primoinfección de la córnea inicia una serie de eventos que culminan, al cabo de una o dos semanas, en una patología histológicamente similar a la QH humana (Liu *et al*, 1996). Más aún, el modelo semeja generalmente muchas características de la enfermedad recidivante en humanos, tanto en la duración de la diseminación viral como en los efectos de las drogas antivirales (Hendricks *et al*, 1997).

Mediante el uso del modelo de infección ocular en el ratón se ha logrado avanzar en el estudio de los mecanismos patogénicos que se desarrollan en el curso de la enfermedad, así como también en los eventos tempranos previos al desarrollo de las lesiones, y que preparan el escenario para la patología subsecuente. Estos eventos incluyen la replicación viral, la producción de ciertas citoquinas y la neovascularización de la córnea, que facilita la llegada de las células inflamatorias responsables de la inmunopatología (Biswas y Rouse, 2005).

Así, se sabe que la infección de la córnea con HSV-1 induce la expresión de diferentes proteínas asociadas con la respuesta inflamatoria. En estas células se expresan constitutiva o induciblemente varios RTLs, como el RTL-2, 3, 4, 5, 7 y el 9, que interactúan con diversos PAMPs virales, tales como el ARNsc o los motivos CpG del ADN del HSV-1 (Kumar *et al*, 2006). La activación de estos receptores conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias, siendo las predominantes la IL-1 β , la IL-6 y los IFNs tipo I (α y β) (Figura 1). La IL-1 β inducida por HSV-1 estimula la producción local de IL-6

en las células de la córnea. La IL-6, a su vez, estimula la afluencia de células polimorfonucleares (PMN), más específicamente neutrófilos, hacia el tejido estromal, ya sea por sí sola o por inducción de la secreción de una quemoquina, la proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2) (Figura 1). Todos estos sucesos le otorgan tanto a la IL-1 como a la IL-6 una función central en el desencadenamiento de la cascada inflamatoria (Staats y Lausch, 1993; Yan *et al*, 1998; Fenton *et al*, 2002).

El TNF- α es otra de las citoquinas que se inducen durante la infección ocular con el HSV-1. Su presencia está asociada con la eliminación de las partículas virales, pero también con la inducción de quemoquinas tales como la IL-8 (Minagawa *et al*, 2004, Wuest y Carr, 2008) (Figura 1).

La IL-1 también estimula la producción de ciclooxigenasa-2 (COX-2) en el estroma de la córnea, un factor adicional que podría atraer a los PMNs (Figura 1).

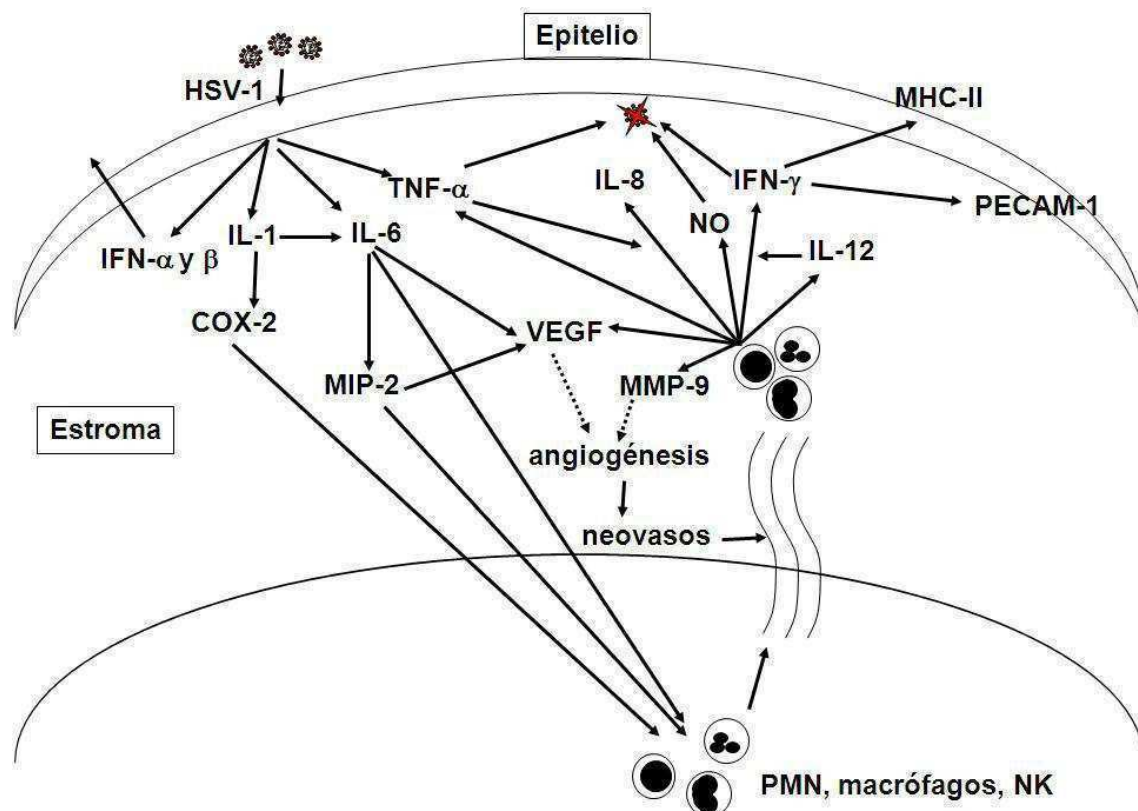


Figura 1 Representación esquemática de algunos eventos tempranos durante la patogénesis de la QH. Tomado de Biswas y Rouse, 2005, con modificaciones.

Las células epiteliales infectadas serían las posibles fuentes de quemoquinas, aunque las células de córnea residentes y las células inflamatorias expuestas a péptidos virales, expresados en las células infectadas con HSV-1, también podrían ser posibles fuentes de quemoquinas (Thomas *et al*, 1998; Biswas y Rouse, 2005). Si bien aún no se conoce el modo en que las células no infectadas son estimuladas para secretar quemoquinas y citoquinas, es posible que la inducción se produzca a través de la interacción de los RTL de dichas células con los PAMPs expresados en las células infectadas (Biswas y Rouse, 2005).

Una característica notable de la inmunopatología inducida por HSV-1 es la neovascularización de la córnea, proceso necesario para la patogénesis de la QH. Mientras que la córnea normal es avascular, en la QH surgen nuevos vasos sanguíneos desde los vasos linfáticos en el día 1 p.i., llegando hasta el centro de la córnea alrededor del día 20 p.i.. Las células inflamatorias llegan hasta la córnea a través de estos neovasos altamente permeables, produciendo opacidad corneal y deterioro de la visión (Zheng *et al*, 2001a, 2001b).

Dado que la angiogénesis es necesaria para el ingreso de las células inflamatorias que van a desarrollar la QH, representa uno de los pasos más importantes en la patogénesis de la QH, y muchas moléculas están involucradas en este proceso. Aparentemente, el HSV-1 no codifica para proteínas que actuarían directamente como factores angiogénicos, por lo cual el fenómeno de angiogénesis que ocurre en la córnea infectada con HSV-1 estaría asociado a una cascada de citoquinas o a otros procesos parácrinos (Biswas y Rouse, 2005). De hecho, la infección con HSV-1 es seguida por la expresión de diversos factores angiogénicos en la córnea, entre ellos, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), producido por los macrófagos y las células del epitelio de la córnea (Li *et al*, 2001; Zheng *et al*, 2001a; Lee *et al*, 2002b) (Figura 1).

Los transcritos de VEGF se detectan en la córnea a partir de las 12 h p.i., y la proteína, a las 24 h p.i.. A medida que llegan las células inflamatorias a la zona afectada, éstas se convierten en una fuente de VEGF adicional, siendo

los macrófagos las principales células inflamatorias productoras de VEGF. Vale la pena destacar que la IL-6 es un potente estimulador de la producción del VEGF, así como también el ADN viral, rico en motivos CpG. Inmediatamente después de la infección, las células de la córnea no infectadas son las principales productoras de VEGF. La IL-6 producida por las células corneales infectadas estimulan a las células residentes corneales no infectadas y a los macrófagos a secretar VEGF en una forma parácrina. En consecuencia, la IL-6 producida por las células infectadas es el inductor más importante de la producción del VEGF y de la neovascularización de la córnea en la QH (Biswas *et al*, 2006).

Dentro de las 18 h p.i. comienza la invasión del tejido estromal subyacente al epitelio infectado, por parte de un prominente infiltrado, principalmente de PMNs, y también macrófagos, linfocitos y células NK, favorecida por la aparición de los neovasos (Figuras 1 y 2). La llegada del infiltrado celular presenta un máximo a las 48 h p.i., y declina entre el día 5 p.i. y 7 p.i. (Figura 2). Este evento tiene lugar de manera simultánea a la detección de partículas virales infectivas en el ojo (Babu *et al*, 1996; Tumpey *et al*, 1996; Kaufman *et al*, 1998; Thomas *et al*, 1998) (Figura 2).

Si bien la reacción inflamatoria aparece una vez que se ha limitado la infección viral, es necesaria la replicación viral en la córnea, por lo menos durante 2 días, para inducir la QH. Aparentemente, el virus replicativo es necesario para disparar los sucesos tempranos que dejarán el estroma de la córnea en las condiciones que disparan la migración de las células inflamatorias hacia este tejido (Deshpande *et al*, 2001; Biswas y Rouse, 2005).

Aún no se ha dilucidado la manera en la cual los PMNs que se localizan en el estroma de la córnea pueden eliminar el virus que se encuentra predominantemente en el epitelio. Una posibilidad sería que lo hicieran mediante la producción de TNF- α , ON y metabolitos reactivos del oxígeno (Daheshia *et al*, 1998) (Figura 1).

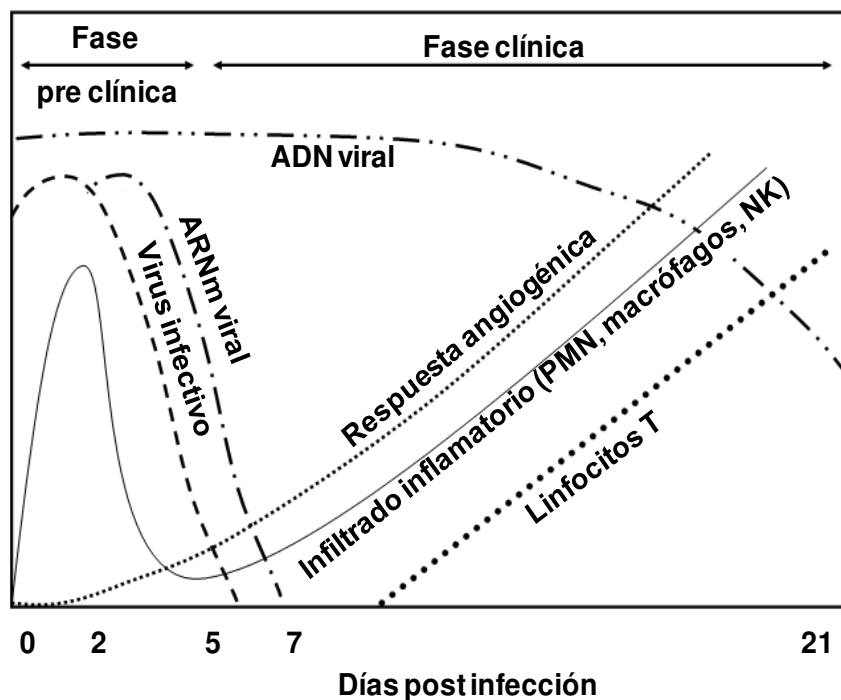


Figura 2. Cronología de la evolución de los eventos durante la patogénesis de la QH. Tomada de Biswas y Rouse, 2005.

Esta primera fase corresponde a la respuesta innata a la infección viral ya sea primaria o recurrente y, si bien es necesaria para la eliminación de las partículas virales infectivas, contribuye al posterior desarrollo de las lesiones en el estroma de la córnea. Los factores liberados durante la degranulación de los PMNs y macrófagos, entre ellos el ON, provocan una importante destrucción tisular, con el posible desenmascaramiento de autoantígenos de la córnea (Carr *et al*, 2001, Biswas y Rouse, 2005). Por otro lado, los PMNs contribuyen a la amplificación de la cascada inflamatoria con la secreción de las citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-8 e IL-12). La IL-12 estimula la producción de IFN- γ en las células NK, macrófagos y neutrófilos (Figura1) (Biswas y Rouse, 2005; Daheshia *et al*, 1998). El IFN- γ , a su vez, cumpliría un papel en el procesamiento de antígenos, estimulando la expresión de moléculas CMH-II en las CPA involucradas en la inducción de células Th específicas y, además, favorecería la llegada de PMNs al estroma de la córnea, induciendo la expresión de moléculas de citoadhesión endotelial plaquetaria-1 (PECAM-1) en las células del endotelio vascular (Tang y Hendricks, 1996; Mester y Rouse,

1991) (Figura 1). Por otro lado, el IFN- γ ayudaría a modular el desarrollo de la lesión ya que induce también quemoquinas angiostáticas como la IP-10 (Lee *et al*, 2002a).

A partir del cuarto día p.i. también se observa un aumento de la IL-10. Esta citoquina posee propiedades antiinflamatorias y su presencia en la córnea se ha demostrado particularmente durante la resolución de la QH (Babu *et al*, 1995; Stumpf *et al*, 2002).

Luego de los procesos tempranos que llevan al bloqueo de la replicación viral y a la remoción de los antígenos virales del ojo, descritos anteriormente, los linfocitos y otras células inflamatorias, incluidos los neutrófilos y los macrófagos, invaden el estroma de la córnea produciendo la QH clínicamente evidente. El proceso comienza entre los días 6 y 9 p.i. y alcanza un máximo de respuesta celular alrededor de las 2 a 3 semanas p.i. (Figura 2). Esta fase de la QH está dirigida por los LTh, y la función inflamatoria de estas células puede ser modulada por los LT regulatorios que ejercen funciones moduladoras a través de la supresión de la función de las células T proinflamatorias (Deshpande *et al*, 2002; Rouse *et al*, 2006; Suvas *et al*, 2004).

Dado que la replicación viral ocurre en la córnea hasta alrededor del día 4 p.i. (Figura 2), y que durante la progresión de las lesiones en la córnea no es posible detectar virus replicativo ni proteínas virales, es difícil asumir que la inducción de las células Th se deba a una activación específica contra el HSV-1 (Babu *et al*, 1996, Thomas *et al*, 1997). Existen dos teorías acerca del desarrollo de la QH desencadenada por las células Th: la teoría del mimetismo molecular y la de la activación inespecífica de las células T (“bystander activation”).

La primera teoría se basa en la existencia de una proteína viral, la UL6, que estaría siendo reconocida por un mismo clon de células T capaz de reconocer o reaccionar con un péptido de la córnea (Zhao *et al*, 1998).

De acuerdo con la segunda teoría, las células Th que ingresan a la córnea favorecidas por la angiogénesis y en respuesta a la señal de quemoquinas, se activarían por la estimulación continua de las células por parte de citoquinas y quemoquinas proinflamatorias liberadas durante la

primera etapa de la respuesta inflamatoria (Deshpande *et al*, 2001; Gangappa *et al*, 2000).

Sin embargo, es posible que una baja cantidad de antígenos virales alcance el estroma desde el epitelio. En efecto, es posible detectar bajos niveles del genoma de HSV en el estroma murino. Sin embargo, la infección con HSV compromete la membrana basal de manera que los antígenos virales y la infección se diseminan hacia el estroma. Alternativamente, las CPA pueden adquirir antígenos virales en el epitelio, trasladarlos al estroma y promover la inflamación allí (Polcicova *et al*, 2005)

La QH es, entonces, una inmunopatología de origen viral en la cual las lesiones que se observan no son originadas por la multiplicación viral en sí, sino como consecuencia de la neovascularización y de la respuesta inflamatoria disparada por la replicación viral, y que se evidencia cuando ya el virus no está presente en el ojo. El lapso entre la infección viral y la QH reflejan el tiempo requerido para sobrepasar los mecanismos inmunitarios del hospedador en el estroma (Polcicova *et al*, 2005).

5. Antivirales

Los antivirales son sustancias utilizadas para el tratamiento de las infecciones virales y actúan afectando alguna de las etapas del ciclo replicativo viral.

5.1. Mecanismo de acción de los antivirales

Con el objeto de asegurar selectividad y evitar toxicidad, la elección de los blancos moleculares para el desarrollo de antivirales se ha basado históricamente en la búsqueda de aquellos pasos o enzimas del ciclo de replicación viral específicos del virus, para que la droga actúe selectivamente sobre el ciclo de vida del agente infeccioso. Es decir, que los antivirales convencionales se han diseñado con blancos virales interfiriendo selectivamente en procesos virales. Estas drogas alteran pasos bioquímicos

esenciales para la replicación del virus desde la adsorción a receptores específicos hasta cualquiera de los eventos que culminan con la liberación de nuevos viriones.

La casi totalidad de los antivirales actualmente aprobados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para su uso actúan sobre un blanco molecular viral, en su mayoría a nivel de la expresión génica o de la replicación del genoma viral (Müller y Kräusslich, 2009).

El número de los agentes antivirales autorizados por la OMS para su uso es bajo debido a diferentes razones. Una de ellas es que si bien los virus poseen enzimas que le son propias y diferentes de las celulares, al ser parásitos intracelulares obligados, invaden la célula y utilizan muchos de sus mecanismos bioquímicos para fabricar nuevo material genético y proteínas virales. De este modo, ofrecen menos características bioquímicas propias que puedan ser el blanco de drogas que actúen selectivamente sin afectar el metabolismo celular, evitando así efectos tóxicos no deseados. Por otro lado, algunos virus de importancia sanitaria son difíciles de cultivar en condiciones *in vitro*, e incluso, en la mayoría de los casos no se dispone de modelos animales que reproduzcan la enfermedad humana, dificultando la investigación y el desarrollo de compuestos antivirales contra estos virus.

Asimismo, muchas de las infecciones causadas por virus son benignas, limitadas y de corta duración. Además, no siempre la sintomatología indica con certeza de qué virus se trata y teniendo en cuenta las diferencias en el modo de replicación, se debe identificar primero al virus para luego elegir el antiviral apropiado. En consecuencia, se requiere, por un lado, que el índice terapéutico (eficacia/toxicidad) sea extremadamente alto para que la terapia se justifique, y por el otro, se necesita un diagnóstico virológico rápido para que el antiviral se administre en el momento indicado y la terapia resulte efectiva. En muchas de las infecciones virales el pico de replicación viral precede a la sintomatología, por lo que cuando se diagnostica la infección viral, la aplicación de una terapia antiviral ya no tiene sentido clínico.

Sin embargo, en las últimas décadas se ha producido un aumento en el número de pacientes inmunocomprometidos como resultado de la expansión

de los trasplantes de órganos, los regímenes de quimioterapias más agresivos y la incidencia cada vez más alta de individuos con síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causada por la infección con el VIH. Este incremento en el número de pacientes inmunocomprometidos ha llevado al aumento en la utilización de drogas antivirales con la consiguiente aparición de resistencia a la mayoría de las drogas en uso (Ziyaeyan *et al*, 2007; McMahon *et al*, 2008).

Además, para algunas enfermedades virales el tratamiento antiviral disponible actualmente sólo es efectivo en una baja proporción de pacientes y/o presentan efectos adversos severos, tal como el tratamiento de la HCV que emplea interferones y la rivabirina (Gao *et al*, 2010).

Se han desarrollado vacunas para la prevención de varias infecciones virales severas, tales como la poliomelitis, el sarampión, la parotiditis, la rubéola, la HBV, la HAV, la fiebre amarilla y la fiebre hemorrágica argentina, entre otras. Las vacunas que previenen estas infecciones están incluidas en el programa regular del calendario nacional de vacunación. Sin embargo, existe una gran dificultad para la obtención de vacunas efectivas contra virus tales como el VIH, HSV y HCV.

En consecuencia, se hace necesaria una continua e intensa búsqueda de nuevas moléculas naturales y sintéticas con actividad antiviral. Y la estrategia más adecuada debería estar dirigida principalmente a la obtención de moléculas que ejerzan su efecto antiviral a través de la acción sobre blancos moleculares diferentes a los que están dirigidos las drogas actualmente en uso (Müller y Kräusslich, 2009).

5.2. Proteínas celulares como blanco de los antivirales

Si bien predomina la idea de dirigir el diseño de nuevos antivirales hacia blancos moleculares virales para asegurar la selectividad y también disminuir la toxicidad, hace años que se ha comenzado a considerar a las proteínas celulares esenciales para la replicación viral como nuevos blancos de ataque. Es sabido que los antivirales convencionales son activos contra un rango

estrecho de virus. Además, los genes virales que codifican para las proteínas blanco de estas drogas mutan espontáneamente, generando virus resistentes que emergen frente a la presión de selección ejercida por los mismos antivirales (Coen y Schaffer, 2003). En cambio, los antivirales dirigidos contra proteínas específicas celulares serían activos frente a un amplio rango de virus que requiriesen esas proteínas para replicar. Tampoco se seleccionarían mutantes resistentes a estas drogas, ya que los blancos serían productos génicos celulares. Más aún, estas drogas podrían ser activas contra las mutantes resistentes a los antivirales convencionales (Coen y Schaffer, 2003).

Si bien se ha visto que a partir de la aplicación de muchas drogas que presentan como blanco un componente celular del hospedador no emergen mutantes resistentes, se han reportado excepciones, como por ejemplo para la droga Brefeldina A que bloquea una enzima celular inhibiendo la multiplicación de poliovirus (Crotty *et al*, 2004).

El aspecto negativo de los antivirales con blancos celulares es que podrían resultar citotóxicos o exhibir otros efectos no deseados (Coen y Schaffer, 2003). Sin embargo, una plétora de compuestos comúnmente usados como drogas terapéuticas humanas presentan un blanco celular y no exhiben efectos tóxicos.

Recientemente, la “Food and Drug Administration” (FDA) aprobó la droga Maraviroc, el primer antiretroviral que bloquea un correceptor celular (CCR5) que el virus VIH utiliza para su entrada a la célula (Kuritzkes *et al*, 2009). Además, se están desarrollando antagonistas de otros correceptores del virus VIH, tal como el CXCR4, así como del receptor CD4 (Müller y Kräusslich, 2009).

Hay otros dos antivirales que actúan sobre blancos celulares aprobados: el INF para el tratamiento de la HBV y la HCV, y el imiquimod, para el tratamiento de los papilomavirus. EL INF induce la activación de proteínas de defensa celular promoviendo un “estado antiviral” e impidiendo la expresión y replicación del genoma viral. El imiquimod es un inmunomodulador que induce la síntesis de citoquinas celulares, tales como el TNF- α , la IL-1, la IL-6 y los

INF, y se postula como estimulador del sistema inmune a través de la activación del RTL-7 (Zagon *et al*, 2008).

Por otra parte, el Debio025, un inhibidor de la ciclofilina A con una potente actividad anti-HCV *in vitro*, está bajo evaluación clínica. Este análogo sintético de ciclosporina sin capacidad inmunosupresora también presenta actividad anti-VIH (Coelmont *et al*, 2009).

Recientemente se ha publicado la existencia de una pequeña molécula, llamada LJ001, que inhibe la infección de un amplio rango de virus envueltos que comprende filovirus, virus influenza A, arenavirus (Junín), bunyavirus, flavivirus, paramyxoviruses, retrovirus (VIH-1), rhabdovirus y poxvirus. LJ001 inhibe este amplio espectro de virus porque presenta como blanco un elemento común a todos: la envoltura viral. Este compuesto bloquea la infección insertándose en la membrana viral e inhibiendo la entrada a la célula (Wolf *et al*, 2010). LJ001 no es tóxico para las células: una explicación es que el compuesto daña tanto las membranas celulares como virales, pero la primera puede ser reparada, mientras que las virales son estáticas y el daño producido por el compuesto altera su correcta funcionalidad (Wolf *et al*, 2010).

Aunque la mayoría de los virus utilizan la maquinaria de transcripción y traducción celular, su inhibición es, en teoría, dificultosa debido a los potenciales efectos adversos. Sin embargo, actualmente se utiliza la rivabirina como antiviral, que presenta como blanco de acción la transcripción celular. Se supone que la actividad antiviral es, en parte, debida a la inhibición de la maquinaria celular de “capping” de ARNs y de la ARN polimerasa. Sin embargo, también se discuten otros mecanismos de acción para la ribavirina, como por ejemplo la inmunomodulación, la incorporación en el ácido nucleico viral provocando mutaciones y la reducción del GTP celular. Si bien es usada en infecciones severas causadas por el virus sincicial respiratorio y en terapias combinadas con IFN frente a infecciones de HCV dicha droga está asociada a una baja eficacia clínica y a numerosos efectos adversos.

Por otro lado, muchas de las patologías inducidas por virus son provocadas por el sistema inmune del hospedador, por lo cual los factores celulares que intervienen colaborando con la inmunopatogénesis viral

constituyen un blanco de acción atractivo y ofrecen la perspectiva de nuevas estrategias para combatir las infecciones virales. Por ejemplo, se ha propuesto el uso de un compuesto inmunomodulador análogo de esfingosina AAL-R para el tratamiento del virus Influenza. La administración local de AAL-R en el tracto respiratorio de ratones C57BL/6 infectados redujo la respuesta T anti-influenza mediante la inhibición de la secreción de citoquinas y quemoquinas, sin alterar el nivel de anticuerpos neutralizantes. El tratamiento con la droga limitó el daño pulmonar sin aumentar el título viral, modulando así la respuesta inmune desencadenada por el virus (Marsolais *et al*, 2008).

El IFN exhibe propiedades inmunomoduladoras además de una actividad antiviral de amplio espectro. Dado que estimula el sistema inmune, la administración del IFN ha sido empleada en el tratamiento de diferentes inmunopatologías virales. Como se mencionó anteriormente, el IFN se utiliza actualmente en el tratamiento de las infecciones provocadas por los virus HCV y HBV. Además, durante el brote del “severe acute respiratory síndrome” (SARS) en el 2002-2003, muchos de los pacientes se trataron con IFN aunque todavía no está claro si el tratamiento resultó en un beneficio clínico (Stockman *et al*, 2006).

La interacción del virus con la célula suele provocar la activación de vías de señalización intracelular involucradas en la respuesta antiviral y/o inmune del hospedador. Muchas de estas cascadas de señales son explotadas por los virus para favorecer su replicación, razón por la cual las moléculas involucradas pueden ser blancos potenciales de compuestos con actividad antiviral. La replicación del virus Influenza es afectada por la inhibición de la vía de señalización Raf/MEK/Erk, dado que tanto en células que expresan proteínas mutadas de Raf y Erk, como en células tratadas con un inhibidor de MEK, la droga U0126, el título viral se redujo significativamente (Ludwig *et al*, 2004, 2006). El Resveratrol, un polifenol natural presente en uvas y nueces, con conocidos efectos antioxidantes, antiinflamatorios, quimiopreventivos en algunos modelos experimentales de cáncer, también inhibe la replicación de HSV-1 por un mecanismo diferente al de los antivirales convencionales. Si bien el resveratrol es considerado un antiviral, actúa bloqueando la activación del

NF- κ B (Faith *et al*, 2006; Pirola y Frojdo, 2008). Las drogas que actúen sobre blancos de estas características, además de inhibir la multiplicación de distintas familias de virus, también podrían modular la respuesta inmune que éstos desencadenan.

5.3. Drogas antiherpéticas

Ninguna vacuna para HSV-1 ha probado ser efectiva a pesar de la intensa investigación que se ha realizado en el tema. Un enfoque alternativo para el control de las infecciones herpéticas es el desarrollo de drogas con actividad antiherpética, y sobre todo, para aquéllas actualmente en uso en las que se ha observado el fenómeno de resistencia antiviral.

Hay tres clases de drogas con licencias para el tratamiento de infecciones provocadas por el HSV-1, y todas presentan como blanco la replicación del ADN viral: 1) los análogos de guanosinas Aciclovir (ACV) (2-amino-9-(2-hidroxi-etoximetil)-3H-purin-6-ona) y otros compuestos relacionados, como el penciclovir, y sus prodrogas (valacyclovir y famciclovir, respectivamente), 2) el análogo de nucleótidos cidofovir y 3) el análogo de pirofosfato foscarnet. A pesar de numerosos intentos de mejorar la capacidad antiviral del ACV, éste sigue siendo el “gold standard” para el tratamiento con HSV, después de 30 años de su descubrimiento (Greco *et al*, 2007).

El ACV debe ser fosforilado tres veces antes de ser incorporado al ADN viral. Dado que la primera fosforilación es realizada por la Timidino quinasa (TQ) viral, el ACV es activo sólo en células infectadas. La segunda y tercer fosforilación son realizadas por las TQ celulares. El ACV trifosfato es un inhibidor competitivo de la ADN pol viral y es un finalizador de cadena de ADN; el penciclovir tiene un mecanismo de acción similar (Greco *et al*, 2007).

Las cepas resistentes al ACV fueron reportadas por primera vez en 1982, siendo la mayoría recuperadas a partir de pacientes inmunosuprimidos previamente tratados con ACV. La resistencia al ACV puede estar asociada a mutaciones en una o dos de sus enzimas virales que son blanco del ACV: la TQ o la ADN pol viral. La mayor parte de las mutaciones ocurren en el gen de

la TQ, mientras que las mutaciones en la ADN pol viral ocurren raramente (Greco *et al*, 2007; Griffiths, 2009).

El ACV y el penciclovir tienen poca biodisponibilidad oral, y la síntesis de sus prodrogas valaciclovir y famciclovir, respectivamente, mejoraron ese parámetro. El ACV y el penciclovir presentan muy pocas reacciones adversas, pero los dos interactúan con los mismos sitios activos de la TQ viral o de la ADN pol viral. Por lo tanto, cuando surge una mutante viral resistente a una de las drogas, generalmente es resistente a ambas (Coen y Schaffer, 2003).

Dado que el foscarnet y el cidofovir actúan directamente en la ADN pol viral sin la necesidad de ser activadas por la TQ viral, entonces ambos son activos frente a cepas ACV resistentes que presentan una mutación en la TQ. Sin embargo, en la práctica clínica estas drogas están asociadas a niveles significativos de toxicidad: ambas drogas son nefrotóxicas y el cidofovir resulta muy tóxico en los ojos humanos (Epstein *et al*, 2006; Greco *et al*, 2007; Wilson *et al*, 2009). Asimismo, se han aislado mutantes resistentes al foscarnet a partir de pacientes con VIH y transplantados de médula ósea. El cidofovir ha sido usado cuando se hallaron mutantes resistentes al ACV y al foscarnet, sin haberse reportado aún la aparición de mutantes de HSV-1 resistentes a cidofovir (Greco *et al*, 2007).

Estudios a gran escala demostraron que la resistencia al ACV en pacientes inmunocompetentes está por debajo del 1% (0,1-0,6%). En el caso de inmunosuprimidos, la prevalencia de resistencia al ACV es mucho mayor (4,3-14%) (Duan *et al*, 2008). En estos pacientes, la resistencia está asociada con una falla clínica después de 1 a 2 semanas de tratamiento. Estas infecciones son usualmente severas y pueden terminar siendo crónicas (Greco *et al*, 2007).

En contraste con la gran cantidad de estudios realizados sobre la incidencia de resistencia al ACV en infecciones con herpes genital y herpes labial, pocos estudios han reportado la incidencia de resistencia al ACV en pacientes con QH. Recientemente se publicó un estudio basado en 173 pacientes con QH en el "Hospital del Ojo de Rotterdam", observándose resultados muy llamativos. Es el primer estudio en reportar una alta prevalencia

(6,4%) de resistencia al ACV en aislamientos de HSV-1 en pacientes inmunocompetentes, comparando con otras enfermedades provocadas por dicho virus. Los autores postulan que esta alta prevalencia de resistencia al ACV en pacientes inmunocompetentes que padecen QH podría deberse a que la córnea es un sitio inmunoprivilegiado, que difiere de otros sitios blanco de infección por parte del HSV-1. Los sitios inmunoprivilegiados son áreas del cuerpo con una respuesta inmune disminuida, como por ejemplo lo son el cerebro, los testículos, el útero y el ojo. Por lo cual, el ojo de un inmunocompetente podría comportarse inmunológicamente como cualquier sitio de un inmunosuprimido. Entonces, en la QH se agrava el problema de la resistencia al ACV dada la alta prevalencia de resistencia al antiviral en pacientes inmunocompetentes, además de la resistencia previamente reportada en pacientes inmunocomprometidos (Duan *et al*, 2008).

El tratamiento standard actual para mitigar la QH incluye corticoides y antivirales tópicos. Los corticoides son usados para combatir el componente inmunopatológico de la enfermedad, y los antivirales funcionan para inactivar y prevenir futuras replicaciones virales debidas a la inmunosupresión provocada por estas drogas (Knickelbein *et al*, 2009).

El régimen de tratamiento está basado en cuatro estudios clínicos randomizados, controlados con placebo, llamados “Herpetic Eye Disease Study” (HEDS) realizados por la National Eye Institute (NEI), en los cuales se vio que el uso tópico de corticoides además del antiviral tópico redujo significativamente la persistencia y la progresión de la QH, además de reducir la duración de la inflamación (Knickelbein *et al*, 2009).

Aunque el tratamiento tópico de esteroides junto al ACV ha mostrado beneficios en la cura de la enfermedad, se ha observado un aumento de la recurrencia en aquellos pacientes que recibieron esteroides tópicos (Knickelbein *et al*, 2009). Además, no todos los estudios han mostrado un beneficio en el tratamiento de la QH con esteroides. Al finalizar el tratamiento, mientras se disminuye gradualmente la aplicación de esteroides, se ha visto un incremento del fenómeno de recurrencias. (Cunningham *et al*, 2000). Asimismo, muchas reacciones adversas están asociadas a su uso, tal como la

aparición de infecciones microbianas oportunistas y el desarrollo de glaucoma y cataratas. (Knickelbein *et al*, 2009).

Dado que la búsqueda de compuestos que reemplacen a los esteroides resulta imperiosa, muchos trabajos proponen el uso de compuestos inmunomoduladores novedosos para el tratamiento de la QH (Yin *et al*, 2009; Sarangi *et al*, 2009; Sehwat *et al*, 2010). Sehwat *et al* (2010) estudió el tratamiento de la QH murina con Galectina-9 que mejoró notablemente la severidad de la enfermedad y la neovascularización. Este compuesto estimula la apoptosis de los LT efectores con una reducción de las citoquinas proinflamatorias, incrementa la población de LT regulatorios e inhibe la producción de moléculas involucradas en la neovascularización. Asimismo, también se propone el uso de la proteína de fusión CD200:Fc que reduce la severidad e incidencia de la QH murina. La interacción del compuesto con el receptor de CD200 en macrófagos, granulocitos y CD provoca una reducción de la síntesis de citoquinas responsables del daño en el tejido corneal. Además, el compuesto también incrementó la población de LT regulatorios (Sarangi *et al*, 2009).

Es importante considerar que el HSV-1 daña la córnea progresivamente en cada recurrencia, por lo que resulta clave impedir que ocurran nuevas reactivaciones. Para ello, el HEDS propone la medicación con ACV dado que el tratamiento profiláctico a largo plazo con ACV oral previene la recurrencia de la QH en un 45% (Knickelbein *et al*, 2009). Sin embargo, este tratamiento actúa sólo una vez que el virus ha reactivado de la latencia sin la eliminación del reservorio, con lo cual el virus es capaz de reactivar más adelante. Además, el tratamiento incluye dos dosis diarias por al menos durante un año, hecho que pone de relieve la importancia de la adherencia del paciente al tratamiento. Otro aspecto a tener en cuenta es el riesgo de generar resistencia al ACV luego del tratamiento a lo largo de un año, tanto en pacientes inmunocomprometidos como inmunocompetentes (Kaye *et al*, 2006).

En una muestra de 15 pacientes inmunocompetentes que padecieron QH recurrente, se ha observado un 50% de resistencia al ACV analizando las muestras de córnea en cada recurrencia. Llamativamente, encontraron que en

algunas recurrencias se repetían secuencias de virus resistentes al ACV, por lo cual suponen que el virus mutado puede hacer latencia y luego hacer una recurrencia (Duan *et al*, 2009). Si efectivamente el virus mutado puede reactivar de la latencia, el fenómeno de resistencia adquiere una relevancia mayor (Griffiths, 2009).

Considerando los efectos adversos del tratamiento con corticoides y del fenómeno de resistencia asociado al uso del ACV, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunosuprimidos, se pone de relieve la necesidad de encontrar terapias novedosas y más eficaces para tratar y prevenir la QH, buscando nuevos blancos antiherpéticos y estrategias antivirales innovadoras (Knickelbein *et al*, 2009).

5.4. Nuevas moléculas antiherpéticas

En los últimos años se han estudiado nuevos compuestos dirigidos a diferentes blancos moleculares virales. Así, surgieron drogas como el docosanol y el fomivirsen aprobados por la FDA, y otros compuestos, aún en estudio, tales como los inhibidores no nucleosídicos de la ADN polimerasa, los inhibidores del complejo helicasa-primasa, que también afectan la replicación del ADN viral, o los inhibidores del ensamblaje de las partículas virales (Pope, 1998; van Zeijl *et al*, 2000; Brideau *et al*, 2002; Kleymann *et al*, 2002; Oien *et al*, 2002; Thomsen *et al*, 2003).

Asimismo, se han llevado a cabo muchos estudios de actividad anti HSV-1 de diferentes componentes del sistema de defensa innata del hospedador, como los péptidos catiónicos antimicrobianos. Estas moléculas generalmente anfipáticas descritas en leucocitos y también secretadas por varios tipos celulares epiteliales, poseen un amplio espectro de actividad contra bacterias, hongos y virus. Las defensinas, la indolicidina, la brevinina, la magainina, la melittina, la tachyplesina, la dermaseptina y el complejo quelante de cobalto -96 (CTC-96) presentan actividad anti HSV-1. Pueden exhibir un efecto inactivante directo sobre la envoltura viral, actuar como bloqueantes de la adsorción y entrada viral a la célula o de la propagación célula-célula, y como

inhibidores de algún paso posterior en la replicación viral (Schwartz *et al*, 2001; Superti *et al*, 2008). Particularmente el CTC-96, presenta una demostrada actividad antiherpética inhibiendo la fusión de la envoltura viral y la membrana plasmática, impidiendo así la entrada de la partícula viral a la célula (Schwartz *et al*, 2001).

La roscovitina (derivado purínico) y el flavopiridol (flavonoide semisintético) son dos ejemplos de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) celulares, conocidos como inhibidores farmacológicos de CDK (PCIs), que resultaron activos contra diferentes herpesvirus y también contra VIH en condiciones *in vitro* (Bresnahan *et al*, 1997; Schang *et al*, 2002a; Diwan *et al*, 2004). La inhibición de la multiplicación de HSV-1 por parte de la roscovitina ocurre debido a la inhibición de factores celulares esenciales para la maquinaria de la multiplicación viral. La inhibición es reversible en las primeras 24 horas p.i., con lo cual la droga no causa daño irreversible en la célula infectada (Schang *et al*, 1998). Aún no se conoce la identidad de las CDKs específicas requeridas para la replicación de HSV-1 y el papel que éstas cumplen en el ciclo viral (Coen y Schaffer, 2003). Recientemente, algunos trabajos postularon que la CDK2 y la CDK5 son importantes en la replicación de HSV-1, con lo cual podrían ser blancos de acción de estos inhibidores (Guan y Shorgen, 2008; Haenchen *et al*, 2010). Los PCIs mostraron ser activos contra cepas de HSV-1 resistentes a los antivirales convencionales, y hasta ahora no se han encontrado mutantes de HSV-1 resistentes a los PCIs. (Schang *et al*, 1998, 2002a). Los PCIs no sólo previenen la expresión de los genes de HSV-1, sino que también afectan la actividad y localización de dos proteínas regulatorias importantes de HSV-1, ICP0 e ICP4. Estas drogas también resultaron activas para inhibir la reactivación de HSV de la latencia (Advani *et al*, 2001; Schang *et al*, 2002b).

Otros ejemplos de compuestos antiherpéticos con blancos celulares son los inhibidores de la enzima COX-2 celular, que bloquean la acumulación de la proteína inmediata temprana 2 (IE2) de HCMV (Coen y Schaffer, 2003), o las poliaminas bioactivas, que inhiben a las enzimas S-adenosil metionina

descarboxilasa y la ornitina descarboxilasa, enzimas celulares que son importantes en la replicación de HSV-1 (Greco *et al*, 2007).

6. Plantas medicinales

Las plantas son una fuente importante e inagotable de moléculas de diversa naturaleza química y usos medicinales. La diversidad química, la complejidad estructural, la ausencia de efectos tóxicos sustanciales, y el amplio espectro de acción de los productos naturales los convierte en candidatos ideales para nuevas terapias (Mukhtar *et al*, 2008).

Desde la antigüedad, las plantas medicinales han sido usadas para el tratamiento de muchas enfermedades. A lo largo de la historia, el ser humano ha buscado empíricamente en la flora de su hábitat los remedios contra las enfermedades que lo afectaban de manera frecuente. Desde hace miles de años los chinos, griegos, árabes y diversas etnias americanas y africanas han aplicado tratamientos con plantas medicinales, acumulando conocimientos y experiencias al respecto (Mukhtar *et al*, 2008).

Actualmente, se reconoce que las plantas medicinales son una valiosa fuente de medicamentos vegetales o materia prima para la industria farmacéutica. El 25% de las prescripciones medicamentosas en los países industrializados contienen ingredientes extraídos de plantas (Barquero, 2007).

En países de Oriente existe un sistema de medicina tradicional basado en el uso de plantas medicinales, como por ejemplo en China, India, Japón, Pakistán, Sri Lanka y Tailandia. (Mukhtar *et al*, 2008). Los países occidentales están fomentando el uso de productos medicinales basados en plantas en sus sistemas de salud. La OMS ha estimado que alrededor del 80% de la población mundial recurre a la medicina tradicional herbolaria para su atención primaria.

En este sentido y admitiendo esta realidad, la OMS ha promovido su uso desde 1976 y la ha reconocido como rama médica en 1978. En 1987, la 40^a Asamblea Mundial de la Salud reafirmó las principales resoluciones y las recomendaciones formuladas en 1978 en la Conferencia Internacional sobre Atención Primaria de Salud, instando a la identificación, cultivo y uso de plantas

medicinales. La OMS insiste en que es necesaria una investigación científica que dé información adicional sobre la eficacia y seguridad de estas medicinas para garantizar las condiciones de uso sin riesgos, sobre todo cuando se emplean estos remedios fuera de las regiones donde han demostrado su inocuidad durante siglos. Además, la organización sanitaria estableció una guía de controles análoga a la de referencia para el resto de los medicamentos convencionales (Barquero, 2007).

Por otra parte, en la "Declaración de Lima" (diciembre de 2007) los países intervinientes de Latinoamérica, Europa y Asia, junto a autoridades de la OMS, establecieron la importancia y la necesidad de incorporar prácticas de la Medicina Tradicional en los sistemas de salud de los países, en consonancia con la primera declaración de Alma Ata de 1978.

En estos momentos, 25 países occidentales tienen legislaciones específicas sobre hierbas medicinales, entre ellos Alemania, Francia, Suiza, Brasil, Chile, México, Perú y Canadá. En este último se promulgó en el 2004 la "Natural Health Product Regulations", que estimula el uso de tecnología moderna y la búsqueda de evidencias científicas que apoyen la promoción de plantas medicinales y sus productos asociados (Siow *et al*, 2005). En Brasil, se ha institucionalizado el uso de plantas medicinales en centros de Atención Primaria de la Salud de todo el país. Asimismo, a instancias de la Portaria 971 firmada por el presidente Lula Da Silva (mayo de 2006), se ha incorporado obligatoriamente la fitoterapia, la homeopatía, la acupuntura y el termalismo dentro del Sistema Único de Salud en todo el territorio nacional.

Por su parte, la Argentina cuenta desde el año 1998 con una norma, la disposición 144/98 de la ANMAT, que reglamenta el uso de las plantas medicinales. Esta normativa establece las definiciones de lo que se consideran las "drogas vegetales" y los "medicamentos fitoterápicos". Luego, se instituyeron normas reglamentarias que contemplan la importación, elaboración, fraccionamiento, depósito, comercialización y publicidad de éstas y las personas físicas y jurídicas que intervienen en dichas actividades. Mediante estas normas se han establecido mecanismos eficaces para

garantizar la calidad con que acceden dichos productos elaborados e importados al mercado.

Actualmente, hay un proyecto de ley (Ley de plantas medicinales, drogas vegetales, preparados de drogas vegetales y medicamentos fitoterápicos) que pretende impulsar una política pública que abarque la investigación, desarrollo y producción de fitoterápicos. De este modo, se intenta impulsar como política pública prioritaria garantizar a la población el acceso seguro a través del uso racional de las drogas vegetales, preparados de drogas vegetales, medicamentos fitoterápicos y plantas medicinales.

6.1. Actividad antiviral de plantas medicinales

Desde hace mucho tiempo las plantas medicinales han sido usadas para tratar infecciones virales, sin ninguna base científica que la avale. Actualmente, hay un creciente interés en determinar la evidencia científica y racionalizar el uso de preparaciones de plantas medicinales. El primer interés científico reconocido en el desarrollo de agentes antivirales a partir de plantas fue de la Boots Drug Company (Nottingham, England) para evaluar 288 plantas con el fin de hallar actividad anti-Influenza (Chantrill *et al*, 1952). Tiempo después, numerosos estudios han reportado efectos inhibitorios de extractos de plantas medicinales en la replicación del HSV-2, VIH, HBV, poxvirus y el virus SARS (Debiaggi *et al*, 1988; Vermani y Garg, 2002; Asres y Bucar, 2005; Kotwal *et al*, 2005; Kwon *et al*, 2005).

Para la mayoría de estos estudios se han utilizado extractos acuosos u orgánicos de plantas medicinales, y los esfuerzos realizados para la identificación de principios activos naturales que exhiban actividades antivirales han sido limitados. El paso del extracto crudo al principio activo es un camino arduo que demanda mucho esfuerzo y dinero, no siempre con resultados positivos. Los compuestos presentes en los extractos son químicamente complejos, lo cual dificulta su aislamiento e identificación. Además, se debe tener en cuenta la factibilidad de obtener biomasa y los problemas relacionados con la posibilidad de proteger el conocimiento generado (Barquero, 2007).

La calanolida A es un antiviral derivado de una planta que se encuentra en estudios en fase II en humanos, producido por la empresa Sarawak MediChem Pharmaceuticals. Investigadores del Instituto Nacional del Cáncer aislaron el compuesto de extractos de látex producidos por un árbol llamado *Calophyllum langerium*, el cual es nativo de las selvas tropicales de Sarawak, Malasia. Como la fuente orgánica del extracto es relativamente escasa, se elaboró una versión química. La calanolida A es un nuevo inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa (INNTI), eficaz contra varias cepas del virus VIH 1 pero no contra cepas del VIH tipo 2. Parece acoplarse de manera única con la enzima transcriptasa reversa a partir de un mecanismo de acción diferente al de los demás INNTI (Barquero, 2007).

Los fitoquímicos pueden ser una alternativa considerando que las drogas usadas actualmente presentan muchos inconvenientes, como el fenómeno de la resistencia (Mukhtar *et al*, 2008). En efecto, estudios recientes han mostrado actividad de extractos de plantas frente a cepas virales resistentes a los agentes antivirales convencionales. Por ejemplo, la actividad de extractos de *Carissa edulis* frente a cepas resistentes de HSV-1 (Tolo *et al*, 2006), o la actividad de extractos de *Thalictrum simplex* L frente a cepas resistentes de influenza (Serkedjieva *et al*, 2003).

Un gran número de estudios han explorado propiedades inmunomoduladoras de extractos de plantas que presentan actividad antiviral (Webster *et al*, 2006). Así se observó que los extractos de raíces de la planta medicinal *Heracleum maximum* Bartr. (Umbelliferae), la cual posee efectos antivirales además de actividades antibacteranas y antifúngicas, estimula la producción de IL-6 en macrófagos. Asimismo, los extractos de *Plantago major* y de *P. asiática* (Plantaginaceae), comúnmente utilizados como medicina tradicional en Taiwán para el tratamiento de enfermedades infecciosas, estimulan la proliferación de linfocitos y la secreción de INF- γ (Chiang *et al*, 2003). Otro extracto que presenta actividad antiviral e inmunomoduladora es el obtenido de *Capparis spinosa* L., que estimula la expresión de citoquinas como IL-12, IFN- γ y TNF- α , además de su actividad anti-HSV-1 (Arena *et al*, 2008).

Además de los efectos inmunomoduladores, otro hallazgo interesante es el amplio espectro de acción antiviral de extractos de plantas (Pompei *et al*, 1979). Esto puede estar asociado a un único fitoquímico, o a un número de diferentes constituyentes de plantas. Entre los primeros, encontramos el Pandanin, una lectina que fue aislada de extractos salinos de hojas de *Pandanus amaryllifolius* Roxb., y muestra actividad antiviral contra HSV-1 e Influenza H1N1 (Ooi *et al*, 2004). Entre los extractos de plantas con actividad antiviral de amplio espectro, se demostró que los extractos de *Trifolium* y de lúpulo exhibieron actividad antiviral contra un gran número de virus tales como Influenza, VIH, HBV, HCV y HSV (Kotwal *et al*, 2005; Buckwold *et al*, 2004).

Las plantas medicinales han sido y son extensamente estudiadas como potenciales antivirales contra HSV (Superti *et al*, 2008). Son numerosos los estudios que han evaluado tanto extractos crudos como compuestos puros obtenidos de plantas medicinales. En la Tabla se muestran ejemplos de extractos de plantas a partir de los cuales se obtuvieron los compuestos puros responsables de la actividad anti-herpética. Mucho de ellos son terpenoides. Además, la mayoría de estos compuestos presentaron actividad frente cepas resistentes al ACV y al foscarnet, actividad antiviral de amplio espectro, y en algunos casos, también actividad inmunomoduladora (Superti *et al*, 2008).

Extracto de planta	Compuesto	Estructura química
<i>Myrica rubra</i>	prodelfinidín B-2-3,3'-di-O-galato	polifenol
<i>Humulus Lupulus</i>	xanthohumol	Polifenol
<i>Theobroma cacao</i> L	Procianidinas diméricas y otros polifenoles relacionados	Polifenol
<i>Populus spp, Betula alba, Faguss sylvatica Aesculus hyppocastanum, Attus glutunosa.</i>	flavonoides	Flavonoides polifenólicos
<i>Pathecellobium clypeana</i>	7-o-galoiltricetilflavan	Flavonoide polifenólico
<i>Melaleuca ericifolia</i>	Metil-legugenol	monoterpeno
<i>Melaleuca armillaris</i>	1,8-eineole y terpinen-4-ol	monoterpeno
<i>Melaleuca leucadendron</i>	1,8-eineole	monoterpeno
<i>Salvia fruticosa</i>	isobomeole	monoterpeno
<i>Euphorbia jolkini</i> Bioss	Putranjivain A	diterpeno
<i>Rhus javanica</i>	Ácido morónico y ácido betulónico	triterpenos
<i>Schefflera heptaphylla</i> (L)Frodin	triterpenoides	triterpenos
<i>Ocimum basilicum</i>	Ácido ursólico	triterpeno
<i>Euphorbia segetalis</i>	lupenone	triterpeno

Tabla. Extractos de plantas y sus compuestos puros que presentan actividad anti-herpética. Tomado de Superti *et al*, 2008.

6.2. Meliáceas

La familia *Meliaceae* está constituida principalmente por árboles y arbustos, que incluye unos 50 géneros y alrededor de 550 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Es una familia de plantas con importancia económica, principalmente por la producción de madera (caobas).

Una de las especies más representativas de la familia es *Azadirachta indica*, árbol conocido comúnmente como margosa o paraíso de la India en español y como *neem* en inglés. El término *neem* proviene del sánscrito *Nimba* y era conocido como *Sarva Roga Nivarini* o curador de todas las enfermedades. Nativa del sur de Asia, la margosa se planta y naturaliza extensamente en las áreas semiáridas de Asia y África, en donde se la cultiva para obtener combustible y numerosos productos no madereros que se obtienen de las hojas, la fruta y la corteza. Entre estos encontramos agentes medicinales e insecticidas. La margosa es uno de los árboles más conocidos y apreciados en el sur de Asia, en donde se lo considera como sagrado por los hindúes debido a sus propiedades para prevenir enfermedades. La margosa es una fuente importante para las preparaciones medicinales tradicionales. Se ha reportado que varias partes del árbol poseen efecto analgésico, antihelmíntico, antipirético, antiséptico, antisifilitico, astringente, demulcente, diurético, purgante, etc. 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 y úlcera. Se ha demostrado que los extractos de la margosa poseen propiedades antibacterianas, antidiabéticas, antifúngicas y antivirales (Parrotta y Chaturverdi, 1994).

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

6.3. *Melia azedarach* L.

Este árbol es oriundo de Asia, de la región del 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 Sudamérica, donde se naturalizó con rapidez.

Como vimos anteriormente para *Azadarachta indica*, a *M. azedarach* L. también se le atribuyen una gran variedad de acciones farmacológicas tales como: emético, antipirético, antihelmíntico, antiinflamatorio, astringente, antiprotozoicida y tónico amargo (Khan *et al*, 2001).

Los extractos de frutos, semillas y hojas de *M. azedarach* L. se han utilizado para estudiar su potencial actividad antifúngica contra hongos fitopatogénicos. Tanto los extractos obtenidos con hexano o etanol demostraron tener actividad fungistática contra *Aspergillus flavus*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y otras especies (Carpinella *et al*, 2003). Por otro lado, los extractos clorofórmicos de las hojas muestran un marcado poder inhibitorio sobre el crecimiento de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Yanes *et al*, 2004).

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 fueron evaluados como pediculicidas y mostraron ser altamente mortales para las liendres adultas (Carpinella *et al*, 2007). También parecen ser letales contra larvas de *Aedes aegyptii*, el mosquito vector del dengue, así como también tienen actividad antihelmíntica contra algunos gusanos como tenia, anquilostoma y lombrices (Wandscheer *et al*, 2004; Szewczuk *et al*, 2006).

6.4. Compuestos bioactivos aislados de *Melia azedarach* L.

Cuando se comenzaron a aislar los compuestos responsables de algunas actividades biológicas encontradas en los extractos de *M. azedarach*

L., se encontró en distintos laboratorios del mundo, que se trataban de tetranortriterpenoides también llamados limonoides (Figura 3). Los limonoides son triterpenos alterados metabólicamente que tienen una estructura derivada de un esqueleto 4,4,8-trimetil-17-furanilesteroidoide como precursor (Ntalli *et al*, 2010; Roy y Saraf, 2006).

Hasta la fecha, se han encontrado aproximadamente 300 limonoides, de los cuales un tercio pertenece únicamente a las especies *Azadirachta indica* y *Melia azedarach* L., y también son conocidos como meliacinas (Roy y Saraf, 2006).

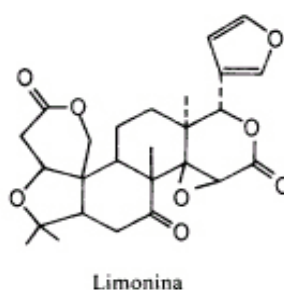


Figura 3. Estructura química de la limonina, el limonoide más abundante.

La variedad de propiedades biológicas exhibidas por los limonoides es tal que ha llevado a los científicos a extender sus estudios en uso de los mismos contra el cáncer, bacterias, virus, helmintos, parásitos cuasantes de la malaria, hongos, insectos vectores de enfermedades e insectos domésticos (Tada *et al*, 1999; Carpinella *et al*, 2003, 2005; Abdelgaleil *et al*, 2004; Muregi *et al*, 2004; Sunthitikawinsakul *et al*, 2003; Zhang *et al*, 2005; Isman, 2006; Coria *et al*, 2008; Madibela y Kelemogile, 2008 *et al*; Khanavi *et al*, 2008; Wu *et al*, 2009)

Uno de los compuestos aislados de los frutos de *M. Azedarach* L. es la 28-diacetilsendanina que presenta actividad antiviral contra HSV-1 en cultivos de células Vero (Kim *et al*, 1999). Otros triterpenoides y limonoides aislados de *M. azedarach* L. han probado inhibir la multiplicación de HSV-1, VIH y RSV (Chen *et al*, 2007; Manners *et al*, 2007; Joycharat *et al*, 2008).

Como resultado del muestreo de extractos de plantas utilizadas en medicina popular se encontró que un extracto de raíz de *Melia azedarach* L.

resultaba activo frente a un amplio espectro de virus con genoma ADN y ARN, entre ellos los virus HSV-1 y HSV-2, Junín, Tacaribe, Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV), Polio y Sindbis. La actividad antiviral se demostró tanto si se agregaba el extracto después de la adsorción del virus y permanecía hasta su cosecha, o tratando a las células con el extracto antes de la infección, es decir, por pretratamiento, para así desencadenar en las células un estado refractario a la infección (Wachsman *et al*, 1982). Estudios posteriores permitieron establecer que la actividad antiviral de amplio espectro también estaba presente en los extractos hidroalcohólicos de las hojas, lo que facilitaba la recolección de la materia prima (Wachsman *et al*, 1984). Asimismo, se demostró que los extractos de las hojas también poseían una actividad antiviral de amplio espectro para una serie de líneas celulares de diferente origen, tales como Vero, L929, MDCK y BHK-21 (Andrei *et al*, 1985). La purificación parcial de los extractos de *M. azedarach* L. permitió obtener una fracción semipurificada con actividad antiviral que se denominó meliacina (MA) (Andrei *et al*, 1988).

MA resultó ser un antiviral de amplio espectro, que inhibe la multiplicación de virus pertenecientes a distintas familias. En células BHK-21, MA inhibe la multiplicación de los virus Sindbis, Aftosa y Junín por pretratamiento (Wachsman *et al*, 1987; Castilla *et al*, 1998). Se demostró que MA induce un estado refractario a la infección al ser administrada antes de la infección viral de cultivos primarios de embriones de pollo y de líneas celulares (células Vero, BHK-21, Hep-2, HeLa, L929, RK-13) (Andrei *et al*, 1988).

Una posible explicación de la acción de MA sobre virus que ingresan a la célula por endocitosis mediada por receptor tales como el virus Junín, Sindbis, Aftosa (FMDV) y VSV podría ser el hecho de que MA produce el incremento del pH de las vesículas ácidas intracelulares. Este efecto fue demostrado mediante la tinción con naranja de acridina, que tiñe de naranja los compartimentos ácidos (Wachsman *et al*, 1998). La alteración del pH endosomal no permitiría la fusión de la envoltura del virus con la membrana endosomal, y así inhibiría etapas tempranas de la infección con virus cuya entrada es dependiente del pH. (Barquero, 2001 tesis doctoral). Este efecto es similar al que produce el

cloruro de amonio o la cloroquina. Sin embargo, la acción del cloruro de amonio es reversible, mientras que una vez que MA produce un estado antiviral, éste permanece al menos durante 12 horas (Andrei *et al*, 1988). Llamativamente, se ha demostrado que la basificación de los endosomas persiste aproximadamente ese mismo tiempo, lo cual sugiere una correlación directa entre ambos eventos (Barquero, 2001 tesis doctoral).

Durante el pretratamiento, MA interfiere en el desnudamiento de las partículas virales que ingresan por endocitosis mediada por receptor, sin afectar la adsorción y la penetración de los viriones en las vesículas endosomales (Castilla *et al*, 1998). Dado que el HSV-1 en las células Vero entra a través del mecanismo de fusión de membranas, MA no interfiere en dicha entrada (Villamil *et al*, 1995).

Además de la actividad antiviral exhibida por MA luego del pretratamiento, también se observó la inhibición de la multiplicación del virus Junín y del HSV-1 cuando MA es agregado al cabo de la infección (Villamil *et al*, 1995; Castilla *et al*, 1998; Alché *et al*, 2002). Durante el post-tratamiento hay un bloqueo de la liberación de las partículas al medio extracelular, y una inhibición de la propagación viral (Villamil *et al*, 1995; Castilla *et al*, 1998; Alché *et al*, 2002). Los estudios ultraestructurales realizados revelaron que en las células infectadas y tratadas con MA se acumulan una gran proporción de nucleocápsides virales sin envoltura en el citoplasma y sólo una pequeña proporción de virus maduro se encuentra en las vesículas citoplasmáticas (Alché *et al*, 2002).

Aparte de la actividad antiviral de amplio espectro presentada por MA, se realizaron experimentos dirigidos a investigar la acción de MA sobre parámetros de la respuesta inmune.

En células L929 y en cultivos primarios de embrión de pollo infectados con el virus Newcastle, MA disminuye la síntesis de IFN como la de las enzimas involucradas en el sistema del IFN (Andrei *et al*, 1990). *In vivo*, la administración de MA por vía intraperitoneal disminuyó la cantidad de IFN α/β circulante en el suero de ratones expuestos a distintos inductores (Andrei *et al*, 1990).

MA mostró una fuerte actividad anti-complementaria principalmente de la vía clásica, pero no inhibió la fagocitosis de partículas de zimosán opsonizadas ni el estallido respiratorio en leucocitos polimorfonucleares (Benencia *et al*, 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 así como también la actividad fagocítica y el metabolismo oxidativo de exudados peritoneales de ratón (Courreges *et al*, 1994; Benencia *et al*, 1997).

Por otro lado, se observó una inhibición en la proliferación de LT 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 (Courreges *et al*, 1998).

En macrófagos peritoneales se observó que la administración simultánea de MA y LPS incrementó significativamente la producción de TNF- α con respecto a las células tratadas con LPS o MA solo. Por su lado, MA resultó ser un pobre inductor de la producción de TNF- α (Petrera y Coto, 2002).

Asimismo, se estudió el efecto de MA en el modelo de infección ocular con HSV-1 en ratones. Para ello, ratones Balb/c adultos fueron inoculados con HSV-1 en sus córneas y tratados con MA en forma tópica tres veces al día por 3 días consecutivos, comenzando a las 24 y 96 h p.i. Los animales infectados y tratados o no con MA fueron monitoreados para analizar el desarrollo de la QH mediante un microscopio binocular durante 16 días. MA disminuyó significativamente la incidencia y severidad de la enfermedad, reduciendo la carga viral, la inflamación ocular y la neovascularización con respecto a los ratones infectados y no tratados, independientemente del esquema de tratamiento utilizado (Pifarré *et al*, 2002). El análisis histológico de las córneas de los ratones infectados y tratados con MA no reveló daño del tejido, mientras que las muestras de las córneas de los ratones infectados mostraron inflamación, neovascularización y necrosis. El tratamiento con MA a las 24 h

p.i. redujo significativamente el título viral en el ojo en 1-1,5 órdenes de magnitud. Entonces, MA demostró ejercer una acción antiviral para impedir el desarrollo de la QH cuando fue agregado el primer día p.i. Sorpresivamente, el tratamiento con MA después de 96 h p.i., cuando ya no hay virus infectivo en la córnea, también previno la enfermedad ocular, con lo cual demuestra que MA ejerce una actividad inmunomoduladora *in vivo*. Al tratar con MA a las 24 h p.i., esta ejerció una actividad antiviral *in vivo* dada la disminución del título viral, aunque no se descarta una posible actividad inmunomoduladora también en este esquema de tratamiento (Alché *et al*, 2000; Pifarré *et al*, 2002).

6.5. Principio activo de MA

Con el objeto de identificar el principio antiviral presente en dichos extractos, el protocolo de purificación utilizado reveló la existencia de una familia de compuestos con actividad antiviral, entre los cuales el 1-cinamoil-3,11-dihydroximeliacarpina (CDM) es el tetranortriterpenoide que apareció en mayor proporción (Figuras 4 y 5) (Alché *et al*, 2003).

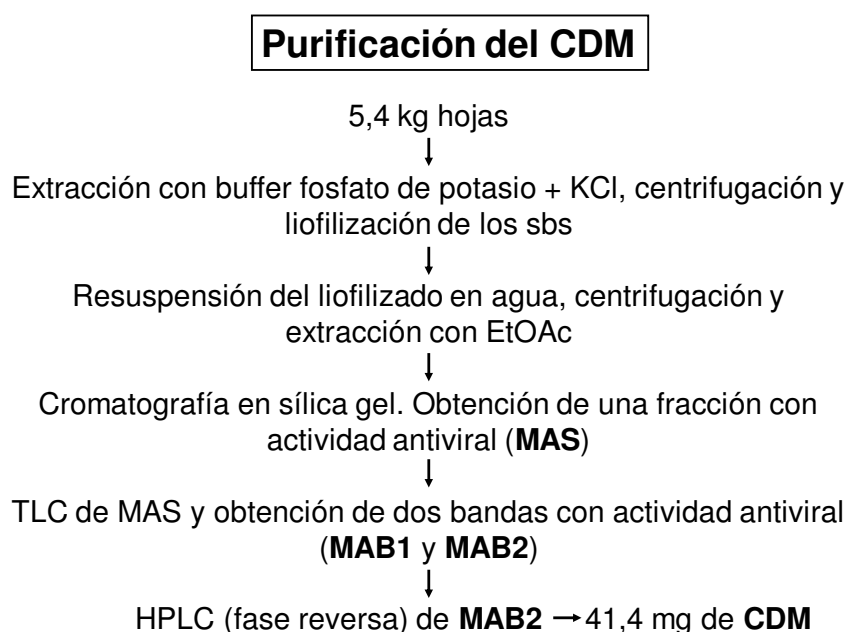


Figura 4. Protocolo de purificación de CDM

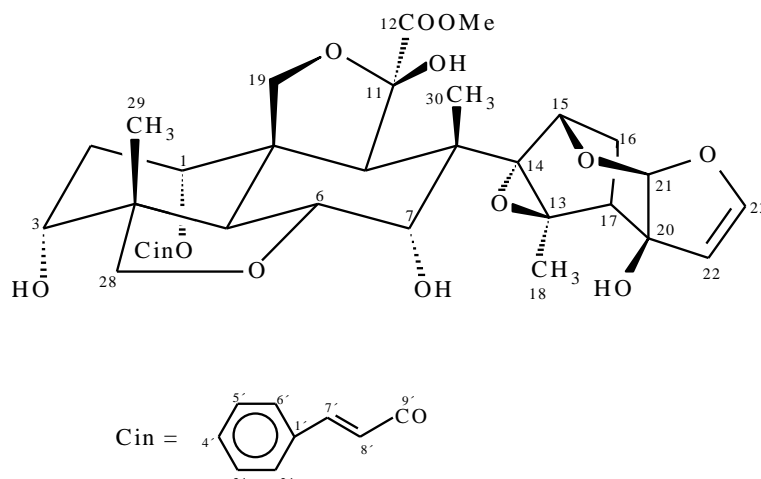


Figura 5. Estructura química de 1-cinamoil-3,11-dihidroximeliacarpina (CDM)

CDM es capaz de inhibir la multiplicación del virus VSV y del virus HSV-1 cuando se ensaya su actividad antiviral por postratamiento sin citotoxicidad para las células Vero (Alché *et al*, 2003).

Al estudiar su mecanismo de acción en el sistema VSV-células Vero, se pudo establecer que CDM induce un estado refractario a la infección viral cuando las células son tratadas con el compuesto durante dos horas antes de la adsorción viral. Dicho estado se correlacionó con la acción que CDM ejerce sobre el pH de los endosomas que, al basificarse, impiden que tenga lugar la fusión entre la membrana de las vesículas endocíticas y la envoltura viral imposibilitando la entrada del virus a la célula, tal como se había observado para MA. Asimismo, CDM afecta la exocitosis y/o la maduración de las glicoproteínas virales de diferentes virus, lo cual explicaría el amplio espectro de acción reportado para MA en el post-tratamiento. CDM bloquea el transporte intracelular de la glicoproteína G de VSV (Gvsv) y de las glicoproteínas gB, gC y gD del virus HSV-1 impidiendo su expresión a nivel de la membrana plasmática ya que resulta retenida en el aparato de Golgi de las células Vero. Esto último se demostró mediante estudios de co-localización realizados en células transfectadas con un plásmido que contiene el cADN de la galactosil transferasa 2 fusionada con la GFP (GalT2-GFP), el cual es un marcador del aparato de Golgi, y luego infectadas con VSV o HSV-1. Así se pudo establecer

que las glicoproteínas (detectada en dichas células por inmunofluorescencia) se acumulan en el aparato de Golgi de las células tratadas con CDM (Barquero *et al*, 2004; 2006) (Figura 6).

La acidificación de los compartimentos vacuolares juega un rol importante en una gran variedad de procesos celulares. La perturbación del pH ácido de las organelas intracelulares por agentes acidotrópicos, como las bases débiles o el cloruro de amonio, ionóforos como el monensin (MON) e inhibidores específicos de la ATPasa vacuolar como la concanamicina (CON), afecta tanto la endocitosis como la exocitosis viral (Sidhu *et al*, 1999). CDM es el primer triterpenoide con actividad antiviral descrito responsable de la alcalinización de los compartimentos intracelulares (Barquero *et al*, 2004).

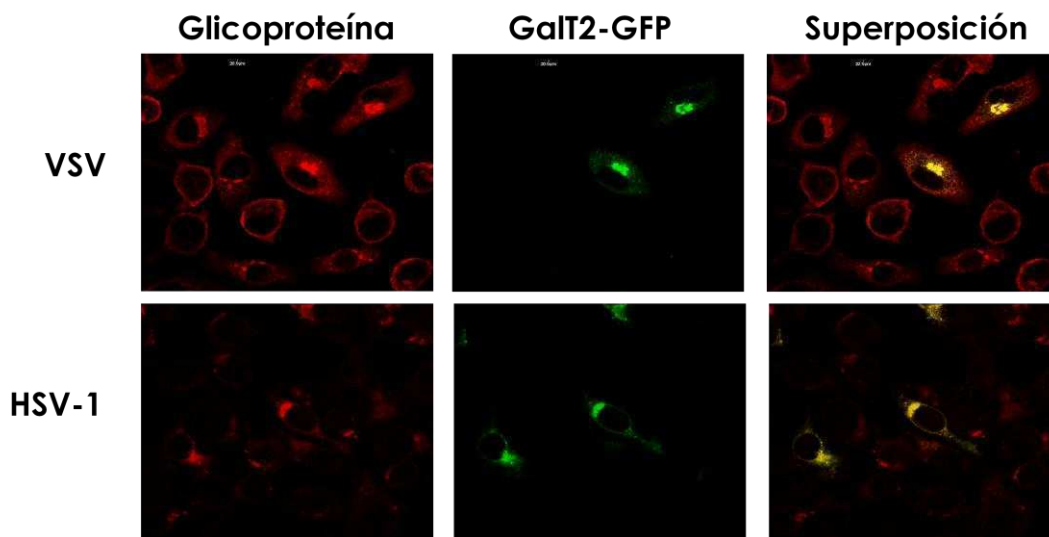


Figura 6. Co-localización intracelular de glicoproteínas virales con un marcador de Golgi (GalT2-GFP) en células Vero post-tratadas con CDM. Tomado de Barquero *et al*, 2004 y 2006.

Por otro lado, en una línea celular de conjuntiva humana (NHC) se observó que el CDM reduce en un 90% la replicación de HSV-1, en ausencia de citotoxicidad. Asimismo, CDM bloqueó el transporte de gD de HSV-1 a la membrana plasmática a nivel del aparato de Golgi, de manera análoga a lo observado en el sistema de infección en células Vero (Barquero *et al*, 2006).

En cuanto a su acción inmunomoduladora, CDM inhibe la translocación del factor NF- κ B al núcleo celular inducida por la infección con HSV-1, tanto en células NHC como en células Vero (Barquero *et al*, 2006) (Figura 7).

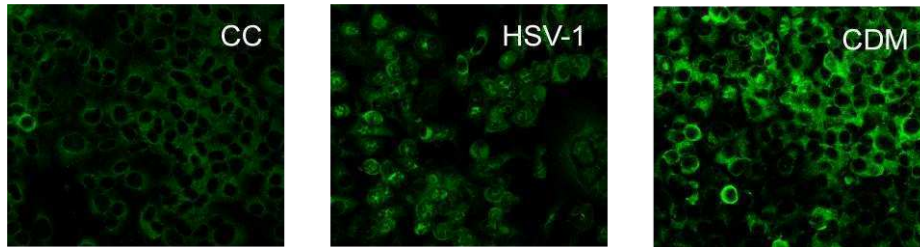


Figura 7. Efecto de CDM en la translocación nuclear de NF- κ B en células NHC infectadas con HSV-1. Tomado de Barquero *et al*, 2006. (CC): Control célula. (HSV-1): células infectadas con HSV-1. (CDM): células infectadas con HSV-1 y tratadas con CDM.

Por lo tanto, estos resultados permiten concluir que CDM presenta una probada actividad antiviral de amplio espectro, afectando virus con genoma ADN y ARN a través del mismo mecanismo de acción y una probable acción moduladora de la vía del NF- κ B (Barquero *et al*, 2004; 2006).

Por eso, resulta de sumo interés avanzar en el conocimiento del mecanismo de acción de CDM a nivel molecular y celular desde un doble aspecto: por un lado, para contribuir a una comprensión más acabada de los factores que podrían participar en el desarrollo de la inmunopatología provocada por HSV-1 *in vivo* y, al mismo tiempo, para evaluar la factibilidad del uso del CDM como agente antiviral y antiinflamatorio.

OBJETIVOS

Objetivo general

Investigar el mecanismo de acción antiviral e inmunomodulador de CDM a nivel celular y molecular para comprender el efecto curativo de MA en la QH.

Objetivos específicos

Evaluar la actividad anti HSV-1 e inmunomoduladora de CDM *in vitro*, en células derivadas de tejidos oculares y en células inflamatorias.

Profundizar los estudios del efecto de CDM sobre el procesamiento y el transporte intracelular de las glicoproteínas virales y celulares.

Estudiar si CDM presenta un efecto antiangiogénico sobre células endoteliales involucradas en el proceso de neovascularización corneal durante la progresión de la QH.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Células

La línea celular continua IOBA-NHC (NHC), proveniente de conjuntiva humana (Diebold *et al*, 2003), fue cultivada a 37 °C, en una atmósfera con 4% de CO₂, en una mezcla 1:1 de medios Eagle modificado de Dulbecco y mezcla de nutrientes F-12 (D-MEM/F12) (GIBCO), suplementada con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Natocor), y 50 µg/ml gentamicina (Sigma-Aldrich), y llevada a pH 7,4 con bicarbonato de sodio 7,5% (DMEM/F12 10%). Las monocapas fueron subcultivadas semanalmente y mantenidas a 33 °C en DMEM/F12 10%. Para los experimentos en microplacas, las células se incubaron en medio de mantenimiento (MM), DMEM/F12 sin suero.

La línea celular continua HCLE, proveniente de epitelio limbal de córnea humano, y provista gentilmente por los Dres Ilene K. Gipson y Pablo Argüeso (The Schepens Eye Research Institute, Harvard Medical School, Boston, USA), fue cultivada a 37 °C, en una atmósfera con 4% de CO₂, en medio de queratinocitos libre de suero (KSFM) (GIBCO), suplementado con 25 µg/ml de extracto de pituitaria bovina (BPE) (GIBCO), 0,2 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) (GIBCO), y 0,4 mM CaCl₂. Las células fueron subcultivadas semanalmente y mantenidas a 33 °C en mezcla DMEM/F12 sin suero, con baja concentración de calcio.

Las líneas celulares continuas L929, proveniente de tejido conectivo subcutáneo de ratón, y Vero, proveniente de epitelio de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*, fueron cultivadas a 37 °C en medio mínimo esencial de Eagle en solución salina de Earle (E-MEM) (GIBCO) suplementado con 5% SFB inactivado (MEM 5%), y 50 µg/ml gentamicina. Las células fueron subcultivadas semanalmente y mantenidas a 33 °C en MM, E-MEM suplementado con 1,5% SFB inactivado. Cuando los cultivos se incubaron en atmósfera con 4% de CO₂, los medios se suplementaron con HEPES 20 µM (Sigma-Aldrich) y se llevaron a pH 7,4 con bicarbonato de sodio 7,5%.

La línea celular continua J774A.1, proveniente de macrófagos de ratón, fue gentilmente provista por el Dr. Osvaldo Zabal (INTA-Castelar, Buenos Aires) y cultivada a 37 °C, en una atmósfera con 4% CO₂, en medio RPMI 1640

suplementado con 10% SFB inactivado (RPMI 10%) y 50 µg/ml gentamicina, y llevada a pH 7,4 con bicarbonato de sodio 7,5%. Las células fueron subcultivadas semanalmente y mantenidas a 33 °C en MM, RPMI suplementado con 2% SFB inactivado.

Las células HUVEC, provenientes del endotelio de la vena del cordón umbilical humano, fueron cultivadas a 37 °C en medio 200 (Cascade biologics) suplementado con LSGS (Low Serum Growth Supplement) (Cascade Biologics). Las células fueron subcultivadas semanalmente, y se les cambió el medio cada 48 horas.

2. Virus

El virus recombinante HSV-1 YK608 fue gentilmente proporcionado por el Dr. Yasushi Kawaguchi (Instituto de Ciencias Médicas, Universidad de Tokio, Japón) (Sugimoto *et al*, 2008). El virus HSV-1 cepa KOS y el HSV-1 YK608 fueron propagados en células Vero. Los stocks se prepararon infectando células con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 unidades formadoras de placas (UFP) por célula. Luego de 1 h de adsorción a 37 °C, las células se cubrieron con MM y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las células se sometieron a tres ciclos de congelado y descongelado, se centrifugaron 10 min a 2500 rpm en una centrífuga Beckam con rotor J14, y el sobrenadante se fraccionó en alícuotas que se conservaron a -70 °C hasta su uso.

3. Protocolo de obtención de MA y de CDM

Hojas verdes de *Melia Azedarach* L fueron 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 hoja 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 sometida a una cromatografía sobre sílica gel. 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 VSV. Las fracciones bioactivas eluidas con cloroformo metanol 95:5, fueron reunidas, evaporadas y luego solubilizadas en PBS para obtener una concentración final de 1 mg/ml, y almacenadas a -20°C. A estas fracciones obtenidas se las denomina MA.

CDM se purificó de hojas de *Melia azedarach* L., como fue previamente descrito (Alché *et al*, 2003). La fracción MA es sometida a una TLC, y luego mediante una HPLC en fase reversa se obtiene CDM. Se solubilizó en MM, para alcanzar una concentración final de trabajo de 1 mg/ml (1,5 mM).

4. Reactivos

LPS de *Escherichia coli* serotipo 055: B5, anticuerpo anti-TNF- α de ratón policlonal hecho en cabra, Monensin, y Concanamicina A fueron comprados en Sigma. El anticuerpo anti-IL-6 humano y la IL-6 recombinante humana fueron comprados en BD PharMingen, USA. El anticuerpo anti-gD de HSV-1 monoclonal hecho en ratón y el anti-p65 policlonal hecho en conejo fueron comprados en Santa Cruz Biotechnology, USA. El anticuerpo monoclonal anti-calnexina fue comprado en Chemicon. El anticuerpo anti-giantina humano policlonal hecho en conejo fue gentilmente provisto por la Dr. Graciela Bocaccio (Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina). El anticuerpo anti-actina fue comprado en Merck. EL secundario conjugado a peroxidasa anti-ratón y anti-conejo fueron obtenidos de ICN Immunobiological. El secundario policlonal hecho en cabra anti-IgG de conejo FluoroLinkTM CyTM2 y el policlonal hecho en cabra anti-IgG de ratón FluoroLinkTM CyTM3 fueron comprados a GE Healthcare Bio-Sciences,. El secundario anti-cabra FITC de Vector, fue gentilmente provisto por Dr. Dante Paz (FCEyN, UBA). El plásmido que codifica para el receptor de la transferrina fusionado a la proteína verde fluorescente (TfR-GFP) fue gentilmente provisto por el Dr. Alfredo Cáceres (Instituto Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, Córdoba, Argentina). La Transferrina-rodamina (Tf-Rodamina) fue gentilmente provista por la Dr. Elsa

Damonte (FCEyN, UBA). La Cicloheximida (CHX) fue gentilmente provista por la Dr. Susana Mersich (FCEyN, UBA). Los plásmidos de NF- κ B-Luciferasa, de VEGF-Luciferasa y de β -galactosidasa fueron gentilmente cedidos por integrantes del grupo de investigación del Dr. Artz (FCEyN, UBA, Argentina).

5. Ensayo de citotoxicidad y antiproliferativo

La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo colorimétrico del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma-Aldrich), descrito por Denizot y Lang (1986). Este compuesto es reducido oxidorreductasas y deshidrogenasas celulares dependientes del NAD(P)H para dar un producto azul (cristales de formazán). La cantidad de producto formado es proporcional al número de células viables presentes. Para estudiar la citotoxicidad de CDM, las células crecidas a confluencia en una microplaca de 96 pocillos fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los mismos, en MM, durante 24 h a 37 °C, en atmósfera con 4% CO₂, por triplicado. Para estudiar la actividad antiproliferativa de CDM, las células fueron crecidas en presencia de distintas concentraciones de CDM en una microplaca de 96 pocillos, e incubadas durante 24 h a 37 °C.

Al cabo de la incubación para ambos ensayos, se agregó 10 μ l de una solución de 5 μ g/ml de MTT a cada pocillo y se incubó durante 4 h a 37 °C. Finalmente, se descartaron los sobrenadantes, se disolvieron los cristales con 200 μ l de etanol, y la densidad óptica (DO) fue medida en un lector de microplacas (Eurogenetics MPR-A 4i) a 570 nm (longitud de onda de prueba) y a 630 nm (longitud de onda de referencia).

Los resultados fueron expresados como porcentajes de viabilidad celular de las células tratadas con respecto a las células sin tratar. Se determinó para la actividad antiproliferativa la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) y para la citotoxicidad la concentración citotóxica 50 (CC₅₀), definida como la concentración de compuesto que causa un 50% de reducción de la viabilidad celular.

6. Inhibición del rendimiento viral

Las células NHC, HCLE o J774A.1 crecidas a confluencia en placas de 96 pocillos se infectaron con 650 UFP de HSV-1 en 25 μ l de MM, durante 1 h a 37 °C. Luego de la adsorción, se descartó el inóculo viral y las células se incubaron con 0,1 ml de diferentes concentraciones de CDM en MM, durante 24 h a 37 °C. Luego de tres ciclos de congelado y descongelado, se cosechó el virus intra y extracelular y se cuantificó el rendimiento viral por el método de formación de placas en medio semisólido.

7. Titulación viral por plaqueo en medio semisólido

Monocapas confluentes de las células Vero fueron infectadas con 0,1 ml de las diluciones seriadas al décimo de las muestras, en placas de 24 pocillos, y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Al cabo de la adsorción, se retiró el inóculo viral y las monocapas fueron cubiertas con 0,5 ml de medio de plaqueo (E-MEM en doble concentración, 2X, suplementado con 2% de SFB inactivado, mezclado con volúmenes iguales de metilcelulosa 1,4% (Sigma-Aldrich)) e incubadas a 37 °C durante 72 h. Las células fueron fijadas con formol 10% y coloreadas con cristal violeta, y se contó el número de UFP por pocillo. Se determinaron los porcentajes de inhibición de la replicación viral en presencia de los compuestos con respecto a los controles sin tratar. Para los ensayos de inhibición del rendimiento viral, se determinó la CE_{50} (concentración efectiva 50%), definida como la concentración de compuesto que reduce en un 50% el rendimiento viral.

8. Tinción de naranja de acridina para células vivas

Las células HCLE crecidas en cubreobjetos fueron tratadas con 40 μ M de CDM por 2 h a 37 °C, y luego teñidas con naranja de acridina (1mg/ml) por 15 min a 37° C. Entonces, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y

montados en PBS, para ser visualizadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51.

9. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Las células crecidas en cubreobjetos fueron fijadas en metanol a -20 °C durante 10 min. Luego de tres lavados con PBS, los cubreobjetos fueron invertidos sobre una gota de una dilución del primer anticuerpo, e incubados durante 30 min a 37 °C, y sometidos a tres lavados adicionales con PBS. Luego, las improntas fueron incubadas con una dilución de los segundos anticuerpos, durante 30 min a 37 °C.

Para realizar una tinción de membrana, las células crecidas en cubreobjetos fueron incubadas con el primer anticuerpo por 30 min a 4 °C. Luego, las células fueron sometidas a 3 lavados con PBS frío y fijadas con metanol a -20°C por 10 min. Entonces, las células fueron incubadas con el segundo anticuerpo por 30 min a 37 °C.

Finalmente, los cubreobjetos fueron enjuagados primero con PBS y luego con agua destilada, montados con glicerina tamponada y observados en un microscopio Olympus BX51 con óptica epifluorescente o con un microscopio confocal Olympus FB300.

10. Análisis cuantitativo de la fluorescencia

Las imágenes obtenidas fueron importadas al programa NIH ImageJ 1.34s (diseñado por Wayne Rasband, NIMH, Bethesda). Las imágenes de inmunofluorescencia fueron convertidas a una escala de grises de 8-bit desde 0 (negro) a 255 (blanco). Se analizó la fluorescencia total y nuclear de cada célula individual y se obtuvo para cada una la densidad de fluorescencia media. Para comparar la distribución de la fluorescencia dentro de la célula, los resultados fueron analizados en una planilla de cálculo (Excel®). La intensidad de fluorescencia total o nuclear fue calculada como la densidad media total o nuclear por el área total o nuclear, respectivamente. Luego, se calcularon los

porcentajes de intensidad nuclear o los porcentajes de intensidad nuclear con respecto a la intensidad total, para cada célula. Las células no estimuladas fueron procesadas para establecer un valor basal de fluorescencia nuclear (valor de corte).

11. Transfecciones

Las células fueron transfectadas con los plásmidos en medio Opti-MEM sin suero y sin antibiótico, en presencia de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como reactivo de transfección, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las células crecidas en cubreobjetos y transfectadas con el plásmido que codifica para el TfR-GFP, fueron fijadas con metanol por 10 min a -20°C . Después de tres lavados con PBS, los cubreobjetos fueron procesados para una IFI o montados, y fotografiados en un microscopio Olympus BX51 con óptica epifluorescente o con un microscopio confocal Olympus FB300.

Las células transfectadas con los plásmidos de NF- κ B-Luciferasa, de VEGF-Luciferasa y de β -galactosidasa, luego de 6 h de incubación a 37°C , se les descartó el medio y se reemplazó por medio Opti-MEM fresco, con 10% de SFB, sin antibiótico, y se incubó a 37°C durante 24 h. Luego, las células fueron estimuladas o infectadas y después de la incubación, se descartó el medio y las células se levantaron con $50\ \mu\text{l}$ por pocillo de buffer de lisis 1 X, raspando con rastrillo. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su procesamiento. Para medir la actividad de luciferasa en las muestras, se mezclaron $20\ \mu\text{l}$ de muestra con $80\ \mu\text{l}$ de sustrato para la luciferasa de luciérnaga y se midieron en un luminómetro. En las mismas muestras, se midió la actividad β -galactosidasa, en microplacas de 96 pocillos. Para ello, se mezclaron $20\ \mu\text{l}$ de cada muestra con $80\ \mu\text{l}$ de sustrato para β -galactosidasa y se incubaron a 37°C hasta que se desarrollara color (aproximadamente 6 h). La lectura de las absorbancias de las mezclas se realizó en un lector de ELISA, a $450\ \text{nm}$. Se determinó la expresión de luciferasa como reportero de la actividad promotora de NF- κ B o VEGF, normalizando los valores obtenidos con las lecturas de la actividad de β -galactosidasa para cada muestra.

12. Incorporación de transferrina

Las células crecidas en cubreobjetos fueron transfectadas con el plásmido que codifica para el TfR-GFP. Después de los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS, incubadas con Transferrina-Rodamina (Tf-Rodamina) (15 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 min a 37°C y luego fijadas con metanol. Finalmente, los cubreobjetos fueron lavados, montados y fotografiados con un microscopio confocal Olympus FB300.

13. Western blot (WB)

Los extractos de células crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron cargados en geles de 10% de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), y luego de la corrida electroforética fueron transferidos a membranas de polyvinylidene fluoride (PVDF) por 60 min a 75mA. Luego, las membranas fueron bloqueadas en PBS con 5% de leche descremada a 4 °C ON. Después, se incubaron las membranas con un anticuerpo primario por 2 h a 37°C, se lavaron, y fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa por 1,5 h a 37°C. Las bandas inmunorreactivas fueron visualizadas utilizando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Perkin Elmer). Calnexina y actina fueron utilizados como controles de carga.

14. Cuantificación de citoquinas

Los sobrenadantes de cultivo fueron cosechados, centrifugados por 10 min a 1000 rpm en una centrífuga Beckman con rotor J14, y guardados a -70 °C hasta su uso. Los niveles de TNF- α e IL-6 humanas y de TNF- α e IL-6 de ratón, se midieron por medio de inmunoensayos enzimáticos (ELISAs) comerciales (BD OptEIA™, Becton Dickinson, USA). Alternativamente, el TNF- α de ratón también se cuantificó por medio de un ensayo biológico, midiendo la citotoxicidad de dicha citoquina en las células L929, según describen Decker *et al* (1987), con pequeñas modificaciones. Las monocapas de células L929

cultivadas en microplacas de 96 pocillos (2×10^4 células/pocillo) durante 24 h a 37 °C, se incubaron con diluciones seriadas al medio de las muestras estudiadas, en medio sin suero, durante 22 h, a 38,5 °C, con 5 µg/ml de Actinomicina D (AcD) (Sidus). Las células fueron fijadas con formol 10% y coloreadas con cristal violeta 0,05% (en H₂O:etanol, 9:1). El colorante se solubilizó en una solución de ácido acético glacial 0,01% en una mezcla de etanol:H₂O (1:1), y la DO fue medida a una longitud de onda de 580 nm, en un lector de microplacas (Eurogenetics MPR-A 4i). Las lecturas obtenidas fueron comparadas a las de una curva patrón de TNF- α recombinante de ratón (Sigma-Aldrich), para establecer los niveles de citoquina en cada muestra. El bioensayo fue específico para TNF- α ya que la actividad fue neutralizada por un anticuerpo anti-TNF- α . Se utilizó el test de Student para el análisis estadístico de los datos.

15. Ensayo de migración celular en Transwell

En la cámara inferior del Transwell (Costar) se colocaron 600 µl de medio que contiene distintos estímulos. En la cámara superior se sembraron 100µl de medio con las células (4×10^4 células/ pocillo) en presencia o ausencia de CDM en las concentraciones indicadas. A las 24 h las células que migraron fueron teñidas con cristal violeta, fotografiadas y contabilizadas. El porcentaje de migración celular fue determinado según lo cuantificado en las células sin tratar. Se utilizó el test de Student para el análisis estadístico de los datos.

16. Ensayo de formación de tubos capilares en Matrigel

Los pocillos de microplacas de 24 pocillos fueron cubiertos con 90 µl de Matrigel (BD Biosciences), e incubados a 37°C por 30 min. Las células HUVEC (8×10^4 células) fueron sembradas en el pocillo recubierto en matrigel, en presencia o no de distintas concentraciones de reactivos. Luego de incubar las células por 24 h a 37°C, las células fueron fotografiadas y se contaron los tubos capilares formados, o se incubaron por otras 24 h en presencia de

reactivos o no, para luego contabilizar el número de tubos formados. Las estructuras tubulares fueron cuantificadas por conteo manual de un mínimo de 3 campos, y el porcentaje de inhibición fue expresado considerando los pocillos sin tratar como el 100%. Se utilizó el test de Student para el análisis estadístico de los datos.

17. Ensayo de inflamación cutánea inducida por radiación ultravioleta (UV) en ratones.

Se utilizaron ratones machos y hembras alopecicos Crl:SKH-1-hrBR de ocho semanas de edad, comprados en Charles River Laboratories (Boston, MA, USA). Los ratones fueron anestesiados con ketamina (Ketalar, Parke-Davis, Morris Plains, NJ) y xylazina (Rompun, Mobay, Shantee, KA) por vía intraperitoneal, e irradiados con 200 mJ/cm² de radiación UVB (280–320 nm), usando una lámpara 8 W UVM-28 Mid-Range Wave (Ultraviolet Products), que emite la mayor parte de su energía en el rango UVB (espectro de emisión 280–370 nm), con un pico de emisión a 302 nm. El tratamiento consistió en la administración tópica de una solución de MA en la espalda de los ratones, 1 vez por día durante 3 días consecutivos luego de la irradiación. Al cabo de este lapso, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de epidermis y dermis que fueron homogeneizadas en buffer Tris-CIH 50 mM pH 8 con 0,05% de Tritón X-100. Las muestras obtenidas fueron congeladas a -70 °C hasta su procesamiento. La cuantificación de las citoquinas TNF- α e IL-6 en las muestras se realizó mediante ELISA, mientras que la concentración de proteína se determinó con la técnica de Bradford (Sigma), de manera que los valores de concentración de las citoquinas se relativizaron con la concentración de proteínas de cada extracto. Se realizó un ANOVA seguido del test de Newman–Keuls para el análisis estadístico de los datos. Los animales fueron manejados de acuerdo a las guía para el cuidado de los animales del National Institute of Health (EEUU).

RESULTADOS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL E INMUNOMODULADORA
DE CDM**

1.1 Evaluación de la actividad antiviral de CDM en células epiteliales e inmunes

La QH es una enfermedad que se produce por una respuesta inflamatoria que ocurre en el ojo humano como secuela de la infección causada por el HSV-1. Se trata, entonces, de una inmunopatología originada por la infección con HSV-1 que reúne componentes virales e inflamatorios.

La superficie ocular está constituida por el epitelio de la córnea y de la conjuntiva que presentan una estrecha continuidad histológica y están ligados funcionalmente (Gipson *et al*, 1997). Las células de córnea constituyen el principal blanco de multiplicación del virus y la conjuntiva permite la diseminación viral (Biswas *et al*, 2006; Akhtar *et al*, 2008).

Si bien las células epiteliales constituyen la primera línea de defensa frente a la infección ocular con HSV-1, los macrófagos también cumplen un rol crucial al ser una de las células dominantes en la infiltración de la córnea infectada (Mott *et al*, 2007). Durante la infección con HSV-1, los macrófagos producen diversas moléculas con potencial actividad antiviral, como por ejemplo las sustancias reactivas del oxígeno, IFN α/β , TNF- α e IL-6, siendo de vital importancia para la eliminación del virus (Ellerman-Eriksen *et al*, 2005). Aún más, se ha demostrado que la supresión selectiva de los macrófagos subconjuntivales lograda con el tratamiento tópico en el ojo con difosfonato de diclorometileno antes de la infección con HSV-1, incrementa notablemente el título viral y retarda la eliminación del virus del ojo infectado, indicando que su participación en los primeros días post-infección es crítica (Cheng *et al*, 2000; Biswas *et al*, 2006).

El principio activo parcialmente purificado MA disminuye la carga viral en el modelo murino de la QH, reduciendo significativamente la incidencia y la severidad de la enfermedad (Pifarré *et al*, 2002). Considerando el papel de las células epiteliales y de los macrófagos durante la infección, resulta de interés evaluar si el compuesto puro (CDM) presenta un efecto antiviral en las células de córnea humana (HCLE), de conjuntiva humana (NHC) y en los macrófagos murinos (J774A.1) infectados con HSV-1.

Dado que en células epiteliales del tejido ocular (HCLE y NHC) HSV-1 provoca infecciones productivas (Michellini, 2009 tesis doctoral), decidimos investigar la susceptibilidad de células inmunes como los macrófagos (J774A.1) a la infección con HSV-1.

Para ello, células J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con una multiplicidad de infección (m.i.) de 0,1 y otra de 1 de la cepa KOS de HSV-1. A distintos tiempos p.i., se cosechó el virus intra y extracelular y se tituló la infectividad viral por el método de formación de placas en células Vero.

En esta línea celular no se observó la formación de focos de acción citopática característicos de HSV-1, sino que el efecto viral se evidenció a través del desprendimiento de las células de su soporte.

A las 12 h p.i., se detecta virus infectivo luego de la infección con ambas multiplicidades, siendo significativamente mayor el título con la m.i. de 1 en comparación con la m.i. de 0,1. A las 18 y 24 h p.i. el título viral aumenta significativamente con ambas m.i., mientras que a las 48 h p.i. se alcanza el máximo título viral sin diferencias significativas entre ambas m.i. (Figura 1).

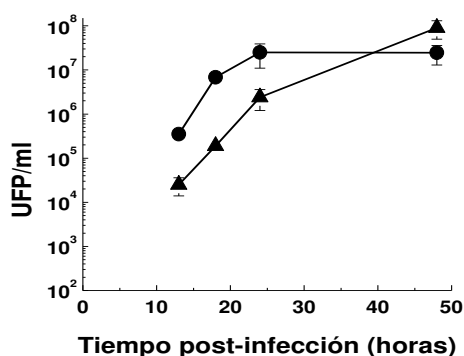


Figura 1. Curva de crecimiento de HSV-1 en las células J774A.1. Células J774A.1 fueron infectadas con una m.i. de 0,1 (▲) y 1 (●) e incubadas a 37 °C. A diferentes tiempos p.i. se cosechó el virus intra y extracelular y se determinaron los títulos virales mediante el ensayo de formación de placas.

Por lo tanto, las células J774A.1 resultaron ser un sustrato adecuado para la multiplicación de HSV-1, dado que se obtuvieron altos títulos con ambas multiplicidades de infección (Figura 1). Entonces, considerando que las

tres líneas celulares son susceptibles a la infección con HSV-1, se procedió a investigar la citotoxicidad y el efecto antiviral de CDM.

Los resultados obtenidos demuestran que CDM no presentó citotoxicidad en las células HCLE, J774A.1 y NHC y en las mismas concentraciones ensayadas para determinar la actividad antiviral, por el método de MTT. La CC_{50} resultó mayor a 100 μ M en los tres tipos celulares.

Previamente se había reportado que 75 μ M de CDM inhibe en un 90% la replicación de HSV-1 en las células NHC, en ausencia de citotoxicidad (Barquero *et al*, 2006).

Con el objeto de establecer la CE_{50} de CDM en las tres líneas celulares, se procedió a realizar una curva dosis-respuesta. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de inhibición del rendimiento de HSV-1. Las células crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con una m.i. de 0,067 de la cepa KOS de HSV-1 y, luego de la infección, se incubaron durante 24 h con diferentes concentraciones de CDM. Se cosechó el virus intra y extracelular y se tituló el rendimiento viral mediante el método de formación de placas en células Vero.

Se observa que cuando las células HCLE, J774A.1 y NHC infectadas con HSV-1 fueron tratadas con distintas concentraciones de CDM, ocurrió una inhibición de la multiplicación viral dependiente de la concentración, siendo las CE_{50} de 0,78, 4,6 y 5,8 μ M para las células HCLE, J774A.1, y NHC, respectivamente (Figura 2).

El epitelio de la córnea es el principal sustrato para la replicación de HSV-1 y es justamente donde CDM exhibió la mayor CE_{50} . Esta inhibición de la multiplicación de HSV-1 por CDM podría explicar la reducción de la carga viral en los ojos de los ratones infectados y tratados con MA (Pifarré *et al*, 2002).

Por otra parte, se demostró que CDM ejerce su efecto antiviral afectando el tráfico intracelular de gB, gC y gD de HSV-1 en células Vero y NHC cuando se agrega luego de la infección (Barquero *et al*, 2004 y 2006). Con el objeto de estudiar el efecto de CDM en el transporte de glicoproteínas virales en las células HCLE, estas células fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=2) y tratadas con 40 μ M de CDM. Mediante una inmunofluorescencia (IFI) con anticuerpos específicos anti-gD se encontró que la gD de HSV-1 presentó una localización

perinuclear, análoga a la reportada previamente (Barquero *et al*, 2004 y 2006) (Figura 3).

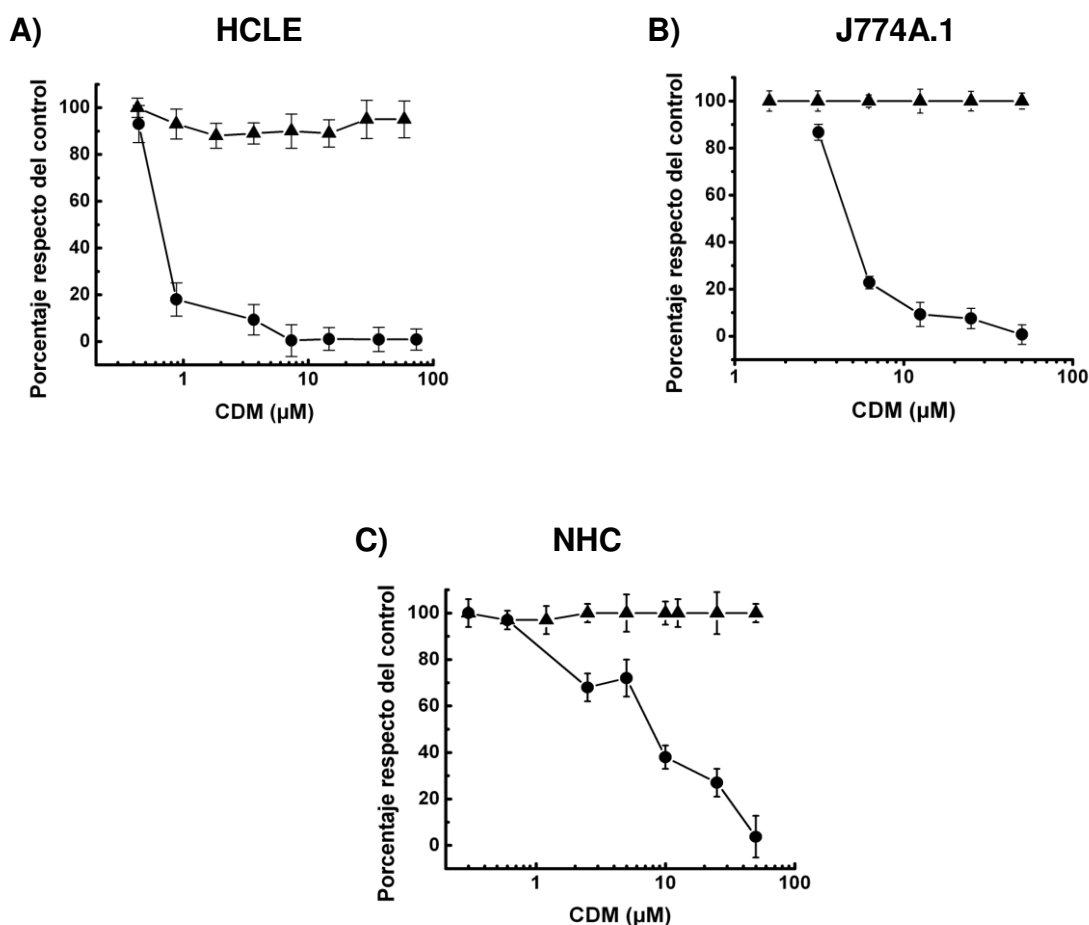


Figura 2. Curva dosis-respuesta para la determinación de la citotoxicidad y la actividad anti-HSV-1 de CDM en células A)HCLE, B) J774A.1 y C) NHC. La citotoxicidad fue determinada por medio del ensayo colorimétrico del MTT, y se graficó el porcentaje de viabilidad en función de la concentración (▲). Para la determinación de la actividad antiviral, células A) HCLE, B) J774A.1 y C) NHC infectadas con HSV-1 fueron incubadas con distintas concentraciones de CDM y, luego de 24 h de incubación a 37°C, se determinó el rendimiento viral mediante el ensayo de formación de placas. Se graficaron los porcentajes de inhibición del rendimiento viral en función de la concentración (●).

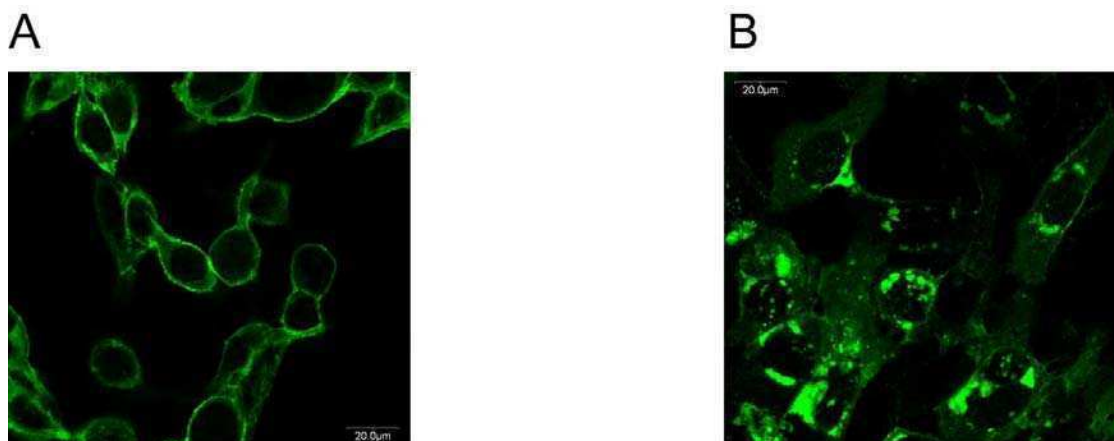


Figura 3. Efecto de CDM sobre la localización intracelular de gD en células HCLE. Células HCLE infectadas con HSV-1 fueron tratadas con 40 μ M de CDM (B) o no (A) y luego de 13 h p.i. la localización intracelular de gD fue visualizada por IFI. Aumento 400x.

La inhibición del transporte de glicoproteínas puede estar asociada a la perturbación del pH ácido intracelular de las organelas (Sidhu *et al*, 1999). Aunque el mecanismo por el cual CDM afecta la vía exocítica no se ha resuelto, está descrito que provoca la basificación del pH endosomal en células Vero y NHC (Barquero *et al*, 2004 y 2006).

Con el objeto de determinar si CDM también afecta el pH endosomal en las células HCLE, se realizó una tinción con naranja de acridina. Para ello, células HCLE crecidas en cubreobjetos en microplacas de 24 pocillos, fueron tratadas o no con 40 μ M de CDM por 2 h, y luego teñidas con el colorante. La fluorescencia vital de naranja de acridina reveló que las células sin tratar exhibieron un patrón puntillado naranja concentrado en las vesículas ácidas. Por el contrario, el pH ácido de las vesículas intracelulares fue marcadamente afectado en las células tratadas con CDM, ya que no se observó la fluorescencia granular naranja característica de las vesículas ácidas (Figura 4).

En consecuencia, CDM también modificó el pH de las vesículas citoplasmáticas afectando el transporte intracelular de la gD de HSV-1 en las células HCLE. Por lo tanto, CDM exhibió actividad antiviral en las células HCLE ejerciendo un efecto análogo al observado en las células NHC y Vero (Barquero *et al*, 2004 y 2006).

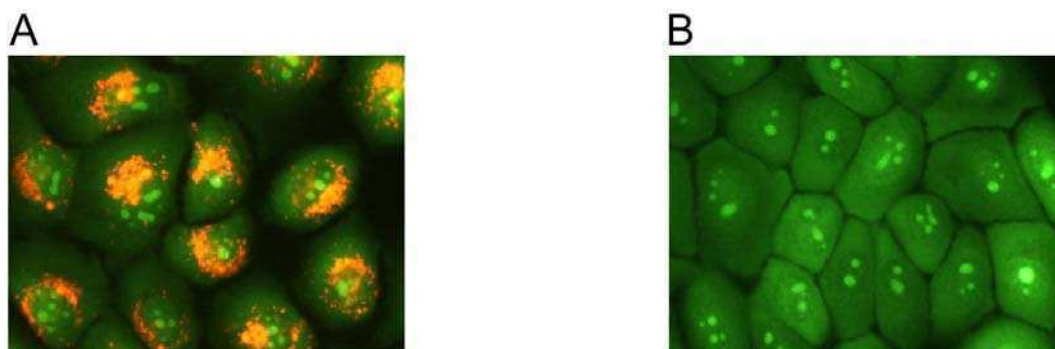


Figura 4. Efecto de CDM sobre el pH endosomal en células HCLE. Células HCLE fueron tratadas con 40 μ M de CDM (B) o no (A) y luego de 2 h p.t. las células fueron teñidas y visualizadas en un microscopio de epifluorescencia. Aumento 400x.

1.2. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de CDM en células epiteliales e inmunes

MA inhibe el desarrollo de la QH en ratones cuando es suministrado en forma tópica antes, inmediatamente después o hasta 96 h después de la infección con HSV-1. Esto sugiere que actúa como antiviral cuando es administrado antes o inmediatamente después de la inoculación, y ejercería un efecto antiinflamatorio cuando se aplica a partir del día 4 p.i., ya que, para entonces, no se detecta HSV-1 infectivo en los ojos de los ratones (Pifarré *et al*, 2002).

A lo largo del progreso de la QH, las células epiteliales de la córnea y de la conjuntiva están involucradas en la respuesta inmune innata al constituir la primera barrera de defensa contra el HSV-1 (Gamache *et al*, 1997; Li *et al*, 2006). Las células de córnea secretan citoquinas proinflamatorias tales como el TNF- α y la IL-6 en respuesta a la infección, y las células de conjuntiva intervienen amplificando el proceso inflamatorio (Biswas *et al*, 2006; Deshpande *et al*, 2004; Kase *et al*, 2004). En el desarrollo de la inmunopatología, dichas citoquinas participan y modulan la evolución de la enfermedad (Biswas *et al*, 2006; Li *et al*, 2006; Wuest y Carr, 2008).

Si bien las células epiteliales tienen un papel importante en la respuesta inmune innata, los macrófagos también contribuyen en dicha respuesta siendo de vital importancia para la eliminación del virus en el ojo infectado (Cheng *et al*, 2000; Biswas *et al*, 2006). Por otro lado, los macrófagos son importantes en

el procesamiento y en la presentación antigénica a LT, por lo que exhiben un rol fundamental no sólo en la regulación de la respuesta inmune innata, sino también en la adaptativa. La eliminación de macrófagos conjuntivales provoca una disminución de la secreción de citoquinas y de la presentación antigénica a LT, reduciendo la incidencia y la severidad de la enfermedad. En consecuencia, los macrófagos son importantes en la inmunopatología de la QH, ya que no sólo participan en la eliminación del virus, sino también en el desarrollo de la enfermedad, como una fuente de citoquinas y factores angiogénicos (Bauer *et al*, 2002; Biswas *et al*, 2006).

En el proceso de amplificación de la respuesta inflamatoria, el NF- κ B es un factor de transcripción involucrado frente a una amplia variedad de estímulos, incluidas las infecciones virales (Ghosh *et al*, 1998). La infección con HSV-1 produce la activación del NF- κ B, induciendo una translocación nuclear persistente de dicho factor. El NF- κ B está involucrado en la expresión de genes virales de HSV-1, en el bloqueo de la muerte por apoptosis de las células infectadas, y en la producción de citoquinas proinflamatorias (Goodkin *et al*, 2003; Pahl *et al*, 1999; Ghosh *et al*, 1998).

En vista de la estrecha relación que existe entre la infección con HSV-1 y la activación de NF- κ B, y de la importancia de este factor de transcripción en la respuesta inmune, resultó interesante estudiar el efecto de CDM sobre la activación de NF- κ B inducida por HSV-1 y sobre la producción de citoquinas proinflamatorias desencadenadas por este factor de transcripción en células epiteliales y macrófagos.

1.2.1. ¿CDM ejerce algún efecto en la activación de NF- κ B en células epiteliales e inmunes infectadas con HSV-1?

La translocación de NF- κ B al núcleo celular inducida por HSV-1 es precedida por la degradación proteolítica de su inhibidor en el citoplasma, I κ B α . En consecuencia, se analizó inicialmente el efecto de CDM sobre la degradación de su inhibidor en células infectadas con HSV-1.

Para ello, células NHC, HCLE y J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=1) y fueron tratadas o no con 40 μ M de CDM. A las 24 h p.i., fueron lisadas y sometidas a un SDS-PAGE y luego a un inmunoblotting con anticuerpos anti-I κ B α . En la Figura 5 observamos que el inhibidor fue completamente degradado después de la infección con HSV-1 en las tres líneas celulares (Figura 5; calles 2, 6 y 10), mientras que CDM inhibió la degradación inducida por HSV-1 (Figura 5; calles 4, 8 y 12). Por otro lado, CDM no indujo por sí mismo la degradación de I κ B α en las células sin infectar (Figura 5; calles 3, 7 y 11).

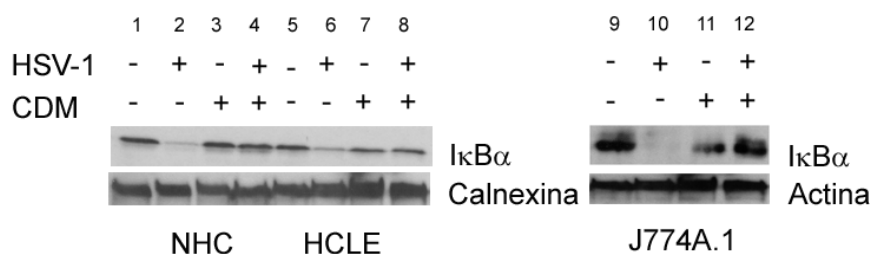


Figura 5. Efecto de CDM en la degradación de I κ B α inducida por HSV-1 en células NHC, HCLE y J774A.1. Células NHC, HCLE y J774A.1 fueron infectadas con HSV-1 y tratadas con CDM (40 μ M), y a las 24 h p.i. fueron lisadas y procesadas para ser sometidas a un Western Blot con anticuerpos anti-I κ B α , y anti-calnexina para las células NHC y HCLE, y anti-actina para las células J774A.1.

Previamente, se había observado que CDM inhibe la translocación al núcleo de NF- κ B en células NHC infectadas con HSV-1 (Barquero *et al*, 2006). Con este antecedente, se evaluó si CDM inhibe la translocación nuclear del NF- κ B en las células HCLE y J774A.1 infectadas.

Para ello las células HCLE y J774A.1, crecidas en cubreobjetos dentro de microplacas de 24 pocillos, fueron infectadas con una m.i. de 1 de la cepa KOS de HSV-1 y tratadas o no con 40 μ M CDM luego de la infección. Al cabo de 24 h p.i., se fijaron las células y se estudió la ubicación intracelular de la subunidad p65 del NF- κ B mediante una IFI con anticuerpos específicos anti-p65.

Las células tratadas con CDM no exhibieron translocación al núcleo de NF- κ B en ambas líneas celulares, mientras que la mayoría de las células

presentó translocación del factor cuando fueron infectadas con HSV-1 (Figura 6). Por otro lado, se observó una reducción en el número de células con fluorescencia nuclear correspondiente a la subunidad p65 en las células infectadas y tratadas con CDM, con respecto al control infectado sin tratar (Figura 6). Para corroborar las observaciones cualitativas realizadas, se llevó a cabo un análisis semicuantitativo en las imágenes obtenidas. A partir de las imágenes de las células sin infectar se estableció un valor de fluorescencia nuclear basal por encima del cual se consideraría a las células positivas para la translocación nuclear de p65. Los controles de las células no infectadas presentaron un valor basal de fluorescencia positiva de p65 en el núcleo de $19,7 \pm 8,3\%$ y $15,4 \pm 5,6\%$ para las células HCLE y J774A.1, respectivamente. Por lo tanto, toda célula que exhibiese un porcentaje de fluorescencia nuclear de p65 mayor a 28% y a 21% fue considerada positiva para la translocación de NF- κ B al núcleo de las células HCLE y J774A.1, respectivamente. En cada caso, se analizaron tres campos de entre 100 y 130 células.

La mayoría de las células HCLE y J774A.1 infectadas con HSV-1 mostraron fluorescencia nuclear de p65 (92% y 82% para las células HCLE y J774A.1, respectivamente), mientras que CDM inhibió la translocación, ya que sólo el 20% de las células HCLE y el 17% de las células J774A.1 infectadas y tratadas presentaron fluorescencia de p65 en el núcleo.

Frente a estos resultados, fue necesario establecer si el efecto inhibitorio de CDM sobre la translocación de NF- κ B se debía a su acción antiviral previamente descrita o a un efecto biológico diferente. Para tal fin, se realizó una marcación doble usando la técnica de IFI con el objeto de visualizar la gD de HSV-1 de manera simultánea a la detección de NF- κ B en las células HCLE. En la Figura 7 se observa que la fluorescencia de p65 en el núcleo de las células infectadas se encontró asociado a la expresión de gD. Cuando las células HCLE fueron infectadas y tratadas con CDM, tanto p65 como gD fueron visualizados coincidentemente en unos pequeños focos de efecto citopático (Figura 7). Es decir, aquellas células que estaban infectadas y por lo tanto expresaban gD, también presentaron translocación nuclear de p65.

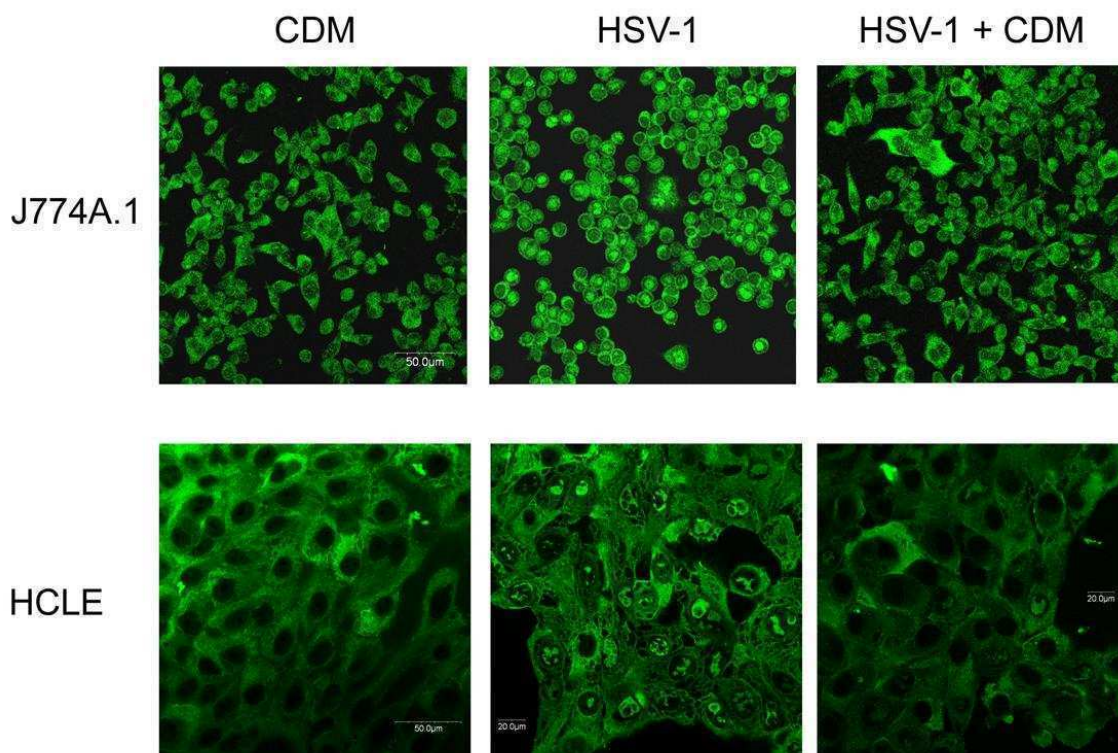


Figura 6. Efecto de CDM sobre la translocación de NF- κ B en células HCLE y J774A.1 infectadas con HSV-1. Células HCLE y J774A.1 fueron infectadas con una m.i. de 1 y tratadas con CDM (40 μ M). Luego de 24 h de incubación a 37°C, se detectó la localización intracelular de p65 por medio de una IFI, utilizando anticuerpos específicos. Las fotografías fueron obtenidas en un microscopio confocal. Aumento 400x para las células J774A.1, y 600x para las células HCLE.

De acuerdo a estas observaciones, el efecto inhibitorio de CDM sobre la translocación de NF- κ B sería consecuencia de su efecto antiviral y no de un efecto directo sobre el NF- κ B.

Dado que CDM impidió la translocación de p65 al núcleo de las células infectadas, entonces se decidió verificar que también inhibía la activación transcripcional del NF- κ B. Para ello se transfectaron células HCLE con un plásmido reportero de la actividad de NF- κ B que expresa luciferasa (NF- κ B-LUC). Además, las células fueron co-transfectadas con un plásmido que expresa la enzima β -galactosidasa como manera de normalizar la transfección con sus valores de actividad, expresando entonces los resultados en unidades relativas de luciferasa (URL).

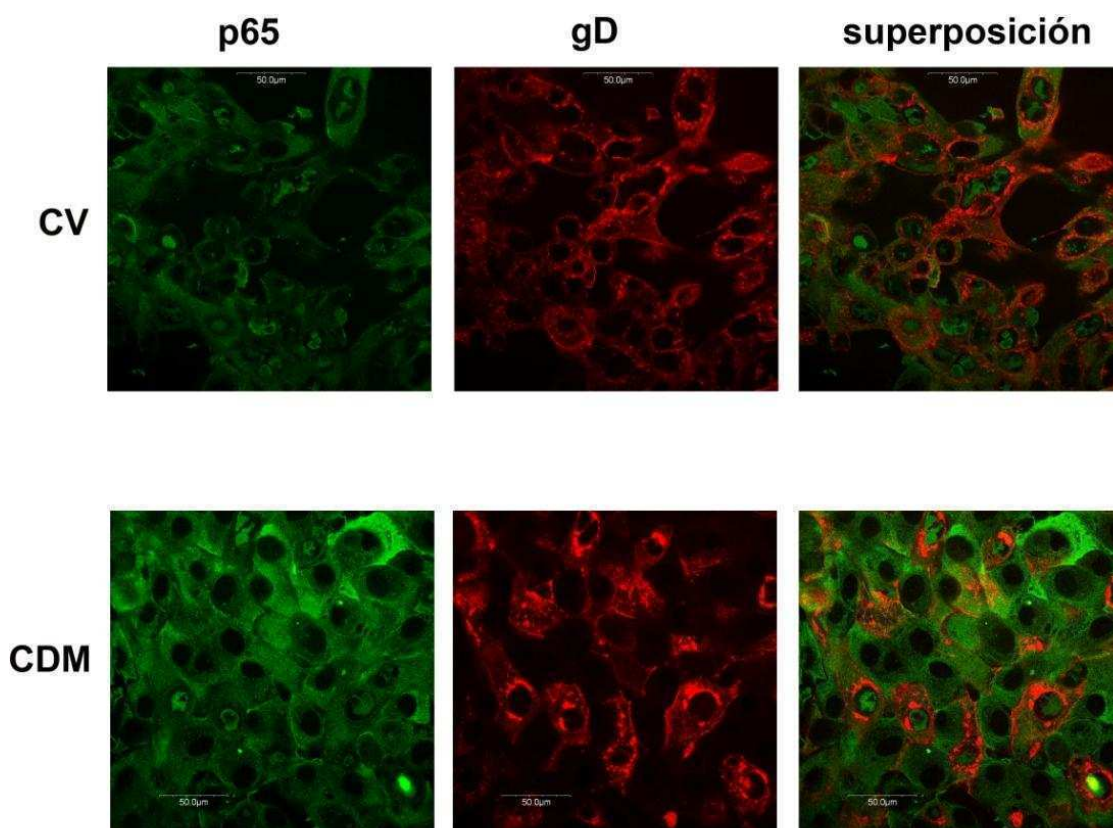


Figura 7. Efecto de CDM sobre la translocación de NF- κ B y la expresión de gD viral en células HCLE infectadas con HSV-1. Células HCLE fueron infectadas con una m.i. de 1 y tratadas con CDM (40 μ M) o no (CV). Luego de 24 h de incubación a 37°C, se detectó la localización intracelular de p65 y gD por medio de una IFI doble, utilizando anticuerpos específicos. Las fotografías fueron obtenidas en un microscopio confocal. Aumento 600x.

La activación transcripcional del NF- κ B en células infectadas con HSV-1 ha sido reportada mediante varias técnicas, pero no está descrita mediante plásmidos reporteros (Melchjorsen, *et al* 2006; Amici *et al*, 2006). Entonces, dado que está descrita una fase de activación del NF- κ B a partir de las 4-6 h, permaneciendo en estado activo durante al menos 24 h en células epiteliales y macrófagos infectados con HSV-1, se evaluó la activación del NF- κ B en células NHC, HCLE y J774A.1 a las 8 y 16 h p.i. (Melchjorsen, *et al* 2006; Amici *et al*, 2006).

Para ello, las células HCLE, NHC y J774A.1 fueron crecidas en microplacas de 24 pocillos y transfectadas con plásmidos reporteros de NF- κ B-LUC y de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección, las células fueron infectadas con una m.i. de 1 de la cepa KOS de HSV-1 e incubadas durante 8 y 16 h. Luego, las células fueron procesadas y se determinó la expresión de

luciferasa como reportero de la actividad de NF- κ B normalizando los valores obtenidos con los correspondientes a la actividad de β -galactosidasa.

En el Cuadro 1 se muestran los valores de expresión de luciferasa obtenidas en cada condición de infección. En las células NHC y J774A.1 no se observaron diferencias significativas en ninguno de los dos tiempos ensayados, mientras que en las células HCLE se observaron diferencias significativas respecto del control sin infectar a las 16 p.i. ($p < 0,05$) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Expresión del NF- κ B en células infectadas

	Línea celular		
	J774A.1	HCLE	NHC
	URL (Unidades relativas de luciferasa)		
CC	11029 \pm 1225	1427 \pm 192	408417 \pm 5509
HSV-1 8 h	13265 \pm 987	3456 \pm 238	567890 \pm 2123
HSV-1 16 h	12534 \pm 1296	7934 \pm 1025 *	513045 \pm 1176

Células J774A.1, HCLE y NHC fueron co-transfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B-LUC y con un plásmido control de β -galactosidasa. A las 24 h p.t. fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=1) durante 8 y 16 h. A los extractos celulares se les determinó la actividad de luciferasa y los valores fueron normalizados con la actividad de β -galactosidasa (URL). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. * indica diferencias significativas respecto al CC ($p < 0,05$).

En consecuencia, se evaluó la actividad del NF- κ B en las células HCLE infectadas con HSV-1 y tratadas con CDM durante 16 h. Para ello, las células HCLE crecidas en microplacas de 24 pocillos, fueron transfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B-LUC y uno de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección, las células fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=1), y tratadas o no con 40 μ M de CDM. A las 16 h p.i. se midió la actividad de NF- κ B y se normalizó con los valores de actividad de β -galactosidasa.

CDM no provocó la activación de NF- κ B *per se*, ya que no se detectaron diferencias significativas entre el valor basal de activación del NF- κ B y el obtenido en presencia de CDM (Figura 8).

Cuando las células fueron infectadas con HSV-1 durante 16 h, la activación del NF- κ B se incrementó significativamente ($p < 0,05$), mientras que CDM produjo una reducción significativa de los valores de dicha actividad ($p < 0,05$) (Figura 8).

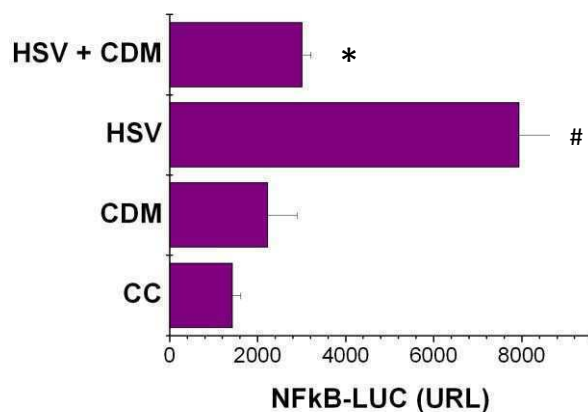


Figura 8. Efecto de CDM en la activación transcripcional de NF- κ B en células HCLE infectadas con HSV-1. Células HCLE fueron co-transfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B-LUC y con un plásmido control de β -galactosidasa. A las 24 h p.t. fueron tratadas con CDM (40 μ M) e infectadas con HSV-1 durante 16 h. A los extractos celulares se les determinó la actividad de luciferasa y los valores fueron normalizados con la actividad de β -galactosidasa (URL). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # y * indican diferencias significativas respecto al CC y a la infección, respectivamente ($p < 0,05$).

Por lo tanto, CDM redujo la activación transcripcional del NF- κ B en las células infectadas con HSV-1 como consecuencia de la inhibición de la degradación proteolítica de I κ B α y de la translocación al núcleo del NF- κ B, probablemente como consecuencia de su actividad antiviral.

1.2.2. ¿CDM afecta la producción de citoquinas en células epiteliales y macrófagos infectados con HSV-1?

La inhibición de la activación del NF- κ B en las células infectadas con HSV-1 por parte de CDM podría tener efectos inhibitorios sobre la liberación de las citoquinas reguladas por este factor de transcripción.

HSV-1 es capaz de activar el factor NF- κ B en una línea celular de córnea humana y de inducir la producción de IL-6 y TNF- α entre otras citoquinas (Li *et al*, 2006). Sin embargo, aunque las células NHC y HCLE producen IL-6 luego de la infección con HSV-1, no producen TNF- α (Michelini *et al*, 2007). Por otro lado, la infección con HSV-1 desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 y el TNF- α en los macrófagos (Biswas y Rouse, 2005; Melchjorsen *et al*, 2006).

Entonces, considerando estos antecedentes, se estudió el efecto de CDM sobre la producción de IL-6 en las células NHC y HCLE infectadas con HSV-1, y sobre la producción de IL-6 y TNF- α en las células J774A.1 infectadas.

Para ello, las células NHC, HCLE y J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con una m.i. de 1 de la cepa KOS de HSV-1, y luego de la infección, se trataron con 40 μ M de CDM. Al cabo de 24 h, se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó la IL-6 mediante un ELISA. En los macrófagos se determinó la producción de TNF- α mediante un ensayo biológico de toxicidad en células L929 (Ver Materiales y Métodos).

No se detectaron diferencias significativas entre la IL-6 producida en células NHC y HCLE sin tratar y las células tratadas con CDM, mientras que en las células J774A.1 la concentración de IL-6 disminuyó significativamente en las células tratadas con CDM con respecto a las células sin tratar ($p < 0,01$) (Figura 9).

Cuando los tres tipos celulares fueron infectados con HSV-1, la producción de IL-6 fue significativamente mayor en relación a las células sin infectar ($p < 0,01$). Este incremento se redujo significativamente cuando CDM fue agregado a las células infectadas con HSV-1 ($p < 0,005$).

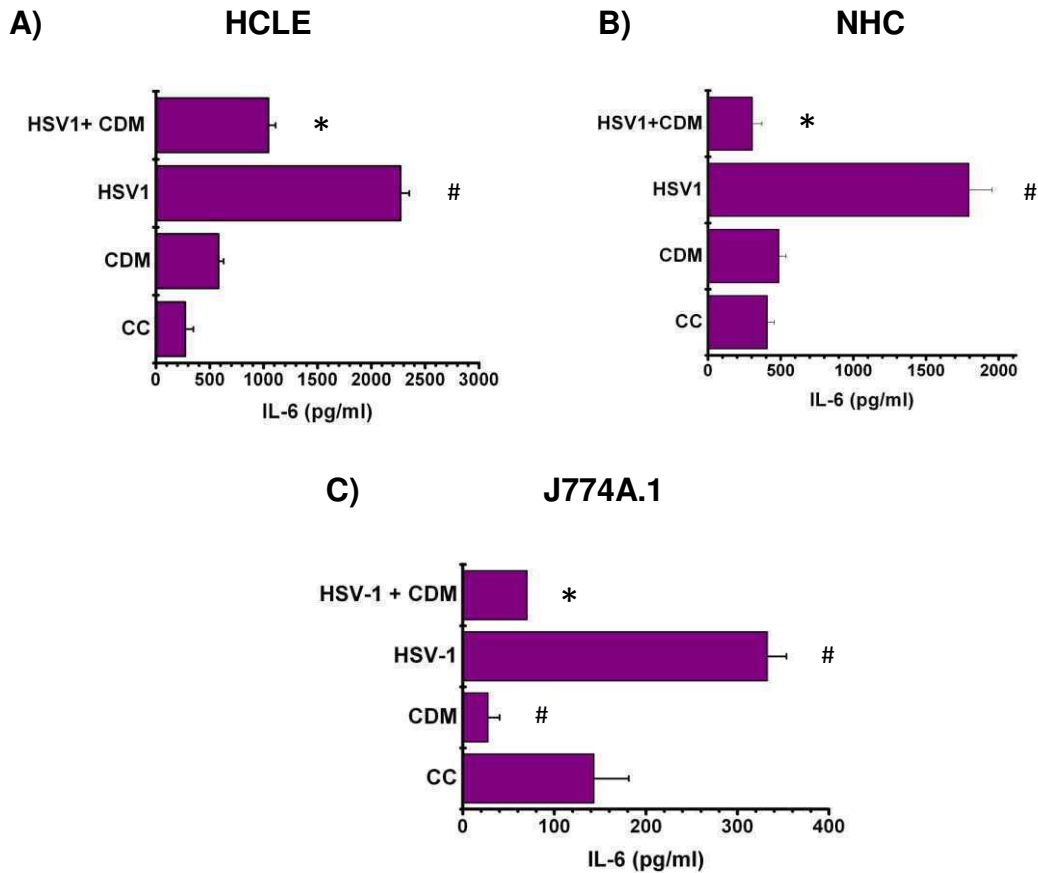


Figura 9. Efecto de CDM sobre la producción de IL-6 inducida por HSV-1 en células NHC, HCLE y J774A.1. Células NHC, HCLE y J774A.1 fueron infectadas con HSV-1 y tratadas con CDM (40 μ M). A las 24 h p.i. la IL-6 se cuantificó por un ELISA. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # y * indican diferencias significativas respecto al control de células y a la infección, respectivamente (Los valores de p figuran en el texto).

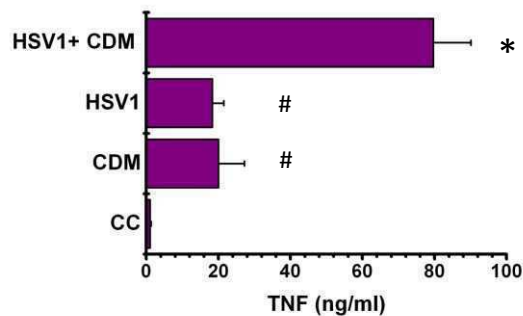


Figura 10. Efecto de CDM sobre la producción de TNF- α inducida por HSV-1 en células J774A.1. Células J774A.1 fueron infectadas con HSV-1 y tratadas con CDM (40 μ M). A las 24 h p.i. el TNF- α se determinó por un ensayo biológico. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # y * indican diferencias significativas respecto al control de células y a la infección, respectivamente (Los valores de p figuran en el texto).

En cuanto a la determinación de TNF- α en las células J774A.1, se observa que, en respuesta a la infección con HSV-1, aumentó la secreción de TNF- α significativamente con respecto a los controles sin infectar ($p < 0,05$). En las células tratadas con CDM, se observó un incremento significativo en los niveles de esta citoquina con respecto a las células controles sin tratar ($p < 0,05$), mientras que los macrófagos infectados y tratados con CDM respondieron con una elevada producción de TNF- α con respecto a los controles infectados ($p < 0,05$) (Figura 10).

Estos resultados sugieren que la disminución de IL-6 observada tanto en las células epiteliales como en los macrófagos infectados y tratados con CDM podría ser consecuencia de la inhibición de la activación de NF- κ B. Por otra parte, CDM solo modula la producción de IL-6 y TNF- α en las células J774A.1 no infectadas, disminuyendo la secreción de IL-6 y aumentando la de TNF- α respecto del control sin tratar. Análogamente ocurre cuando se trata de macrófagos infectados y tratados con CDM.

1.2.3. Efecto de CDM sobre la activación de NF- κ B en las células NHC, HCLE y J774A.1 estimuladas con inductores no virales

El principio antiviral parcialmente purificado MA impide la progresión de la QH cuando ya no hay virus presente en el ojo y exhibe una actividad inmunomoduladora independientemente de su actividad antiviral. Con el objeto de poder discriminar entre ambas actividades biológicas, se utilizó un inductor no viral de la respuesta inmune en presencia y ausencia de CDM.

El inductor no viral de elección resultó ser el TNF- α porque es una de las citoquinas proinflamatorias que se libera durante la infección ocular con el HSV-1. Su presencia está asociada con la eliminación de las partículas virales de la córnea infectada y también con la estimulación de la secreción de otras citoquinas proinflamatorias que contribuyen al desarrollo de la inmunopatología en la QH (Mingawa *et al*, 2004; Wuest y Carr, 2008). Además, el TNF- α está descrito como un potente inductor de NF- κ B y de la síntesis de citoquinas *in vitro*, por lo cual constituye un estímulo adecuado para evaluar un efecto

inmunomodulador de CDM en las células NHC y HCLE (Hohmann *et al*, 1991; Osborn *et al*, 1989). Asimismo, trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el TNF- α es capaz de inducir la translocación al núcleo del NF- κ B en las células NHC y HCLE (Michelini *et al*, 2009 Tesis Doctoral). En consecuencia, se evaluó si el TNF- α es capaz de inducir la activación del NF- κ B mediante un plásmido reportero de NF- κ B-LUC.

Se ha descrito que el NF- κ B se activa en células epiteliales estimuladas con TNF- α entre las 6 y 24 h. Dicha activación se evidenció con el uso de plásmidos reporteros (Nair *et al*, 2006; Sethi *et al*, 2006; Carbia-Nagashima, *et al* 2007). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó la activación del NF- κ B en células NHC y HCLE estimuladas con TNF- α a las 8 y 16 h.

Las células NHC y HCLE crecidas en microplacas de 24 pocillos, fueron transfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B-LUC y uno de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección, las células fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α durante 8 h y 16 h, y luego se determinó la actividad del NF- κ B. En la Cuadro 2 figuran los valores de expresión de luciferasa obtenidos en cada condición de tratamiento. Estos resultados mostraron diferencias significativas entre los valores de expresión de luciferasa en células estimuladas con TNF- α durante 8 h y las células sin estimular ($p < 0,05$), mientras que los correspondientes al tiempo de 16 h se comportaron como el control de células. Por esta razón se eligió el tiempo de 8 h para analizar el efecto de CDM sobre la actividad del NF- κ B.

Células NHC y HCLE crecidas en microplacas de 24 pocillos transfectadas con el plásmido reportero de NF- κ B-LUC y el plásmido de β -galactosidasa fueron estimuladas con TNF- α y tratadas o no con 40 μ M de CDM durante 8 h.

Las lecturas de la actividad del NF- κ B revelaron que CDM no indujo por sí mismo la activación del NF- κ B ya que no se observaron diferencias significativas entre la activación del NF- κ B correspondiente al control de células y a las células tratadas con CDM (Figura 11). Además, CDM no modificó aquellas obtenidas con el agregado del TNF- α como estímulo, con lo cual se

concluye que CDM no inhibió la activación del NF- κ B en células epiteliales tratadas con TNF- α . (Figura 11).

Cuadro 2. Expresión del NF- κ B en células estimuladas con TNF- α

Línea celular		
	HCLE	NHC
URL (Unidades relativas de luciferasa)		
CC	1427 \pm 192	408417 \pm 5509
TNF- α 8 h	21915 \pm 3290 *	876326 \pm 4060 *
TNF- α 16 h	4421 \pm 393	412430 \pm 7301

Células HCLE y NHC fueron co-transfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B-LUC y con un plásmido control de β -galactosidasa. A las 24 h p.t. fueron estimuladas con TNF- α 10 ng/ml durante 8 y 16h. A los extractos celulares se les determinó la actividad de luciferasa y los valores fueron normalizados con la actividad de β -galactosidasa (URL). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. * indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

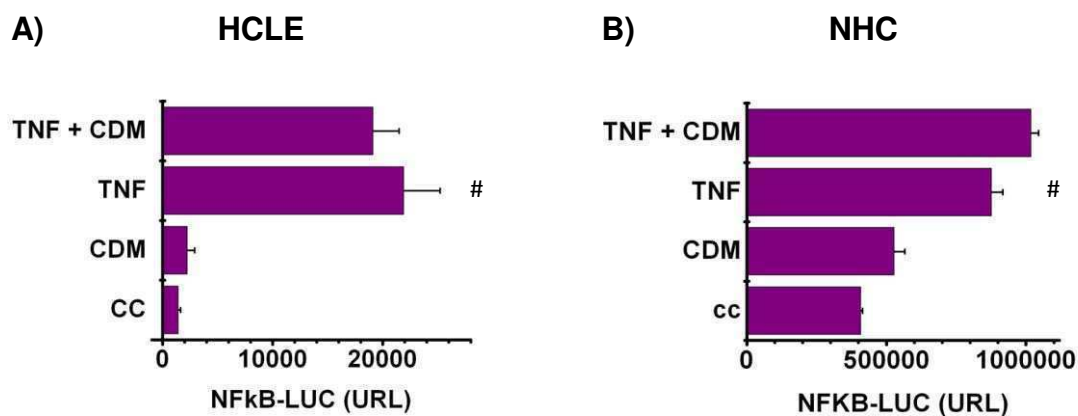


Figura 11. Efecto de CDM en la activación transcripcional de NF- κ B en células HCLE y NHC estimuladas con TNF- α . Células A) HCLE y B) NHC fueron cotransfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B-LUC y con un plásmido control de β -galactosidasa. A las 24 h p.t. fueron tratadas con CDM (40 μ M) y estimuladas con TNF- α (10 ng/ml) durante 8h. A los extractos celulares se les determinó la actividad de luciferasa y los valores fueron normalizados con la actividad de β -galactosidasa (URL). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

Así como el TNF- α fue empleado como inductor no viral en células epiteliales y con el antecedente de que MA sinergiza la producción de TNF- α cuando es agregado con el LPS a macrófagos peritoneales murinos (Petrera y Coto, 2003), se empleó el LPS como estímulo para evaluar un efecto inmunomodulador independiente de la actividad antiviral de CDM en las células J774A.1.

En primer lugar, se evaluó el efecto del LPS en la translocación de NF- κ B al núcleo de las células J774A.1. Para ello, las células crecidas sobre cubreobjetos colocadas en microplacas de 24 pocillos fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS durante 15, 30, 60 y 120 min. Al cabo de dichos lapsos, las células fueron procesadas para detectar la subunidad p65 del NF- κ B a través de la técnica de IFI. El análisis semicuantitativo de las imágenes determinó que el 100% de las células presentó fluorescencia nuclear de p65 superior al valor basal luego de 30 min de inducción con LPS (Figura 12). A los 60 min de incubación con LPS, se siguió detectando p65 en el núcleo de las células, aunque el porcentaje de células positivas para la translocación (58,8%) era menor en comparación con los valores obtenidos a los 30 min (Figura 12). A los 15 y 120 min la subunidad p65 estaba localizada casi exclusivamente en el citoplasma de las células (Figura 12).

Considerando que el máximo de translocación se observó luego de 30 min de estimulación con LPS, las células J774A.1 crecidas en cubreobjetos en microplacas de 24 pocillos fueron estimuladas con LPS (100 ng/ml) en presencia o ausencia de CDM (40 μ M) durante 30 min. Luego se realizó una tinción para detectar p65 a través de la técnica de IFI. CDM por sí mismo no afectó la translocación del NF- κ B, ya que la fluorescencia correspondiente a p65 permaneció en el citoplasma al igual que en el control de células (Figura 13A). Por el contrario, el agregado del LPS activó la migración del NF- κ B al núcleo celular, mientras que CDM no revirtió dicha activación (Figura 13A).

Dado que la translocación al núcleo de NF- κ B es precedida por la degradación proteolítica de su inhibidor I κ B α en el citoplasma, se analizó el efecto de CDM sobre la degradación de I κ B α en células estimuladas con LPS.

Para ello, células J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS y tratadas o no con 40 μ M de CDM. A los 15, 30, 60 y 120 min, las células fueron lisadas y sometidas a un Western Blot con anticuerpos anti-I κ B α . Se observa que el inhibidor fue completamente degradado después del tratamiento con LPS a partir de los 15 min, reapareciendo la proteína a los 120 min (Figura 13B). CDM no afectó la estabilidad de I κ B α ni la cinética de degradación de I κ B α inducida por LPS (Figura 13B).

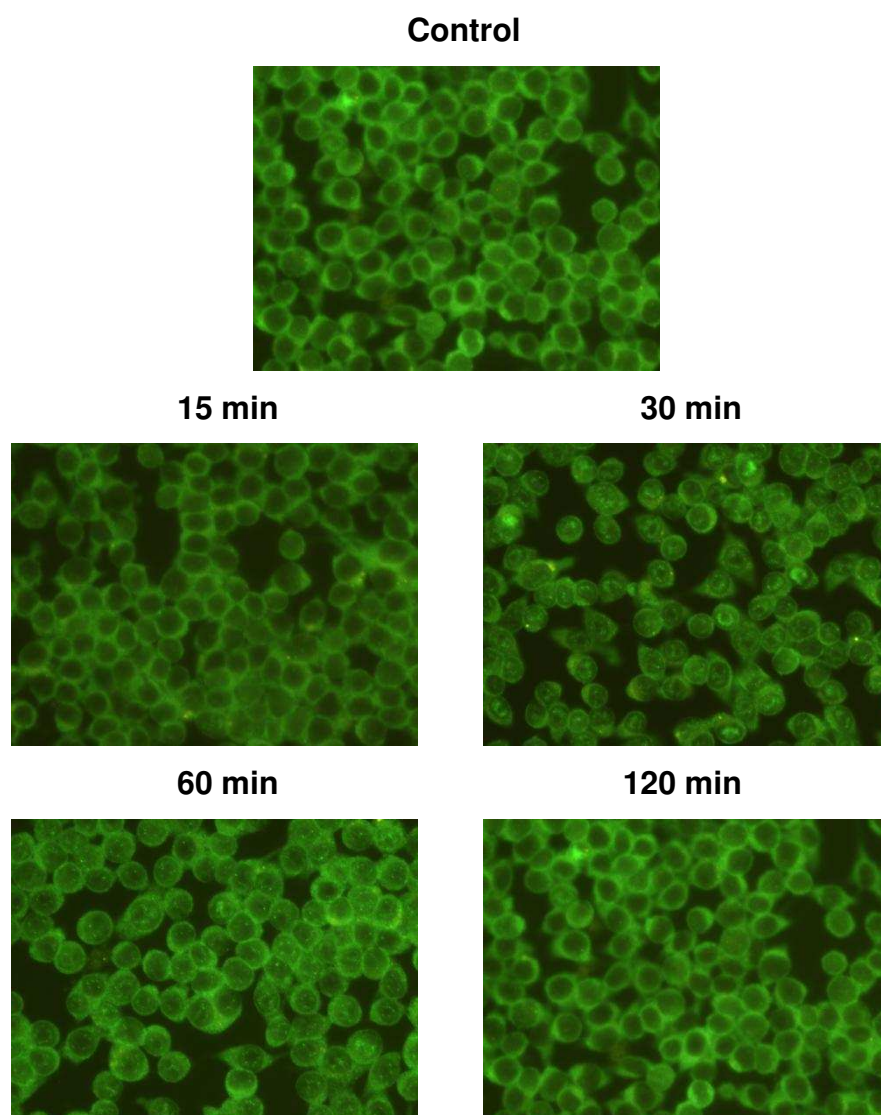


Figura 12. Translocación del NF- κ B en células J774A.1 estimuladas con LPS. Células J774A.1 crecidas en cubreobjetos en microplacas de 24 pocillos fueron incubadas a 37°C en presencia de 100 ng/ml de LPS. Luego fueron fijadas a los 15, 30, 60 y 120 min de estimulación y procesadas para detectar p65 por IFI. Aumento 400x.

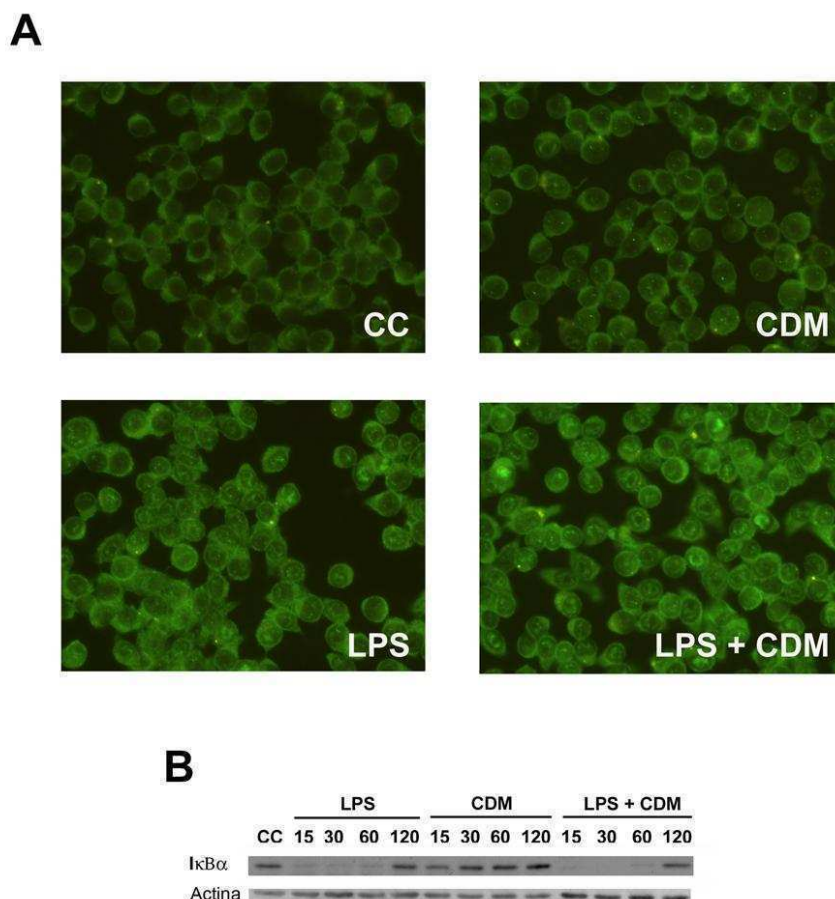


Figura 13. Efecto de CDM en la translocación nuclear de NF- κ B y la degradación de I κ B α en células J774A.1 estimuladas con LPS. A) Células J774A.1 fueron estimuladas con LPS (100 ng/ml) y tratadas con CDM (40 μ M). A los 30 min se detectó la localización intracelular de p65 por medio de la técnica de IFI. Aumento 400x. B) Células J774A.1 estimuladas con LPS y tratadas con CDM (40 μ M) fueron lisadas a los 15, 30, 60 y 120 min de estimulación y procesadas para ser sometidas a un Western Blot con anticuerpos anti I κ B α y actina. (CC) control de células sin estimular; (CDM) células sin estimular y tratadas con CDM; (LPS) células estimuladas con LPS; (LPS + CDM) células estimuladas con LPS y tratadas con CDM.

Si bien CDM no inhibió la degradación de I κ B α ni la translocación al núcleo de NF- κ B inducida por LPS, podría estar afectando la interacción del factor de transcripción NF- κ B con el ADN. Para estudiar si CDM impide la activación transcripcional del NF- κ B en células estimuladas con LPS, las células fueron transfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B- LUC.

Se ha descrito que el NF- κ B se activa en macrófagos estimulados con LPS entre las 8 y 24 h (Lee *et al*, 2007; Nicholas *et al*, 2007; Kim *et al*, 2008). Dicha activación se evidenció con el uso de plásmidos reporteros. Teniendo en

cuenta estos antecedentes, se evaluó la activación del NF- κ B en células J774A.1 estimuladas con LPS a las 8 y 16 h.

Las células J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron transfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B-LUC y uno de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección, las células fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS durante 8 h y 16 h. En el Cuadro 3 se muestran los valores de expresión de luciferasa obtenidos en cada condición de tratamiento.

Cuadro 3. Expresión del NF- κ B en células estimuladas con LPS

Línea celular	
J774A.1	
URL (Unidades relativas de Luciferasa)	
CC	11029 \pm 1225
LPS 8 h	39752 \pm 5743 *
LPS 16 h	23982 \pm 3421

Células J774A.1 fueron co-transfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B-LUC y con un plásmido control de β -galactosidasa. A las 24 h p.t. fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS durante 8 y 16 h. A los extractos celulares se les determinó la actividad de luciferasa y los valores fueron normalizados con la actividad de β -galactosidasa (URL). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

Estos resultados mostraron diferencias significativas entre los valores de expresión de luciferasa en macrófagos estimuladas con LPS durante 8 h y las células sin estimular ($p < 0,05$), mientras que los correspondientes al tiempo de 16 h se comportaron como el control de células (Cuadro 3). Por esta razón se eligió el tiempo de 8 h para analizar el efecto de CDM sobre la actividad del NF- κ B.

Por lo tanto, las células J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron transfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B-LUC y uno de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección, las células fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS durante 8 h en presencia y ausencia de CDM.

Las lecturas de la actividad del NF- κ B revelaron que CDM no indujo por sí mismo la activación del NF- κ B, ya que no se observaron diferencias significativas entre la activación del NF- κ B correspondiente a las células control y a las células tratadas con CDM (Figura 14). Además, CDM no modificó aquellas obtenidas con el agregado del LPS como estímulo (Figura 14).

Entonces, CDM no inhibió la translocación al núcleo ni la activación del NF- κ B en macrófagos estimulados con LPS.

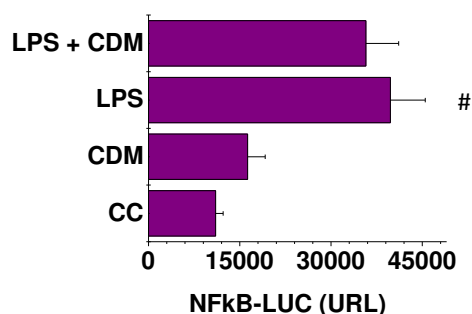


Figura 14. Efecto de CDM en la activación transcripcional del NF- κ B en células J774A.1 estimuladas con LPS y tratadas con CDM. Células J774A.1 fueron co-transfectadas con un plásmido reportero de NF- κ B-LUC y con un plásmido control de β -galactosidasa. A las 24 h p.t. fueron tratadas con CDM (40 μ M) y estimuladas con LPS (100 ng/ml) durante 8h. A los extractos celulares se les determinó la actividad de luciferasa y los valores fueron normalizados con la actividad de β -galactosidasa (URL). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

1.2.4. Efecto de CDM sobre la producción de citoquinas en células NHC, HCLE y J774A.1 estimuladas con inductores no virales

Si bien CDM no afectó la activación de NF- κ B en las células epiteliales estimuladas con TNF- α y en los macrófagos estimulados con LPS, podría exhibir un efecto inmunomodulador de la secreción de citoquinas frente a estos estímulos independientemente de la activación del NF- κ B, dado que CDM podría afectar otras vías de transducción de señales que afecten la producción de dichas citoquinas. Entonces, se estudió el efecto de CDM sobre la

producción de citoquinas en las células epiteliales estimuladas con TNF- α y en los macrófagos estimulados con LPS.

Previamente se ha reportado que las células NHC y HCLE estimuladas con TNF- α producen un máximo de IL-6 a las 24 h p.t. (Michelini 2009, Tesis doctoral). Entonces se estudió la producción de IL-6 en células NHC y HCLE estimuladas con TNF- α y tratadas con CDM luego de 24 h de tratamiento.

Las células NHC y HCLE crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron estimuladas con 10 ng/ml de TNF- α durante 24 h, en ausencia o en presencia de 40 μ M de CDM. Los sobrenadantes fueron cosechados y se determinó la producción de IL-6 por medio de un ELISA.

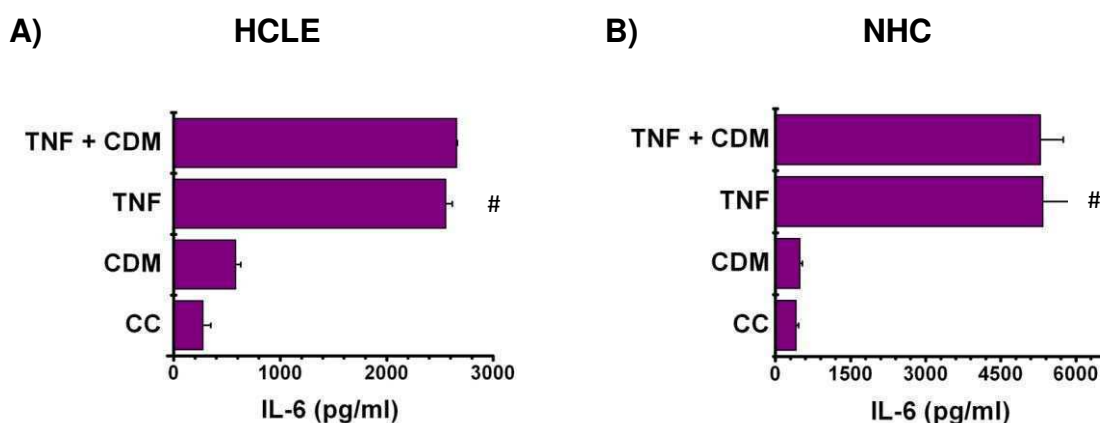


Figura 15. Efecto de CDM sobre la secreción de IL-6 en las células NHC y HCLE estimuladas con TNF- α . Las células A) HCLE y B) NHC) fueron estimuladas con TNF- α (10 ng/ml) en presencia o ausencia de CDM (40 μ M). Luego de 24 h de incubación a 37°C, se cuantificó IL-6 en los sobrenadantes por medio de un ELISA. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes \pm el desvío estándar. # indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

En las células NHC y HCLE tratadas con CDM no se detectaron diferencias significativas en la secreción de IL-6 con respecto a los controles sin tratar. Además, CDM no exhibió un efecto inhibitorio en la secreción de IL-6 en ambas líneas celulares estimuladas con TNF- α (Figura 15).

Por lo tanto, CDM no afectó la síntesis de citoquinas en las células epiteliales estimuladas con TNF- α .

El máximo de producción de TNF- α y de IL-6 en macrófagos se detecta luego de las 8 h de estimulación con LPS (Conboy *et al*, 1999; Michelini, 2009

Tesis doctoral). Entonces, las células J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos, fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS y tratadas o no con 40 μ M de CDM durante 8 h y se determinaron los niveles de IL-6 y de TNF- α , por ELISA y por un ensayo biológico, respectivamente. Los resultados obtenidos demuestran que las células estimuladas con LPS presentaron una producción de IL-6 y de TNF- α mayor con respecto a las células control sin estimular ($p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 16). En las células tratadas con LPS y CDM, se redujo la síntesis de IL-6 ($p < 0,001$) y aumentó la de TNF- α ($p < 0,01$) con respecto a las células tratadas sólo con LPS (Figura 16). Asimismo, en las células sin estimular con LPS, CDM también redujo la síntesis de IL-6 ($p < 0,01$) y aumentó la producción de TNF- α ($p < 0,05$) con respecto a las células sin tratar (Figura 16).

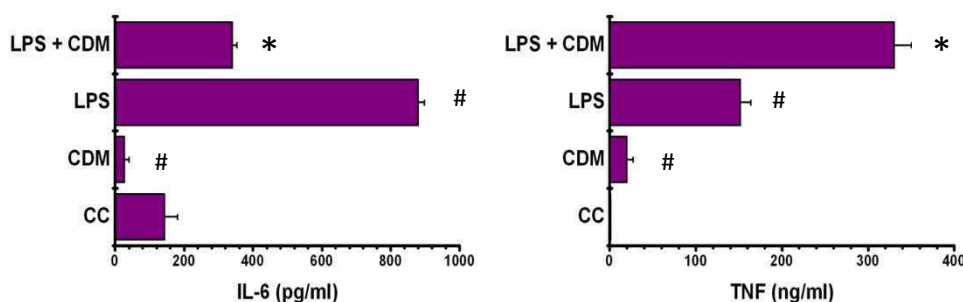


Figura 16. Efecto de CDM sobre la secreción de IL-6 y TNF- α en las células J774A.1 estimuladas con LPS. Las células fueron estimuladas con LPS (100 ng/ml) y tratadas con CDM (40 μ M). A las 8 h p.t. IL-6 se cuantificó por un ELISA, y TNF- α se determinó por un ensayo biológico. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # y * indican diferencias significativas respecto al control y al tratamiento, respectivamente (los valores de p figuran en el texto).

Por lo tanto, CDM exhibió propiedades inmunomoduladoras asociadas a la síntesis de citoquinas independientemente de la vía de NF- κ B y del estímulo empleado en los macrófagos, ya que alteró la producción de IL-6 y TNF- α en células estimuladas con LPS o infectadas con HSV-1. En cambio, en las células epiteliales, CDM sólo moduló la síntesis de citoquinas frente a un estímulo viral, probablemente como consecuencia de su actividad antiviral.

1.2.5. Efecto inmunomodulador de MA en un modelo murino de inflamación cutánea inducida por radiación ultravioleta (UV)

MA inhibe el desarrollo de la QH en ratones cuando es suministrada en forma tópica antes, inmediatamente después o hasta 96 h después de la infección con HSV-1. Esto sugiere que ejercería un efecto antiinflamatorio cuando se aplica a partir del cuarto día p.i., momento a partir del cual se despierta la respuesta inflamatoria responsable de las lesiones observadas desde el día 7 p.i. en el modelo experimental murino de QH. Asimismo, es importante destacar que, para entonces, ya no se detecta HSV-1 infectivo en los ojos (Pifarré et al, 2002). Por otro lado, si bien CDM modula la producción de citoquinas en células infectadas probablemente como consecuencia de su actividad antiviral, también modula la secreción de citoquinas en macrófagos estimulados con LPS *in vitro* (Figuras 9, 10, 16). Entonces, se planteó el interrogante acerca de si CDM presentaba un efecto inmunomodulador independiente de su actividad antiviral en un modelo de inflamación *in vivo* en ausencia de infección. Dado que no se disponía de suficiente masa de CDM para realizar el ensayo *in vivo*, se realizaron los experimentos con la fracción parcialmente purificada MA.

La piel es el órgano con mayor exposición a las agresiones ambientales, por lo cual es uno de los más susceptibles a los efectos nocivos de la radiación UV. Aunque la radiación UVB (290–320 nm) sólo representa el 4% del total de la radiación UV que alcanza la superficie terrestre, es la responsable del desarrollo del cáncer de piel en humanos, siendo el principal agente carcinógeno ambiental. El daño progresivo de los queratinocitos conduce al desarrollo de tumores de piel de tipo no-melanoma, con una gran incidencia en humanos (Armstrong y Krickler, 2001).

Al cabo de algunas horas, la exposición a la radiación UVB produce una respuesta inflamatoria local caracterizada por la formación de edema y eritema. Algunas de las moléculas involucradas en este proceso son la prostanglandina E2, el óxido nítrico y citoquinas tales como el TNF- α , la IL-6 y la IL-1. Los ratones alopecicos que han recibido una alta dosis de radiación UVB presentan un incremento de los niveles de estos mediadores en la piel (Paz et al, 2008).

Por este motivo, se evaluó si MA es capaz de modular la producción de TNF- α e IL-6 en las células epidérmicas y dérmicas luego de la exposición a la radiación UVB. Para ello, se irradiaron ratones alopecicos Crl:SKH-1-hrBR siguiendo el protocolo de inflamación desarrollado por González Maglio *et al* (2005). Para la aplicación tópica de MA, el vehículo empleado fue la acetona, debido a su utilización en ensayos similares con la misma cepa de animales (Wilgus *et al*, 2000).

Los ratones Crl:SKH-1-hrBR hembras y machos alopecicos de 8 semanas de edad fueron irradiados con 200 mJ/cm² de radiación UVB (280–320 nm), y fueron distribuidos en tres grupos de 4 animales cada uno: 1 grupo control sin irradiar (Normal), otro grupo control irradiado y tratado con acetona (Vehículo), y un grupo tratado (MA). El tratamiento consistió en la administración tópica de una solución de MA (2 mg/ml) en la espalda de los ratones, 1 vez por día durante 3 días consecutivos luego de la irradiación. Al cabo de este lapso, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras de epidermis y dermis.

Mediante un ELISA se encontró que los extractos epidérmicos provenientes de animales irradiados con UVB (grupo vehículo) produjeron niveles de TNF- α significativamente mayores a los sintetizados por la epidermis de los ratones sin irradiar (Normal) ($p < 0,001$) (Figura 17). En el caso de los ratones irradiados y tratados con MA, la producción de TNF- α fue similar a la obtenida a partir de los extractos de epidermis de animales irradiados. Por otra parte, no se observaron diferencias en la secreción de TNF- α en los extractos dérmicos de los tres grupos de ratones (Figura 17).

Cuando se analizó el perfil de IL-6, se encontró que la epidermis y la dermis de los ratones expuestos produjeron niveles de esta citoquina significativamente mayores a los sintetizados por el control sin irradiar ($p < 0,001$) (Figura 17). Sin embargo, la producción de IL-6 se vio disminuida tanto en las muestras de epidermis como de la dermis de los ratones tratados con MA ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 17).

Por lo tanto, MA exhibió propiedades moduladoras de la producción de IL-6 en los ratones irradiados con UVB, ya que redujo la secreción de la misma tanto en extractos dérmicos como epidérmicos. En cambio, no afectó la

secreción de TNF- α en ambos tipos celulares provenientes de ratones expuestos al UVB.

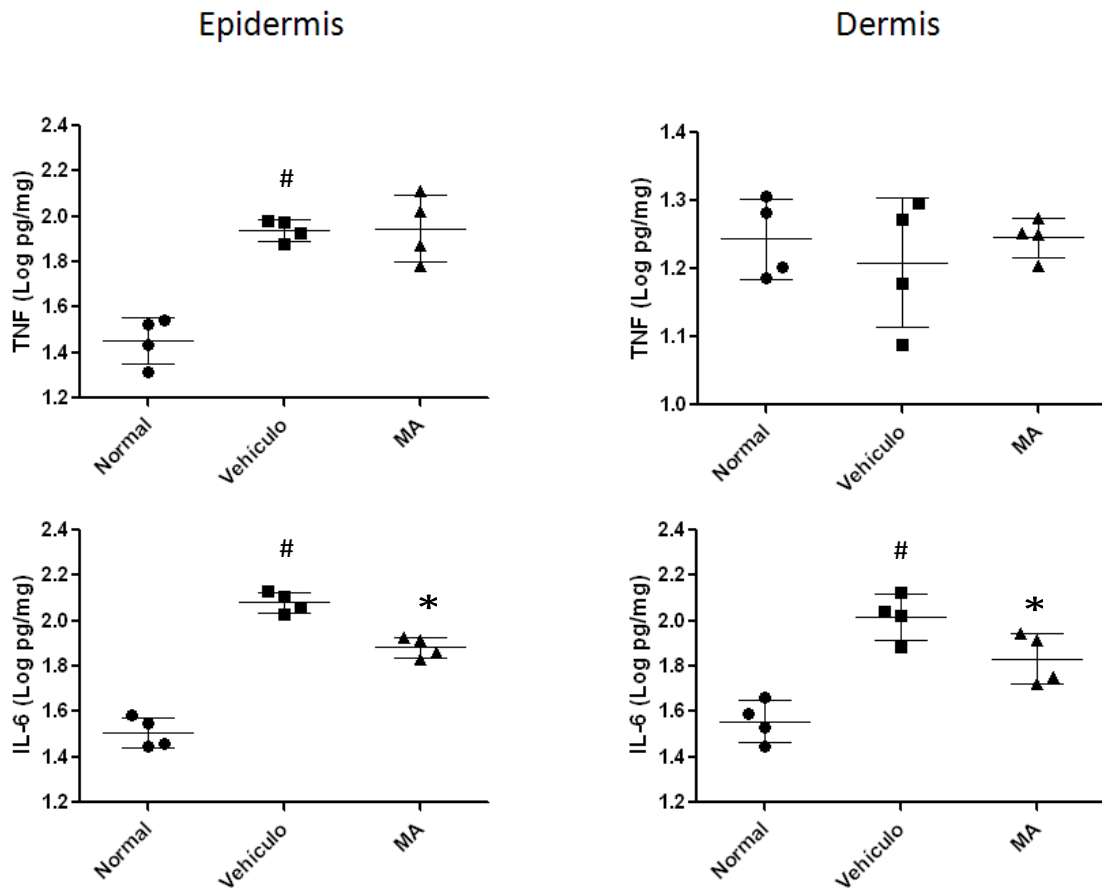


Figura 17. Efecto de MA en la secreción de citoquinas en los extractos dérmicos y epidérmicos de los ratones irradiados con UVB. Los ratones Crl:SKH-1-hrBR fueron irradiados con 200 mJ/cm² de UVB. Luego, los ratones fueron tratados con MA una vez por día por tres días post-exposición, y se cuantificó IL-6 y TNF- α en los extractos dérmicos y epidérmicos. Los valores de concentración de las citoquinas se relativizaron con la concentración de proteínas de cada extracto, expresándose como el promedio \pm el desvío estándar. # y * indican diferencias significativas respecto al grupo normal y al vehículo, respectivamente (los valores de *p* figuran en el texto).

**EFFECTO DE CDM SOBRE EL TRANSPORTE DE GLICOPROTEÍNAS
VIRALES Y CELULARES**

La acidificación de los compartimentos vacuolares presenta un papel importante en una gran variedad de procesos celulares, como por ejemplo en las vías endocíticas y exocíticas (Dinter *et al*, 1998). Dado que CDM provoca la alcalinización de los compartimentos intracelulares, éste bloquea el transporte de las gB, gC y gD de HSV-1 a nivel del aparato de Golgi cuando es agregado luego de la infección en células Vero y NHC (Barquero *et al*, 2006).

Considerando que la síntesis de glicoproteínas virales es totalmente dependiente del tráfico celular, el bloqueo del transporte de glicoproteínas virales ejercido por CDM sugiere que probablemente también interfiera en el transporte de glicoproteínas celulares. Las citoquinas, como el TNF- α y la IL-6 estudiadas, son glicoproteínas, y en el capítulo anterior quedó demostrado que CDM inhibe la producción de la IL-6 pero incrementa la síntesis del TNF- α en macrófagos estimulados con LPS o infectados con HSV-1 (Figuras 9C, 10 y 16). Si bien CDM podría estar inhibiendo una vía de señalización diferente a la del NF- κ B involucrada en la producción de la IL-6 (Figuras 13A, 14), también podría estar afectando el transporte de la glicoproteína sintetizada a través de la vía secretoria, como ya fuera descrito para las glicoproteínas virales (Barquero *et al*, 2006). Entonces, la disminución de los niveles de IL-6 observados podría explicarse a través de un eventual bloqueo del transporte de glicoproteínas. Sin embargo, el aumento del TNF- α no se explica en este contexto. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la secreción de ambos tipos de citoquinas se vio afectada de manera diferencial en las células tratadas con CDM, se planteó el interrogante acerca de cuál podría ser el efecto de CDM sobre el tráfico de las glicoproteínas celulares.

2.1. Efecto de CDM en la localización intracelular del TfR-GFP

Con el objeto de analizar el tránsito de glicoproteínas celulares, se analizó la localización intracelular del receptor de la Transferrina (TfR) en presencia de CDM. Dado que el efecto de CDM sobre el transporte de las glicoproteínas virales se analizó en las células Vero y NHC (Barquero *et al*, 2006), se investigó su efecto sobre el TfR en los mismos sustratos celulares.

Para ello, células Vero y NHC crecidas en microplacas de 24 pocillos, fueron transfectadas con un plásmido que codifica para el TfR conjugado a la green fluorescent protein (TfR-GFP). A las 6 h post-transfección, las células transfectadas fueron tratadas o no con 40 μ M de CDM. Luego de 18 h p.t., las células fueron fijadas y visualizadas en un microscopio de epifluorescencia.

En el control de células se observó un patrón de TfR puntillado distribuido en el citoplasma, mientras que en las células tratadas con CDM la fluorescencia se concentró principalmente en una región adyacente al núcleo (Figura 18A). La acumulación de fluorescencia en ese sitio indica la posibilidad de que se localice a nivel del aparato de Golgi. Para confirmar esto, se realizó una IFI utilizando anticuerpos anti-giantina, el cual es un marcador del aparato de Golgi.

Células NHC crecidas en una microplaca de 24 pocillos fueron transfectadas con el plásmido que codifica para TfR-GFP y, a las 6 h post-transfección, fueron tratadas con 40 μ M de CDM. Transcurridas 18 h más, se fijaron las células y se realizó una IFI con anticuerpos anti-giantina.

Las imágenes obtenidas en el microscopio confocal evidenciaron que el TfR co-localiza con la giantina en las células NHC tratadas con CDM (Figura 18B). Por lo tanto, el TfR es confinado en el aparato de Golgi de manera similar a lo que ocurre en el caso de la VSV-G y de las glicoproteínas de HSV-1. Por lo tanto, CDM pareciera ejercer un efecto análogo independientemente de si se trata de glicoproteínas virales o celulares.

Con el objeto de investigar la localización simultánea de glicoproteínas virales y del TfR en el aparato de Golgi, células NHC crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron transfectadas con el plásmido que codifica el TfR-GFP. A las 6 h post-transfección fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=1) y tratadas o no con 40 μ M de CDM. A las 24 h post-transfección, las células fueron fijadas y se realizó una IFI usando un anticuerpo anti-gD.

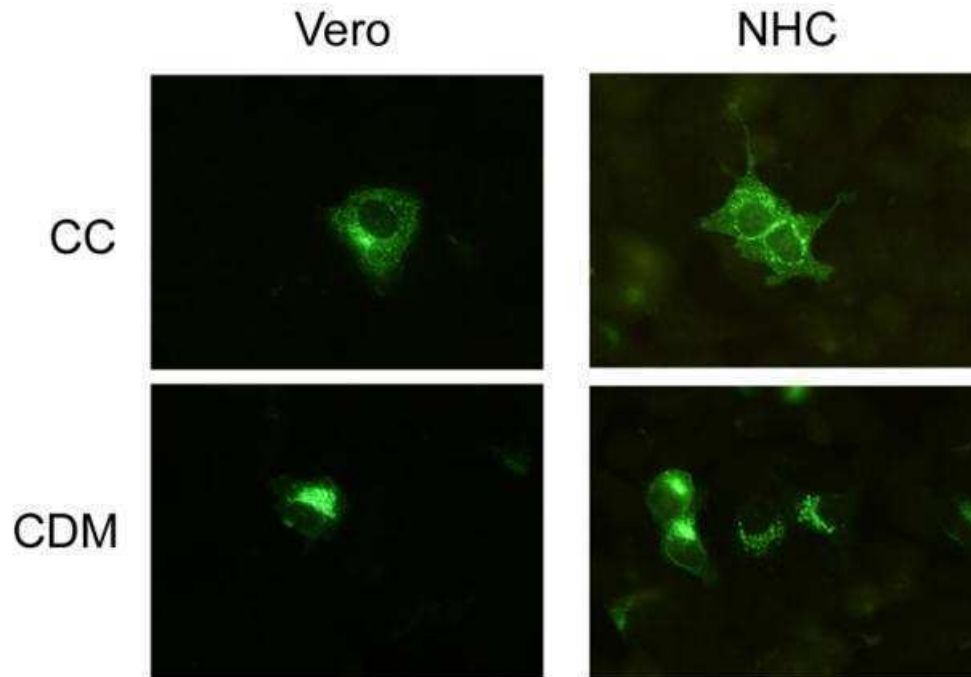
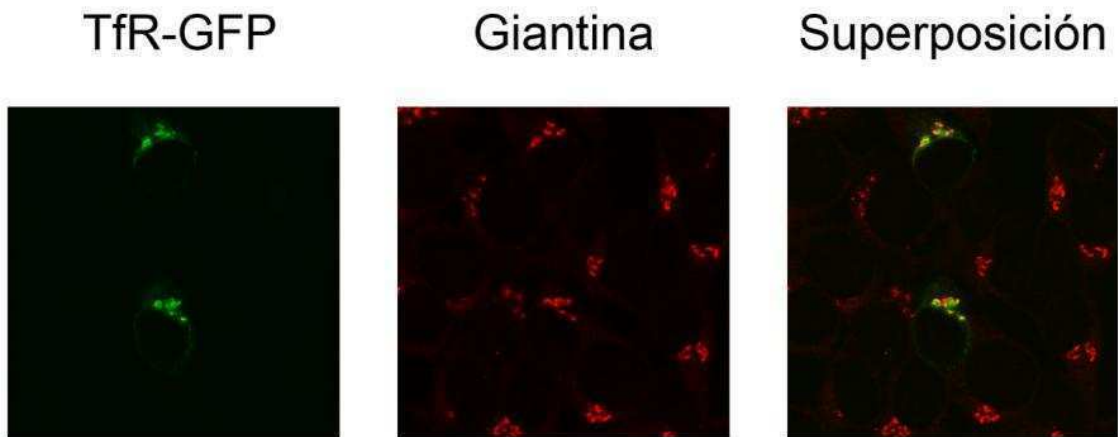
A**B**

Figura 18. Distribución intracelular del TfR en células tratadas con CDM. A) Células NHC y Vero fueron transfectadas con el plásmido que codifica para TfR-GFP y tratadas con CDM (40 μ M). Después de 24 h post-transfección, las células fueron fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia. Aumento 400x. B) Células NHC fueron transfectadas con TfR-GFP y tratadas con CDM (40 μ M). A las 24 h, las células fueron fijadas y procesadas para detectar giantina por IFI. Las fotografías fueron obtenidas en un microscopio confocal. Aumento 600x.

Si bien la fluorescencia correspondiente a la gD fue detectada en un dominio perinuclear de las células tratadas con CDM, el patrón de fluorescencia de TfR-GFP fue puntillado y no co-localizó con la proteína gD. (Figura 19).

En consecuencia, la gD de HSV-1 no se acumuló junto al TfR-GFP en el complejo de Golgi en las células tratadas con CDM, a las 24 h post-transfección.

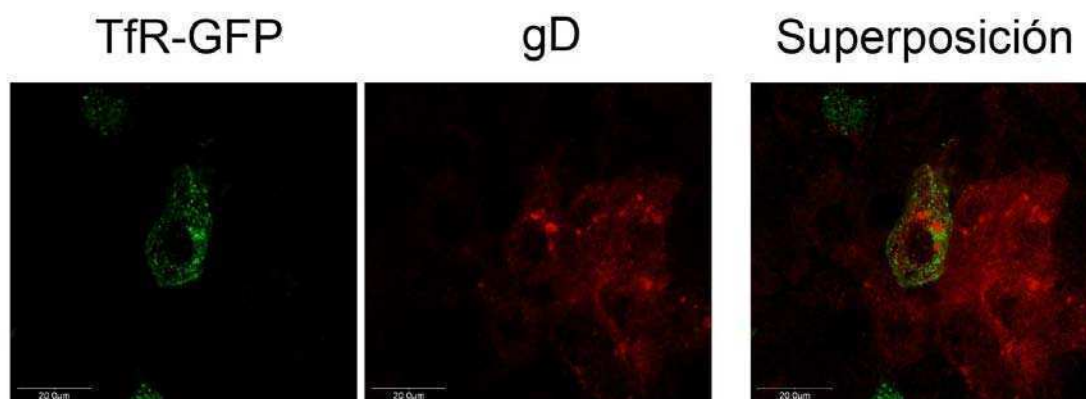


Figura 19. Distribución intracelular del TfR en células infectadas y tratadas con CDM. Células NHC fueron transfectadas con TfR-GFP y a las 6 h post-transfección fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=1) y tratadas con CDM (40 μ M). A las 18 h p.i., las células NHC fueron fijadas y se realizó una IFI con anticuerpos anti-gD. Las fotografías fueron obtenidas en un microscopio confocal. Aumento 600x.

Este patrón de fluorescencia de la glicoproteína TfR observado en las células infectadas y tratadas con CDM sugiere que no hay un bloqueo permanente en el aparato de Golgi. Para investigarlo, la cicloheximida (CHX) (100 μ g/ml) fue agregada a los cultivos celulares transfectados con el plásmido que codifica el TfR-GFP desde las 6 hasta las 24 h post-transfección para impedir nueva síntesis proteica. A las 6 h post-transfección, se visualizó el típico patrón puntillado de TfR en las células sin tratar y su localización a nivel del aparato de Golgi en las células tratadas con CDM (Figura 20). A las 24 h post-transfección, en el control de células el patrón de fluorescencia de TfR no se modificó cuando las células fueron tratadas con CHX, mientras que el patrón de fluorescencia perinuclear se convirtió en un patrón puntillado en las células tratadas con CDM y CHX (Figura 20). Cuando CDM es quitado o agregado a

las 6 h post-transfección, el patrón de fluorescencia perinuclear de TfR se convierte en un patrón puntillado con el tratamiento con CHX (Figura 20).

Por lo tanto, se observa una movilización eficiente de la proteína TfR desde el aparato de Golgi a los endosomas de reciclaje (ER) en las células tratadas con CDM sólo cuando se agrega CHX. Estos resultados sugieren que CDM promueve un bloqueo transitorio en el transporte de TfR, a diferencia de lo reportado para las glicoproteínas virales (Barquero *et al*, 2004, 2006).

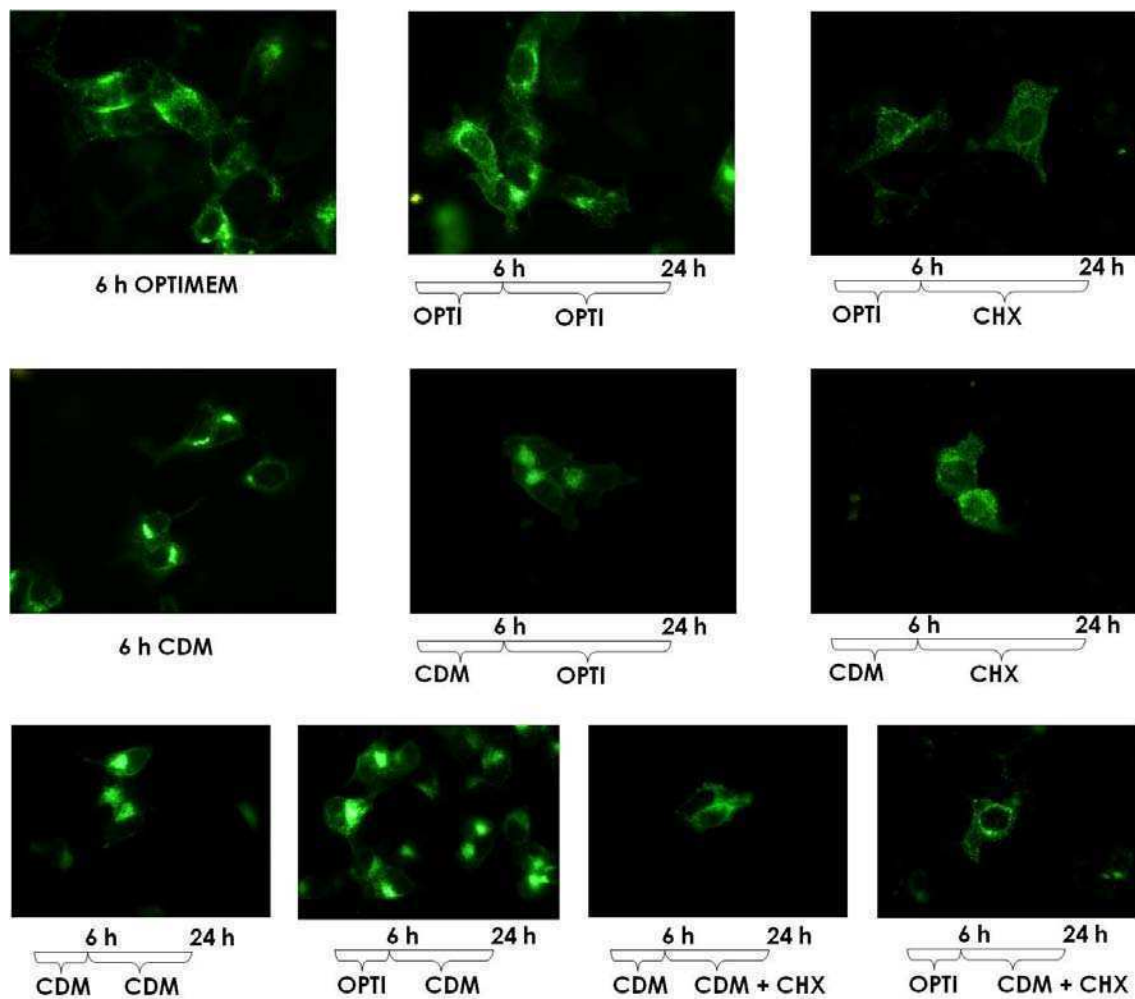


Figura 20. Distribución intracelular del TfR en células tratadas con CDM y CHX. Células NHC fueron transfectadas con TfR-GFP, y tratadas o no con CDM (40 μ M) y/o CHX (100 μ g/ml), a diferentes tiempos. Luego, las células fueron fijadas y fotografiadas con un microscopio de epifluorescencia. Aumento 400x. (OPTI= OPTIMEM) medio de cultivo en ausencia de CDM y CHX; (CDM) células tratadas con CDM; (CHX) células tratadas con CHX; (CDM + CHX) células tratadas con CDM y CHX.

Dado que se ha demostrado que CDM induce un incremento en el pH de los compartimentos ácidos intracelulares en diferentes sistemas celulares, decidimos comparar el efecto de CDM en el transporte de TfR con el de otros agentes acidotrópicos: un inhibidor de la V-ATPasa, la Concanamicina A (CON) y un ionóforo, el Monensín (MON). (Dinter *et al*, 1998; Barquero *et al*, 2004 y 2006).

Tanto la CON como el MON afectan el transporte del TfR-GFP dado que se visualizó la acumulación de fluorescencia perinuclear en las células NHC transfectadas con el plásmido que codifica para el TfR-GFP a las 6 y 24 h post-transfección (Figura 21). Cuando se agregó la CHX a las 6 h post-transfección, se observó un patrón de fluorescencia análogo al observado sin CHX en las células tratadas con CON y MON (Figura 21). Por lo tanto, CON y MON provocan un bloqueo permanente en contraste con el retraso en el transporte del TfR observado en las células tratadas con CDM.

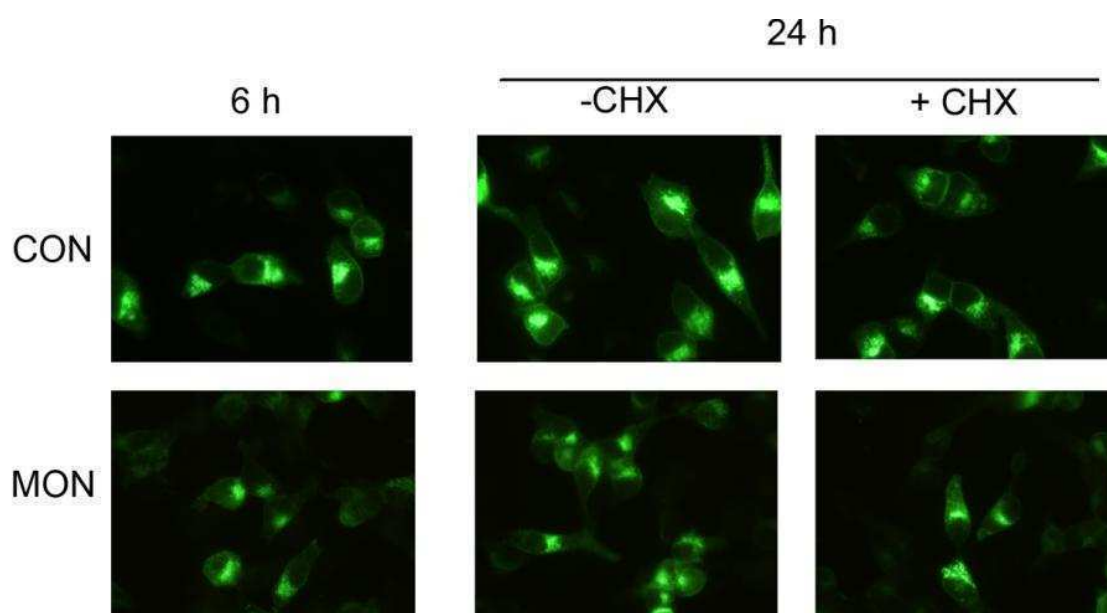


Figura 21. Distribución intracelular del TfR en células tratadas con CON o MON y CHX Células NHC fueron transfectadas con TfR-GFP, y tratadas con CON (50 nM) o MON (20 μ M), y/o CHX (100 μ g/ml), a diferentes tiempos. Células fueron fijadas y fotografiadas con un microscopio de epifluorescencia. Aumento 400x.

Considerando que la glicoproteína TfR llega a los ER después de su acumulación en el aparato de Golgi de las células tratadas con CDM,

evaluamos su capacidad de unirse a su ligando, la transferrina, mediante el ensayo de incorporación de transferrina.

Para ello, las células NHC crecidas sobre cubreobjetos colocadas en microplacas de 24 pocillos, fueron transfectadas con el plásmido que codifica para el TfR-GFP, en presencia o ausencia de 40 μM de CDM. A las 6 h post-transfección se retiró el medio de cultivo, y las células fueron tratadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de CHX. Luego de 18 h, se realizó la incorporación de transferrina conjugada con Rodamina (Tf-Rodamina) (15 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 min, a 37°C. Finalmente los cultivos fueron fijados y observados en el microscopio confocal.

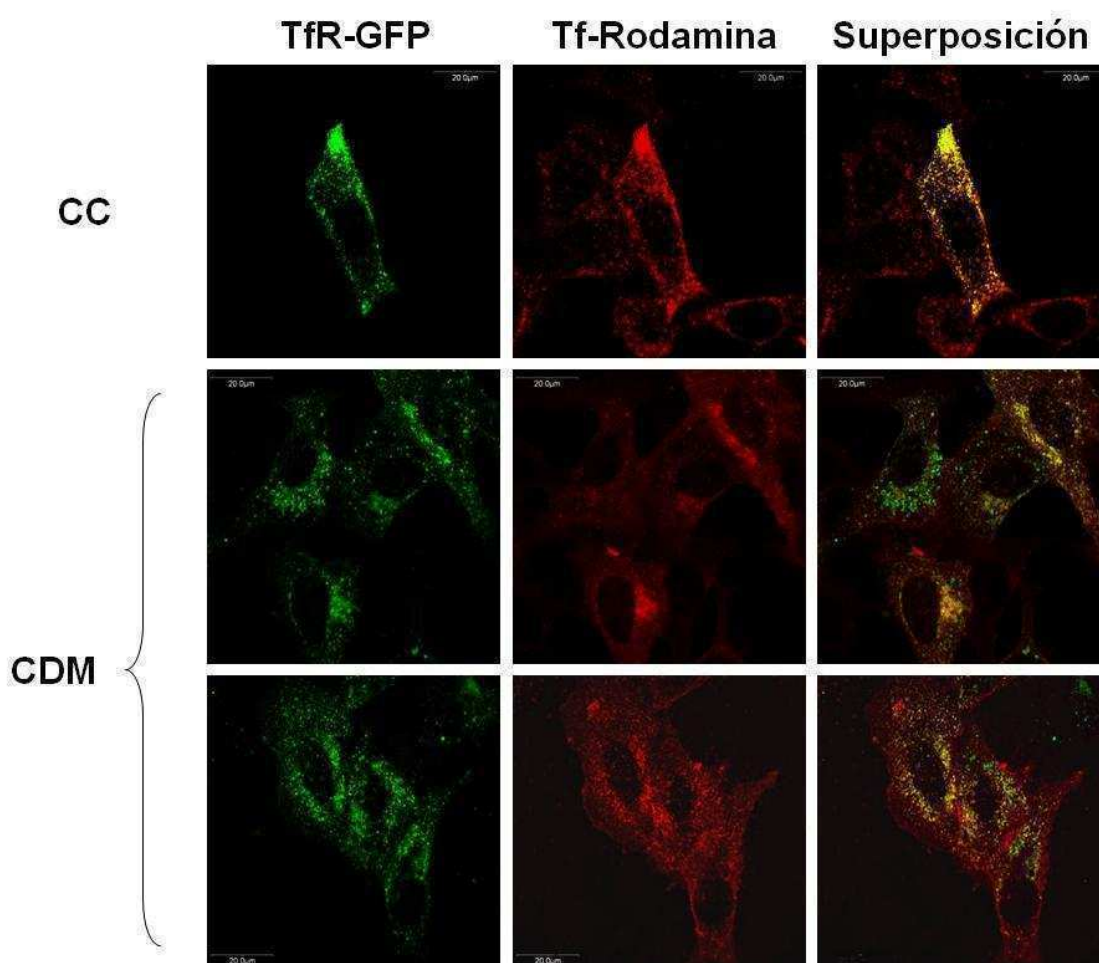


Figura 22. Bioactividad del TfR en células tratadas con CDM y CHX. Células NHC fueron transfectadas con TfR-GFP en presencia o ausencia de CDM (40 μM). A las 6 h post-transfección se retiró el medio de cultivo, y las células fueron tratadas con CHX (100 $\mu\text{g/ml}$). Luego de 18 h, se realizó el ensayo de incorporación de transferrina conjugada a rodamina (Tf-rodamina). Las células fueron fotografiadas en un microscopio confocal. Aumento 600x.

Tanto en el control de células como en las células tratadas con CDM se observó la co-localización del TfR y de la Tf en los ER (Figura 22). En consecuencia, CDM no afectó la capacidad del TfR de unirse a la Tf cuando alcanza su localización final.

2.2. Efecto de CDM y agentes acidotrópicos sobre el transporte del TNF- α

Considerando que CDM incrementa la secreción del TNF- α en las células J774A.1 estimuladas con LPS (Figura 16), y que el TNF- α es una glicoproteína, se planteó el interrogante acerca de si el TNF- α se comporta como el TfR en las células tratadas con CDM. Para ello, examinamos el transporte del TNF- α en células J774A.1 tratadas con LPS y CDM.

Células J774A.1 crecidas sobre cubreobjetos colocadas en microplacas de 24 pocillos fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS durante 6 y 24 h, en presencia o ausencia de 40 μ M de CDM. Al cabo de esta incubación, se fijaron las células y se procesaron mediante una IFI para detectar el TNF- α .

Tal como describió Manderson *et al* (2007), el TNF- α recién sintetizado se localizó en el aparato de Golgi después de 6 h de tratamiento con LPS, para luego ser transportado a la membrana plasmática (Figura 23A). En cambio, si bien no detectamos TNF- α en las células tratadas con CDM durante 6h, se observó un pequeño incremento en la síntesis de TNF- α luego de 24 h de tratamiento con el compuesto (Figura 23A). Cuando los macrófagos fueron tratados con LPS y CDM se detectó una fluorescencia correspondiente al TNF- α más intensa que la observada luego de la estimulación con LPS solo (Figura 23A). La imagen revela que el TNF- α se localizó en el aparato de Golgi luego de 6 h del agregado de LPS y CDM, mientras que, al cabo de 24 h, la fluorescencia se dispersó en la membrana plasmática (Figura 23A).

A diferencia de lo observado para las glicoproteínas virales (Barquero *et al*, 2004, 2006), CDM no impidió el transporte de TNF- α activo a la membrana plasmática, permitiendo su secreción a partir de macrófagos estimulados con LPS.

Si bien está ampliamente descrito que el MON bloquea el transporte del TNF- α en el aparato de Golgi en macrófagos estimulados con LPS, el efecto de

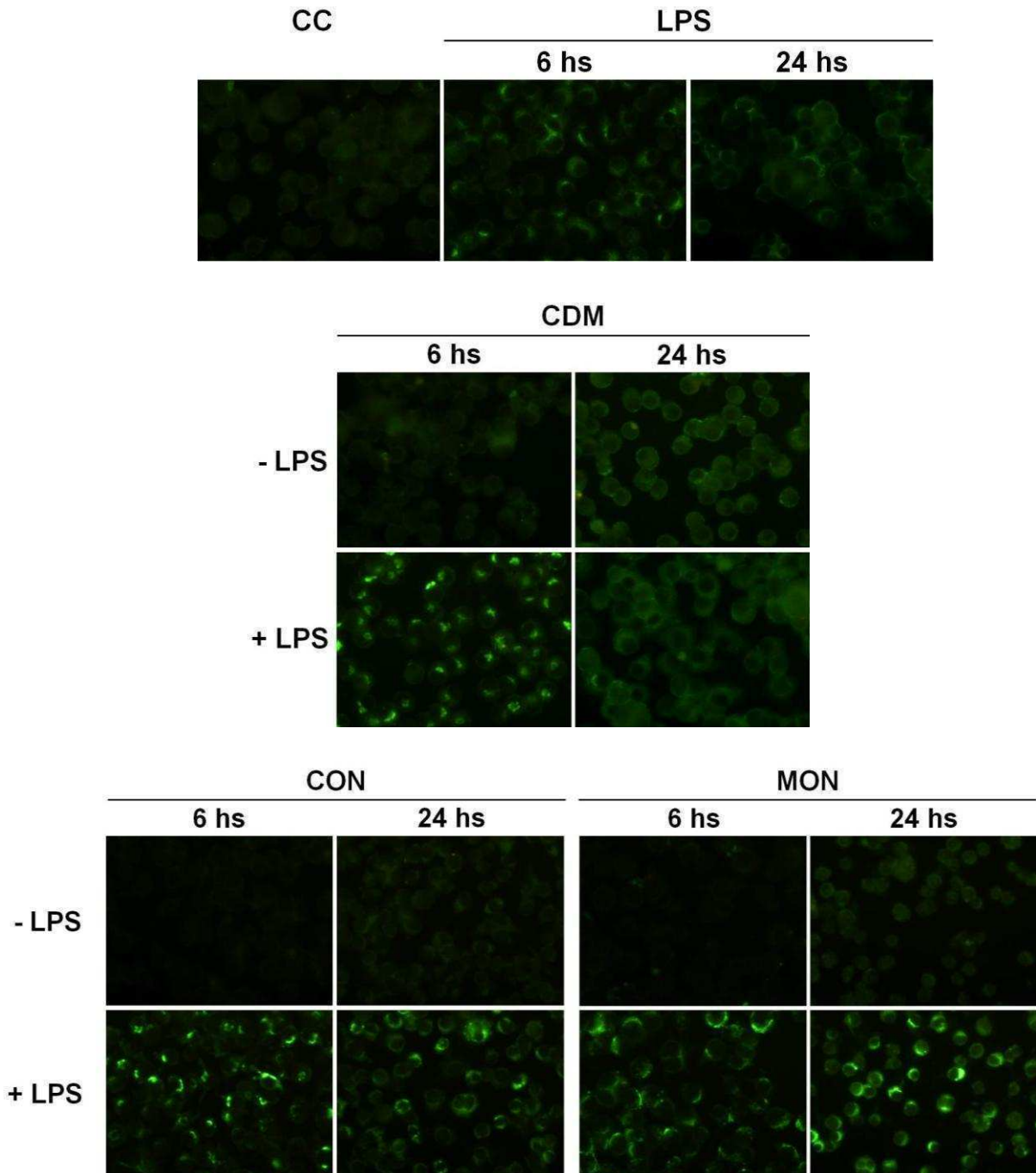
la CON sobre el TNF- α no está reportado (Lichtman *et al*, 1998; Weber *et al*, 2000; Bueno *et al*, 2001; Schuerwegh *et al*, 2001). No obstante, está descrita la acción de la Bafilomicina A, un compuesto estructural y funcionalmente relacionado con la CON. El efecto de la Bafilomicina A sobre el transporte del TNF- α en macrófagos estimulados con LPS es controversial, dado que algunos autores plantean que reduce su secreción, mientras que otros observan que la incrementa (Bidani *et al*, 1995; Lichtman *et al*, 1998). Entonces, se comparó el efecto de CDM en el transporte del TNF- α con el de MON y CON en nuestro sistema.

Para ello, las células J774A.1 crecidas sobre cubreobjetos colocadas en microplacas de 24 pocillos fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS durante 6 y 24 h, en presencia o ausencia de 50 nM de CON y 20 μ M de MON. Al cabo de esta incubación, se fijaron las células y se procesaron mediante una IFI para detectar TNF- α .

En los macrófagos tratados con LPS y en presencia de CON y MON se detecta una fluorescencia de TNF- α más intensa en el aparato de Golgi que la observada luego de la estimulación con LPS solo. Dicho patrón de fluorescencia es detectado aún a las 24 h p.t (Figura 23A). En consecuencia, tanto la CON como el MON parecieran bloquear el transporte del TNF- α en el aparato de Golgi de los macrófagos estimulados con LPS. Entonces, se evaluó si también afectan la secreción de la proteína mediante un ELISA. Dado que el efecto del CDM sobre la producción del TNF- α en macrófagos estimulados con LPS fue realizado mediante un bioensayo (Figura 16), también se incluyó el tratamiento con CDM en este experimento.

Células J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS y tratadas o no con 50 nM de CON, 20 μ M de MON y 40 μ M de CDM, durante 8 h. Posteriormente, se determinaron los niveles de TNF- α en los sobrenadantes de los cultivos mediante un ELISA. La producción de TNF- α en células tratadas con LPS fue significativamente mayor que en los controles sin tratar ($p < 0,01$) (Figura 23B). Este incremento fue significativamente reducido por MON y CON ($p < 0,01$) en contraste con el fuerte

incremento inducido por CDM ($p < 0,05$) (Figura 23B) que resultó similar al observado mediante el bioensayo (Figura 16).

A

B

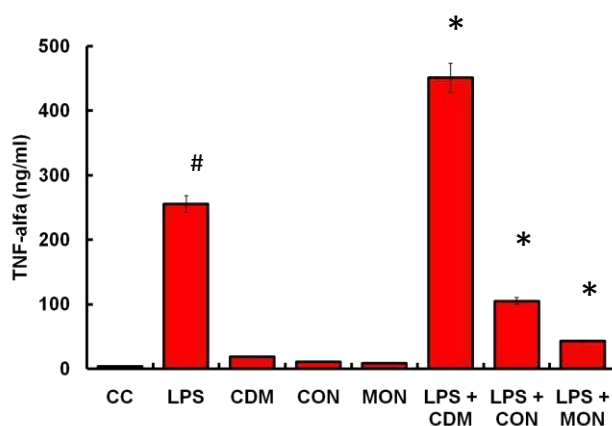


Figura 23. Efecto de CDM, CON y MON en el transporte de TNF- α en células J774A.1 estimuladas con LPS. Células J774A.1 fueron tratadas con CDM (40 μ M), CON (50 nM) o MON (20 μ M) en presencia o no de LPS (100 ng/ml). A) Después de 6 y 24 h de tratamiento, las células fueron fijadas y la localización intracelular de TNF- α se visualizó por la técnica de IFI. B) Después de 8 h de tratamiento, el nivel de TNF- α se cuantificó en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes \pm el desvío estándar. # y * indican diferencias significativas respecto al control y al tratamiento, respectivamente (los valores de p figuran en el texto).

Estos resultados demuestran que otros agentes acidotrópicos como la CON y el MON detienen el tráfico intracelular del TNF- α a nivel del aparato de Golgi e inhiben su secreción, mientras que CDM sólo ejerce un efecto transitorio en su transporte e incrementa su producción.

2.3. Efecto de CDM en las proteínas virales de HSV-1

Teniendo en cuenta que CDM afectó el transporte de una glicoproteína celular de manera transitoria, nos propusimos investigar si también provoca un bloqueo temporario en el transporte de una glicoproteína viral como la gD de HSV-1.

Para ello, células NHC crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=1) y tratadas o no con 40 μ M de CDM y luego de 12 h de infección, se les agregó o no 100 μ g/ml de CHX. Al cabo de 24 h de infección, las células fueron fijadas para llevar a cabo una IFI usando un Ac anti-gD.

La fluorescencia correspondiente a gD se localizó en la región perinuclear de la mayoría de las células infectadas y tratadas con CDM, a las 24 h p.i. (Figura 24). Cuando se agregó la CHX a las células tratadas con CDM, la gD marcada se distribuyó en el citoplasma y en la membrana plasmática, visualizándose de manera análoga a lo observado en las células infectadas sin tratar con CDM (Figura 24).

Con el objeto de visualizar la localización de gD en la membrana plasmática, se realizó una IFI de membrana de la gD de HSV-1. Para ello, células NHC crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=1) y tratadas o no con 40 μ M de CDM. A las 12 y a las 24 h p.i., las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-gD por 30 min a 4°C. Luego de fijarlas, se incubaron con el Ac anti-IgG de ratón conjugado con Cy-3 por 30 min a 37°C, y se fotografió en un microscopio de epifluorescencia. Además, se fotografió en campo claro para visualizar el número de células totales por campo.

Para determinar el porcentaje de células que exhibían fluorescencia de membrana se contó el número de células totales y fluorescentes en 3 campos diferentes para cada preparado.

En las células tratadas con CDM, el porcentaje de células fluorescentes que expresó gD con respecto a las células infectadas sin tratar fue del 62% a las 12 h p.i. Sin embargo, esta inhibición no fue observada cuando el tratamiento con CDM se extendió hasta las 24 h p.i.

Estos resultados sugieren que CDM provoca un retraso en el transporte de las glicoproteínas virales en lugar de un bloqueo permanente tal como fuera reportado por Barquero *et al* (2004, 2006).

Cuando evaluamos el efecto de CON y MON en el transporte de la gD en células infectadas con HSV-1 mediante una IFI de membrana, observamos que, a las 12 h p.i., ambos compuestos inhibieron el transporte de gD a la membrana. En efecto, se encontró una inhibición del 57% y del 70% en el número de células fluorescentes con respecto a las células infectadas sin tratar, respectivamente. Estos porcentajes de inhibición fueron observados hasta 24 h p.i.

En consecuencia, la CON y el MON provocaron un bloqueo permanente en el transporte de las glicoproteínas virales, al igual que el observado frente a las glicoproteínas celulares.

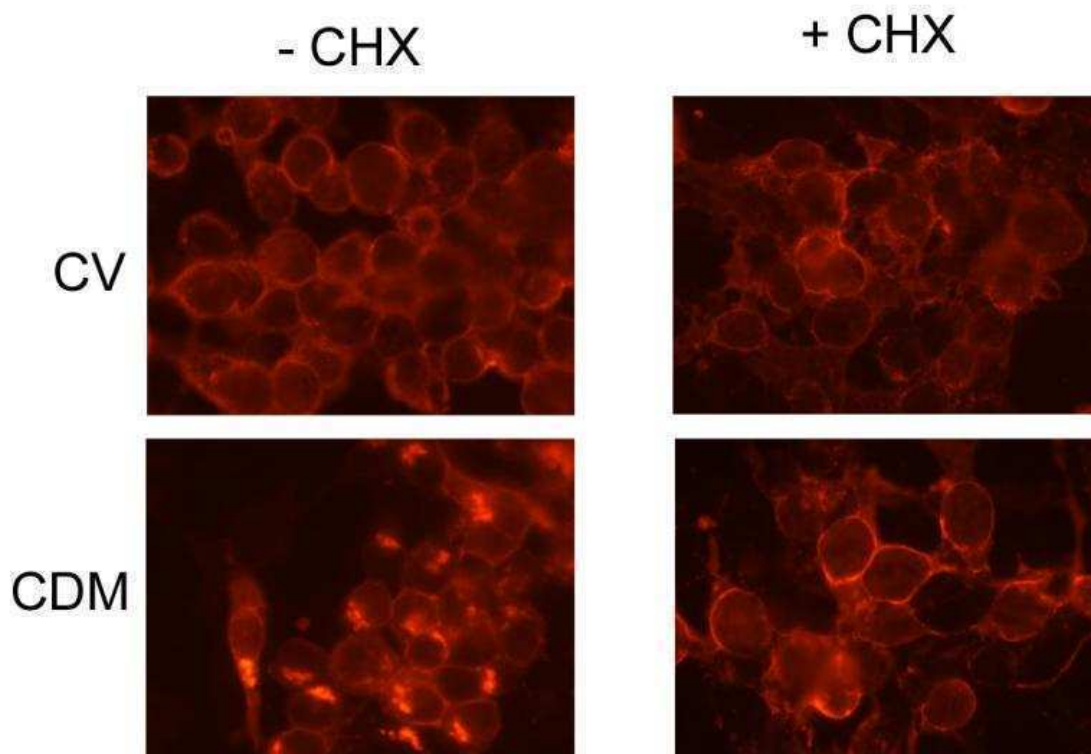


Figura 24. Efecto de CDM en la distribución intracelular de la gD de HSV-1. Células NHC fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=1) y tratadas o no (CV) con CDM (40 mM) y a las 12 h p.i. se agregó o no CHX (100 μ g/ml). A las 24 h p.i., las células fueron fijadas y se realizó una IFI con anticuerpos anti gD. Aumento 400x.

Hasta el presente, sólo se ha investigado el efecto de CDM en la localización intracelular de las glicoproteínas virales, sin haber analizado el resto de las proteínas estructurales de la partícula viral. Entonces, se monitoreó la acción de CDM en el transporte intracelular de proteínas de la cápside, tegumento y envoltura, simultáneamente, en las mismas células infectadas con HSV-1.

Para ello, células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos, fueron infectadas con el virus HSV-1 recombinante YK608 que expresa la proteína de la cápside VP26, la proteína del tegumento VP22, y la de envoltura gB fusionadas a las proteínas fluorescentes YFP (amarilla), RFP (roja) y CFP

(cian), respectivamente. Luego, dichos cultivos celulares fueron tratados o no con 40 μM de CDM y a las 20 h p.i. fueron fijados y visualizados en un microscopio confocal espectral. Dado que la descripción de la multiplicación y del transporte de las proteínas estructurales del virus HSV-1 YK608 está analizada en células Vero, se estudió el efecto de CDM sobre la localización de sus proteínas en estas células (Sugimoto *et al*, 2008).

En las células infectadas con el HSV-1 YK608, la VP26 se acumuló en el citoplasma y en estructuras granulares en el núcleo, la gB se acumuló en el citoplasma y en la membrana plasmática, y la VP22 se distribuyó principalmente en el citoplasma (Figura 25). Cuando se analizó el patrón de localización de las proteínas en las células infectadas y tratadas con CDM, se encontró que se modificó su distribución de la siguiente manera: en el caso de la gB, su localización fue principalmente adyacente al núcleo, coincidente con los resultados previos obtenidos mediante IFI con un Ac anti-gD, en las células infectadas con el virus HSV-1 KOS y tratadas con CDM (Barquero *et al*, 2006) (Figuras 3, 24). La proteína VP22 fue encontrada predominantemente en la región perinuclear co-localizando con la gB (Figura 25). Además, la VP22 aparece distribuida difusamente en el núcleo de las células tratadas (Figura 25). En el caso de la proteína VP26, se detectó en el citoplasma y además co-localizando con gB y VP22 en la región perinuclear (Figura 25). Asimismo, el patrón de fluorescencia puntillado observado en el núcleo de las células control, no se detectó en la mayoría de las células tratadas (Figura 25).

Cabe aclarar que la localización de dichas proteínas virales no es exclusiva de las células Vero infectadas y tratadas con CDM, ya que en las células NHC sometidas a las mismas condiciones, la distribución de las proteínas virales resultó similar (resultados no mostrados).

Por lo tanto, CDM en su acción antiviral no altera exclusivamente el transporte de gB, sino que además perturba la localización intracelular de otros componentes estructurales de la partícula viral, como la VP26 y la VP22.

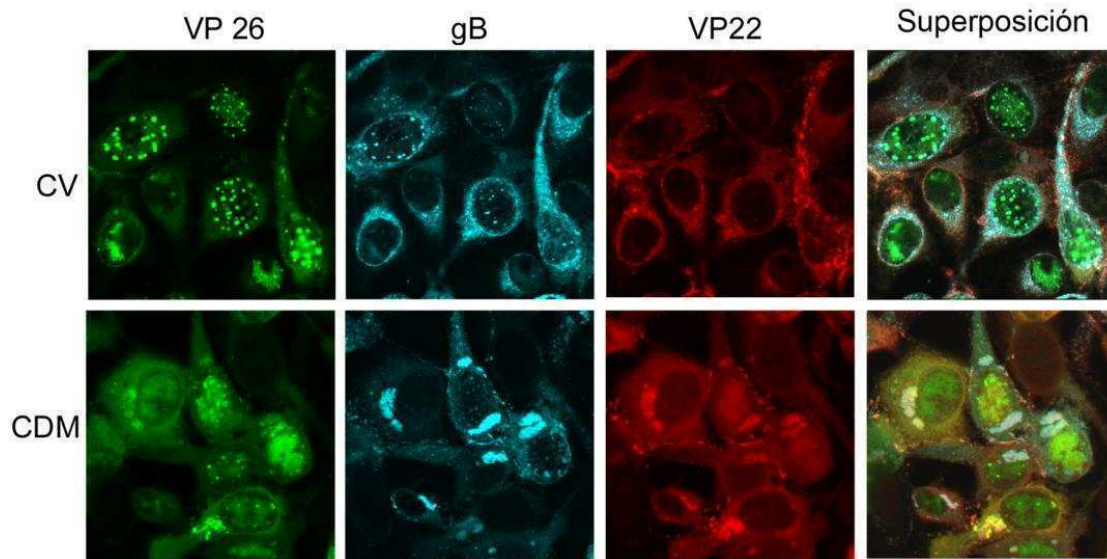


Figura 25. Efecto de CDM en la localización intracelular de las proteínas estructurales de HSV-1. Células Vero crecidas sobre cubreobjetos en una microplaca de 24 pocillos fueron infectadas con el virus tricolor YK608, que corresponde a una cepa de HSV-1 que expresa una proteína de la envoltura (gB), una de la cápside (VP26) y una del tegumento (VP22) fusionadas a proteínas fluorescentes cian, verde y rojo, respectivamente. Luego de la adsorción, las células fueron tratadas con CDM (40 μ M) y a las 20 h post-infección se observaron en un microscopio confocal espectral. Aumento 600x.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA DE CDM

Una de las características más importantes de la enfermedad ocular inducida por HSV-1 es la neovascularización de la córnea, un evento que es necesario para la patogénesis de la QH. Mientras que la córnea normal es avascular, en la QH surgen nuevos vasos sanguíneos que le permiten a las células inflamatorias llegar hasta la córnea, produciendo opacidad corneal y deterioro de la visión (Zheng *et al*, 2001a, 2001b; Biswas y Rouse, 2005). En este proceso están implicadas muchas moléculas, y la más importante es el VEGF (Biswas y Rouse, 2005). Las moléculas de VEGF junto con otros miembros de la familia de angiopoitinas son los factores responsables de la vasculogénesis y la remodelación angiogénica en procesos fisiológicos como el crecimiento de los órganos y la reparación de tejidos (Yancopoulos *et al*, 2000; Carmeliet *et al*, 2005). Pero en ciertas ocasiones, el VEGF puede convertirse en un importante mediador de procesos angiogénicos patológicos, como por ejemplo en la artritis reumatoidea, en la psoriasis, en la retinopatía diabética, en la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y en el crecimiento de tumores y la metástasis (Carmeliet *et al*, 2001; Carmeliet *et al*, 2005; Ferrara *et al*, 2005; Folkman, 2007).

Actualmente hay drogas con actividades antiangiogénicas aprobadas para el tratamiento del cáncer, entre las que se incluyen el uso de anticuerpos monoclonales anti-VEGF (Bevacizumab, Cetuximab y Ranibizumab), inhibidores de la Tirosin Quinasa (Erlotinib, Sorafenib, Sunitinib), inhibidores de la vía mTOR (Temsilolimus y Everolimus,) y compuestos inmunomoduladores (Lenalidomide, Thalidomide e Imiquimod) (Li *et al*, 2008; Cook y Figg, 2010; Urruticoechea *et al*, 2010).

En el caso de la infección ocular inducida por HSV-1 en el ratón se ha demostrado que las córneas tratadas con antagonistas de VEGF presentan una reducción parcial pero significativa de la angiogénesis, así como también de la incidencia y de la severidad de las lesiones de la queratitis (Zheng *et al*, 2001b). Asimismo, en un modelo de QH en conejos se observó que la inyección subconjuntival de bevacizumab disminuye la neovascularización y la inflamación (Saravia *et al*, 2009). Si bien no se han realizado estudios clínicos examinando el tratamiento con drogas antiangiogénicas en pacientes con QH, se ha propuesto el uso de bevacizumab junto a los antiinflamatorios

actualmente aprobados para el tratamiento de la QH (Hosseiniir y Khalili, 2007). A favor de esta hipótesis, se ha reportado el beneficio del bevacizumab en pacientes con neovascularización corneal en la QH y en otras patologías oculares (Erdurmus y Totan, 2007; Carrasco *et al*, 2008; Doctor *et al*, 2008; Vassileva y Hergeldzhieva, 2009).

Durante el desarrollo de la QH murina, las fuentes celulares de VEGF resultan ser de dos tipos: las células epiteliales corneales y los macrófagos. Asimismo, las citoquinas inducidas como consecuencia de la replicación viral en ambos tipos celulares juegan un rol esencial en la inducción de VEGF, siendo la IL-6 la más importante. Las células infectadas con el virus producen IL-6 que estimula a las células no infectadas para secretar VEGF de una forma parácrina (Biswas y Rouse, 2005, Biswas *et al*, 2006; Terasaka *et al*, 2010). Por el contrario, otras citoquinas juegan un rol diferente en la angiogénesis corneal, tal como el TNF- α , que contrarresta el efecto de VEGF en las células endoteliales bloqueando la neovascularización (Fujita *et al*, 2007; Hashizume *et al*, 2009).

Dado que se ha demostrado que MA disminuye la incidencia y la severidad de la neovascularización en los ratones infectados y que CDM modula la producción de IL-6 y de TNF- α en células corneales y macrófagos *in vitro*, consideramos necesario evaluar una posible actividad antiangiogénica de CDM.

3.1. Efecto de CDM sobre la expresión de VEGF

Ha quedado demostrado que CDM es capaz de reducir la producción de IL-6 en macrófagos infectados con HSV-1 o estimulados con LPS (Figuras 9 y 16), y alternativamente en células corneales infectadas con HSV-1 (Figura 9). Dado que la IL-6 estimula la secreción del VEGF, se investigó si CDM afecta la expresión de este potente agente angiogénico (Biswas y Rouse, 2005, Biswas *et al*, 2006; Teresaka *et al*, 2010). En consecuencia, se estudió el efecto de CDM sobre la expresión de VEGF en células J774A.1 y HCLE infectadas y en células J774A.1 estimuladas con LPS.

Se ha descrito que el VEGF se expresa en macrófagos y células epiteliales inducidas con diversos estímulos entre las 4 y 24 h. Dicha expresión se evidenció con el uso de plásmidos reporteros (Du *et al*, 2006; Carbia-Nagashima *et al*, 2007; Ramanathan *et al*, 2007). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó la activación transcripcional del VEGF con estímulos virales y no virales a las 8 y 16 h.

Entonces, las células HCLE y J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos, fueron transfectadas con un plásmido reportero de la actividad transcripcional de VEGF que expresa luciferasa (VEGF-LUC) y un plásmido de β -galactosidasa para normalizar la transfección. A las 24 h post-transfección, las células HCLE y J774A.1 fueron infectadas con HSV-1 (m.i.=1) y las células J774A.1 fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS. Luego de 8 y 16 h de estimulación, se procesaron las células y se midió la expresión de VEGF y de β -galactosidasa en las muestras colectadas. Se determinó la expresión de luciferasa como reportero de la actividad promotora de VEGF y los valores se normalizaron con respecto a la actividad de β -galactosidasa. En el Cuadro 4 se muestran los valores de expresión de luciferasa obtenidas en cada condición de tratamiento.

Los mayores niveles de expresión de VEGF se detectaron luego de las 8 h de infección con HSV-1 y de estimulación con LPS, por lo cual se utilizaron estas condiciones de trabajo para estudiar el efecto de CDM sobre la expresión de VEGF (Cuadro 4).

Las células HCLE y J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron transfectadas con los plásmidos de VEGF-LUC y β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección, ambos tipos celulares fueron infectados con HSV-1 (m.i.=1) y tratados o no con 40 μ M de CDM durante 8 h. Las células J774A.1 transfectadas en iguales condiciones, fueron estimuladas con 100 ng/ml de LPS en ausencia o presencia de 40 μ M de CDM, e incubadas durante 8 h.

CDM no indujo por sí mismo la expresión de VEGF en ambos tipos celulares, ya que no se observaron diferencias significativas entre el valor basal de expresión de VEGF y el obtenido en presencia de CDM (Figura 26). Cuando las células fueron infectadas con HSV-1, la expresión de VEGF se elevó significativamente con respecto a los controles sin infectar ($p < 0,01$ en células

HCLE y J774A.1) (Figura 26). En las células infectadas y tratadas con CDM se produjo una reducción significativa de los valores de expresión de VEGF respecto del control de virus ($p < 0,05$ en células HCLE; $p < 0,01$ en células J774A.1) (Figura 26).

Por lo cual, en ambos tipos celulares la infección con HSV-1 indujo un incremento en la expresión de VEGF que fue reducido por CDM.

Cuadro 4. Expresión del VEGF en células infectadas con HSV-1 y estimuladas con LPS

Línea celular		
	J774A.1	HCLE
URL (Unidades relativas de luciferasa)		
CC	16373 ± 370	80957 ± 7427
HSV-1 8 h	44377 ± 3178 *	245379 ± 15771 *
HSV-1 16 h	23562 ± 5267	127321 ± 8976
LPS 8 h	93201 ± 11770 *	
LPS 16 h	51294 ± 7649	

Células J774A.1 y HCLE fueron co-transfectadas con un plásmido reportero de VEGF-LUC y con un plásmido control de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección fueron estimuladas con HSV-1 (m.i.=1) o con LPS (100 ng/ml) durante 8 y 16 h. A los extractos celulares se les determinó la actividad de luciferasa y los valores fueron normalizados con la actividad de β -galactosidasa (URL). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. * indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,01$).

Por otro lado, las células J774A.1 estimuladas con LPS durante 8 h presentaron un incremento significativo en la expresión de VEGF respecto del control sin estimular ($p < 0,01$). Cuando las células fueron estimuladas con LPS y tratadas con CDM, se redujo significativamente la expresión de VEGF respecto del control estimulado con LPS ($p < 0,05$) (Figura 26A).

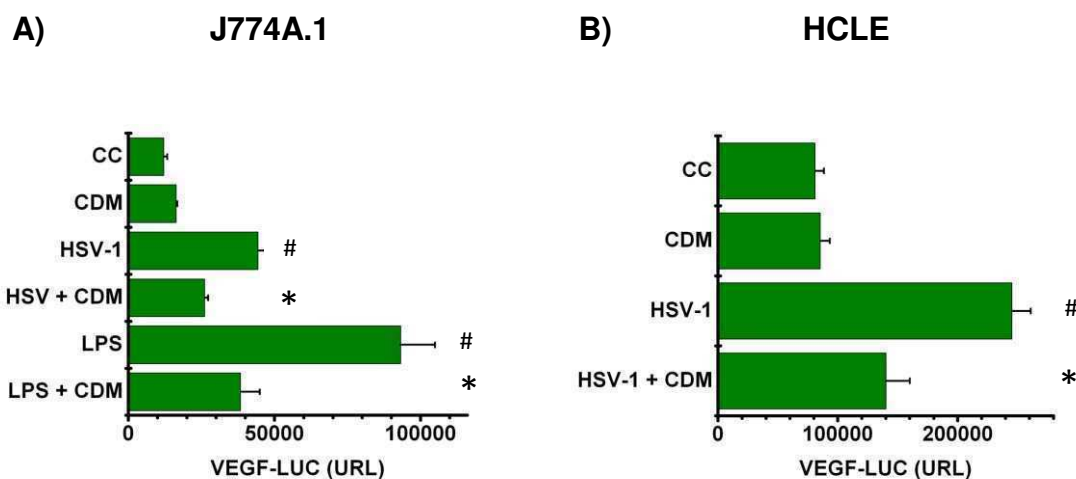


Figura 26. Efecto de CDM en la transcripción de VEGF en células HCLE y J774A.1 infectadas con HSV-1 o estimuladas con LPS. Células A) J774A.1 y B) HCLE fueron transfectadas con un plásmido reportero de VEGF-LUC y con un plásmido control de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección fueron tratadas con CDM (40 μ M) y estimuladas con HSV-1 (m. i.=1) o con LPS (100 ng/ml) durante 8 h. A los extractos celulares se les determinó la actividad de luciferasa y los valores fueron normalizados con la actividad de β -galactosidasa (URL). Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes \pm el desvío estándar. # y * indican diferencias significativas respecto al control y al tratamiento, respectivamente (los valores de p figuran en el texto).

En consecuencia, el aumento de la expresión de VEGF se condice con el incremento de IL-6 detectado en las mismas células frente a los mismos estímulos. Asimismo, el tratamiento con CDM disminuyó la expresión de VEGF en las células estimuladas con LPS e infectadas con HSV-1, coincidentemente con la disminución de IL-6 observada frente a estos estímulos. Por lo tanto, la disminución de VEGF observada en las células tratadas con CDM podría ser consecuencia de la disminución de IL-6, o bien CDM podría presentar un efecto inhibitorio directo sobre la inducción de IL-6 en la expresión de VEGF. Para investigar esta posibilidad, ambos tipos celulares fueron estimulados con IL-6.

Las células HCLE y J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron transfectadas con los plásmidos de VEGF-LUC y de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección, las células fueron estimuladas con 100 ng/ml de IL-6 durante 8 y 16 h. En el Cuadro 5 se muestran los valores de expresión de luciferasa obtenidas en cada condición de tratamiento.

Luego de la estimulación con IL-6 durante 16 h se obtuvieron los mayores niveles de expresión de VEGF en ambos tipos celulares, por lo cual

se eligieron estas condiciones para analizar si CDM afecta la expresión de VEGF frente a este estímulo.

Cuadro 5. Expresión del VEGF en células estimuladas con IL-6

Línea celular		
	J774A.1	HCLE
URL (Unidades relativas de luciferasa)		
CC	16373 ± 370	80957 ± 7427
IL-6 8 h	23649 ± 539	103429 ± 9361
IL-6 16 h	33785,5 ± 885 *	142186 ± 13156 *

Células J774A.1 y HCLE fueron co-transfectadas con un plásmido reportero de VEGF-LUC y con un plásmido control de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección fueron estimuladas con IL-6 (100 ng/ml) durante 8 y 16 h. A los extractos celulares se les determinó la actividad de luciferasa y los valores fueron normalizados con la actividad de β -galactosidasa (URL). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. * indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

Las células HCLE y J774A.1 crecidas en microplacas de 24 pocillos fueron transfectadas con los plásmidos de VEGF-LUC y de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección, las células HCLE y J774A.1 fueron estimuladas con 100 ng/ml de IL-6 y tratadas o no con 40 μ M de CDM durante 16 h.

La expresión de VEGF se elevó significativamente con respecto a los controles sin estimular ($p < 0,05$ en células HCLE y J774A.1) cuando la IL-6 está presente durante 16 h (Figura 27). Si embargo, el agregado de CDM a las células no produjo cambios significativos en la expresión de VEGF con respecto a las células estimuladas con IL-6 (Figura 27).

Por lo tanto, ambos tipos celulares responden al estímulo con IL-6 y se incrementa la transcripción de VEGF. Por otro lado, CDM no fue capaz de reducir la expresión de VEGF frente a la estimulación con IL-6 en ambos tipos celulares. Entonces, la inhibición de la expresión de VEGF estaría relacionada con la capacidad de CDM de reducir los niveles de IL-6 antes demostrada, pero no a un efecto directo sobre dicha citoquina.

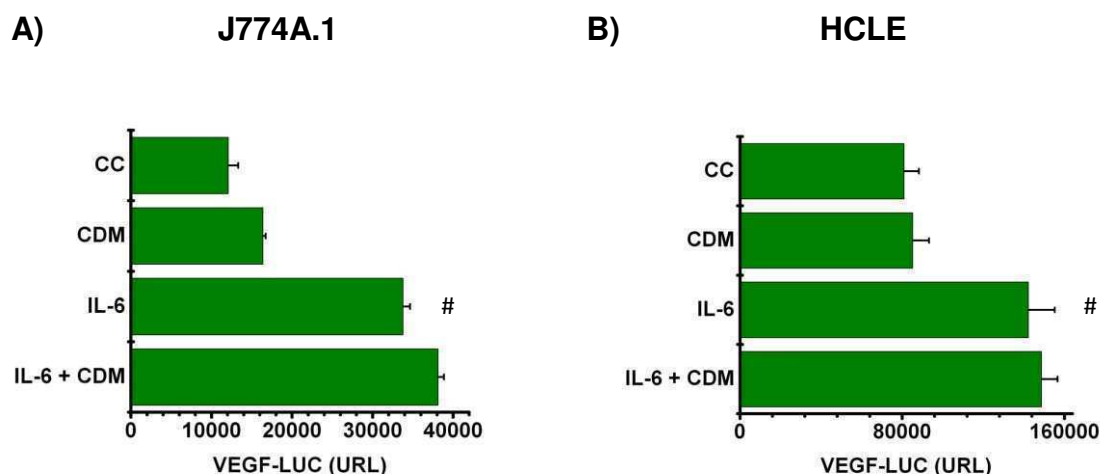


Figura 27. Efecto de CDM en la transcripción de VEGF en células HCLE y J774A.1 estimuladas con IL-6. Células A) J774A.1 y B) HCLE fueron co-transfectadas con un plásmido reportero de VEGF-LUC y con un plásmido control de β -galactosidasa. A las 24 h post-transfección fueron tratadas con CDM (40 μ M) y estimuladas con IL-6 (100 ng/ml) durante 16 h. A los extractos celulares se les determinó la actividad de luciferasa y los valores fueron normalizados con la actividad de β -galactosidasa (URL). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # indican diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

3.2. Efecto de CDM sobre la supervivencia y migración de las células endoteliales y la formación de los tubos capilares

Dado que CDM fue capaz de modular la transcripción del potente factor angiogénico VEGF frente a estímulos virales (HSV-1) y no virales (LPS) independientemente del tipo celular (J774A.1 y HCLE) (Figura 26), resultó interesante evaluar si CDM es capaz de afectar pasos cruciales del proceso angiogénico, tales como la supervivencia y migración de las células endoteliales y la formación de los tubos capilares a partir de dichas células. Aunque la angiogénesis es un proceso complejo en el que intervienen distintos tipos celulares, la formación de los tubos capilares por parte de las células endoteliales es un paso clave en la formación de nuevos vasos (Patan *et al*, 2004).

Las células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC) son células ampliamente utilizadas como modelo *in vitro* de formación de neovasos, por lo cual se investigó la actividad antiangiogénica de CDM en estas células (Dredge *et al*, 2002; Lin *et al*, 2006; Chen *et al*, 2007;

Mangiameli *et al*, 2007; Yi *et al*, 2008; Carneiro *et al*, 2009; De Luisi *et al*, 2009; Lopes *et al*, 2009; Chintalapati *et al*, 2009; Hou *et al*, 2009).

En primer lugar se evaluó si CDM presenta efectos tóxicos y/o antiproliferativos sobre las células HUVEC. Para determinar la citotoxicidad, las células HUVEC fueron crecidas en microplacas de 96 pocillos durante 24 h, y luego incubadas otras 24 h en presencia de distintas concentraciones de CDM. Para determinar la actividad antiproliferativa, las células se cultivaron en presencia de distintas concentraciones de CDM en microplacas de 96 pocillos, durante 24 h. Al cabo de las incubaciones, se determinó la citotoxicidad y la actividad antiproliferativa de CDM en células HUVEC por medio del método colorimétrico del MTT.

Los resultados obtenidos demuestran que CDM no presentó citotoxicidad ni actividad antiproliferativa en las células HUVEC, dado que la CC_{50} y la CI_{50} de CDM en este tipo celular fueron mayores a $100 \mu\text{M}$.

Teniendo en cuenta que la migración celular es un paso fundamental en el proceso angiogénico, se realizó un ensayo de Transwell para evaluar la habilidad de las células HUVEC para cruzar una membrana porosa en presencia de CDM. En la Figura 28 se visualiza un dibujo del Transwell empleado.

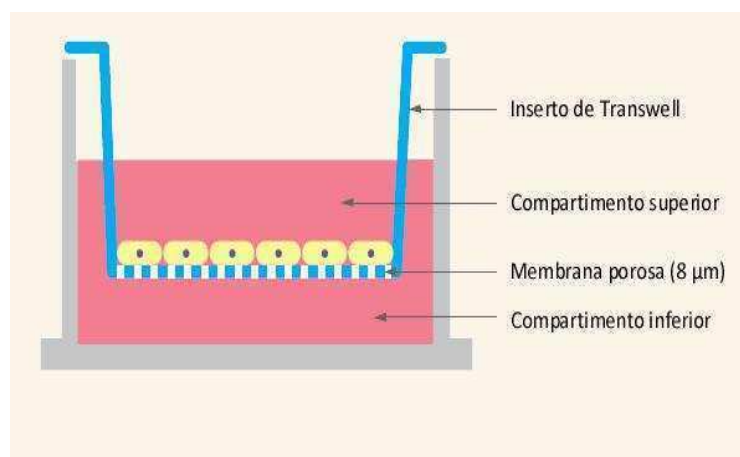


Figura 28. Dibujo del Transwell utilizado.

En la cámara inferior del Transwell se coloca el medio de cultivo con los agentes quimiotácticos. En la cámara superior se siembran las células en presencia o ausencia del compuesto en cuestión. Luego, las células HUVEC

migran a través de la membrana porosa para llegar al compartimento inferior, donde se pueden visualizar y contabilizar mediante técnicas microscópicas.

En primer lugar se estudiaron distintas condiciones que estimulan la migración de las células HUVEC en el Transwell (Lin *et al*, 2006; Yi *et al*, 2008; Lopes *et al*, 2009). Para ello, las células HUVEC fueron sembradas en el compartimento superior del Transwell, e incubadas en presencia de 20% de SFB, 100 ng/ml de IL-6, o 100 ng/ml de LPS en el medio de cultivo del compartimento inferior por 24 h. Si bien se detectó migración celular con LPS y SFB, el mejor agente estimulador fue la IL-6, por lo cual se eligió trabajar con dicha citoquina para activar la migración celular.

Con el objeto de analizar el efecto de CDM sobre la migración celular inducida con IL-6, las células HUVEC fueron sembradas en el compartimento superior del Transwell en ausencia o presencia de distintas concentraciones de CDM. En el compartimento inferior se colocaron 100 ng/ml de IL-6, y se incubó durante 24 h.

La migración de las células HUVEC estimulada con IL-6 fue inhibida significativamente con 40 μ M de CDM ($p < 0,05$) (Figura 29). En consecuencia, CDM es capaz de inhibir la migración de las células HUVEC inducida con IL-6.

Las células HUVEC presentan la particularidad de diferenciarse en una extensiva y completa red de estructuras tipo capilares cuando se las hace crecer sobre pocillos de microplacas con matrigel. Este último le proporciona los factores y nutrientes necesarios para poder diferenciarse. Teniendo en cuenta esta propiedad, las células HUVEC se sembraron en microplacas de 24 pocillos cubiertos con matrigel. A las 4 h de sembrar las células se comenzó a visualizar la formación de estas estructuras para terminar formando una extensa red a las 24 h de incubación (Figura 30) (Chintalapati *et al* 2009; Carneiro *et al*, 2009).

Entonces, se analizó si CDM es capaz de inhibir la formación de estas estructuras tipo capilares. Para ello, las células HUVEC fueron sembradas en presencia de 40 μ M de CDM en microplacas de 24 pocillos cubiertos por matrigel. CDM inhibió significativamente la formación de los tubos capilares tanto a las 4 como a las 24 h, dado que luego del tratamiento las ramificaciones

desaparecieron, y sólo se observaron células redondeadas sin diferenciación (Figura 30).

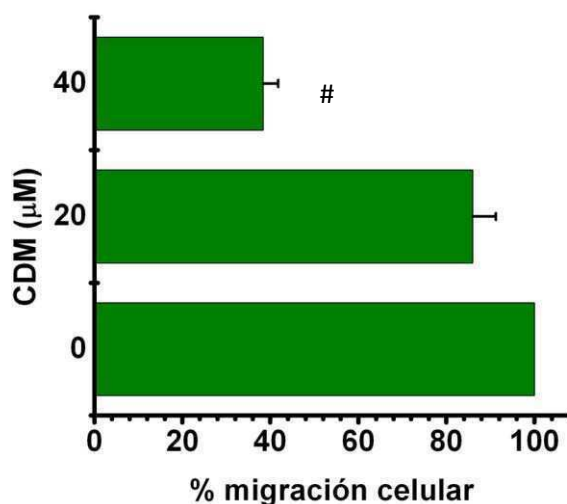


Figura 29. Efecto de CDM en la migración de células HUVEC inducida por IL-6 en Transwell. En la cámara inferior del Transwell se colocaron 600µl de medio que contiene o no IL-6 (100 ng/ml). En la cámara superior se sembraron 100µl de medio con las células (4×10^4 células/pocillo) en presencia o ausencia de CDM en las concentraciones indicadas. A las 24 h las células que migraron fueron teñidas con cristal violeta, fotografiadas y contadas. El porcentaje de migración fue expresado considerando los pocillos sin tratar como el 100%. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$).

Con el objeto de determinar la mínima concentración de CDM que ejerce un efecto inhibitorio en la formación de tubos, se llevó a cabo una curva dosis-respuesta. Para ello, las células HUVEC fueron sembradas en presencia de distintas concentraciones de CDM en microplacas de 24 pocillos cubiertos por matrigel durante 24 h (Ensayo A). Luego se fotografiaron en un microscopio invertido y las estructuras tubulares fueron cuantificadas por conteo manual. Los resultados obtenidos muestran que una concentración de 1,25 µM de CDM resultó suficiente para inhibir significativamente la formación de los tubos capilares ($p < 0,05$), siendo mayor la inhibición a medida que aumentó la concentración de CDM (Figura 31).

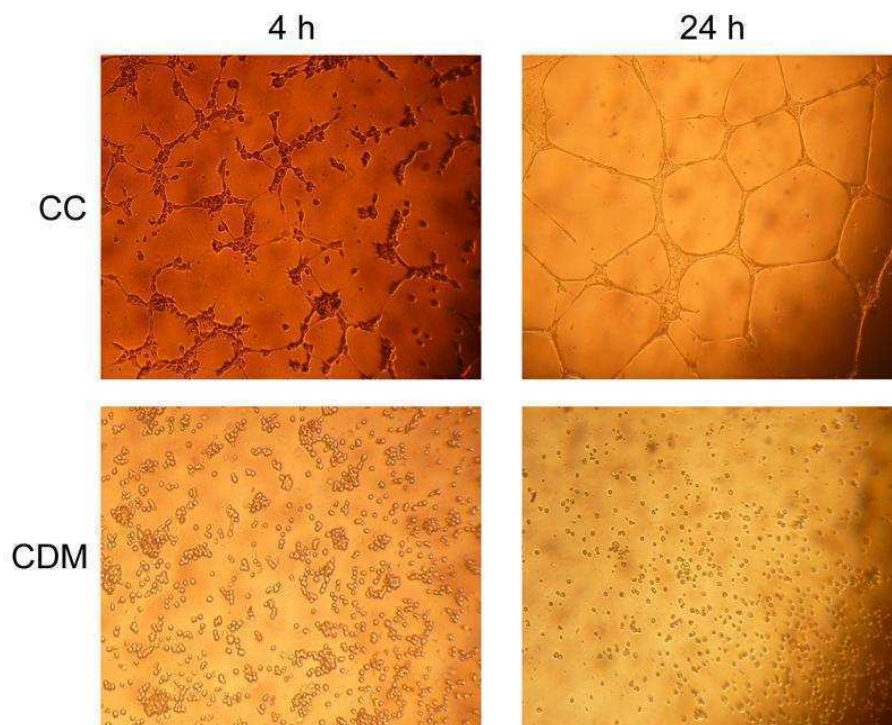


Figura 30. Efecto de CDM en la formación de los tubos capilares. Las células HUVEC fueron crecidas en presencia de CDM (40 μM) en pocillos con matrigel durante 4 y 24 h. Las fotografías son representativas de todo el cultivo.

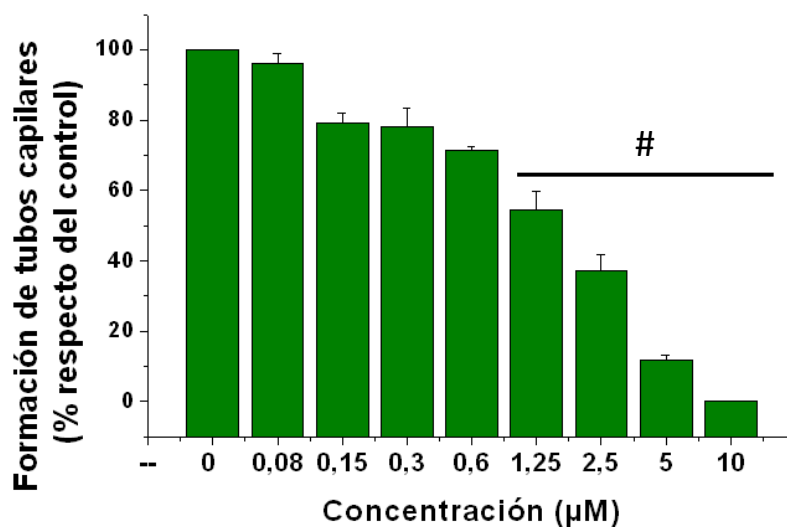


Figura 31. Efecto de CDM en la formación de los tubos capilares. Células HUVEC fueron crecidas en matrigel en presencia de distintas concentraciones de CDM. A las 24 h fueron fotografiadas en un microscopio invertido y se evaluó la formación de tubos capilares. Las estructuras tubulares fueron cuantificadas por conteo manual de un mínimo de 3 campos, y el porcentaje de inhibición fue expresado considerando los pocillos sin tratar como el 100%. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # indica diferencias significativas respecto al control sin tratar ($p < 0,05$)

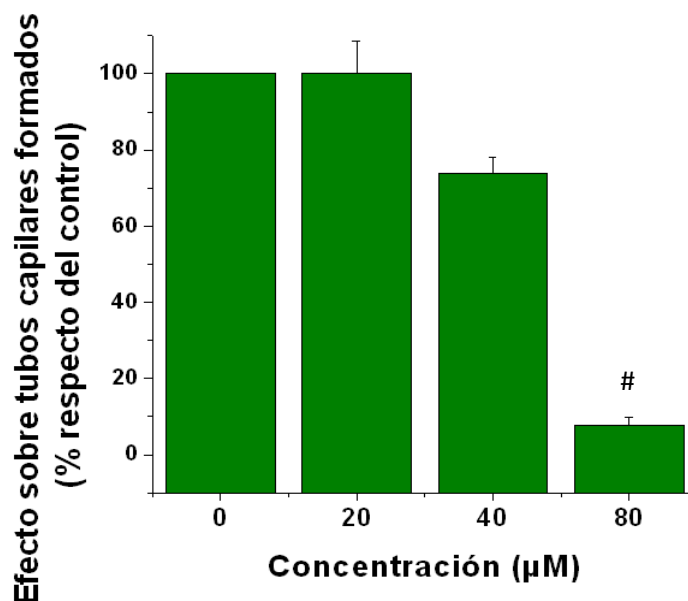


Figura 32. Efecto de CDM sobre tubos capilares formados. Células HUVEC fueron crecidas en matrigel durante 24 h, y al cabo de dicha incubación, las células fueron tratadas con distintas concentraciones de CDM. A las 24 h p.t., las células fueron fotografiadas en un microscopio invertido y se evaluó la formación de tubos capilares. Las estructuras tubulares fueron cuantificadas por conteo manual de un mínimo de 3 campos, y el porcentaje de inhibición fue expresado considerando los pocillos sin tratar como el 100%. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # indica diferencias significativas respecto al control sin tratar ($p < 0,05$).

Además de inhibir la formación de nuevos capilares, se quiso establecer si CDM afecta a los capilares ya formados. Para visualizar la red de capilares, las células HUVEC fueron crecidas en microplacas de 24 pocillos con matrigel. Al cabo de 24 h, se agregaron distintas concentraciones de CDM (Ensayo B).

Se necesitan altas concentraciones de CDM para afectar a los capilares previamente formados, ya que se requirió de una concentración de 80 μM de CDM para desorganizar los tubos capilares ($p < 0,05$) (Figura 32).

De estos resultados se concluye que CDM presentó una potente actividad antiangiogénica *in vitro* inhibiendo la formación de los tubos capilares de células HUVEC. Asimismo, CDM inhibe tanto la formación de nuevos capilares como los cordones que ya están establecidos *in vitro*. Vale destacar que para desorganizar los capilares se requieren de concentraciones de CDM mayores (80 μM) que aquellas necesarias para inhibir la formación de nuevos capilares (1,25 μM).

3.3. Efecto de CDM sobre la producción de citoquinas en cultivos de células HUVEC crecidas en matrigel

Estudios previos realizados mediante el co-cultivo de fibroblastos y células HUVEC demostraron el rol estimulador de la IL-6 en la formación de los tubos capilares a partir de las células HUVEC mediante la inducción de la expresión de VEGF (Hashizume *et al*, 2009). Entonces, inicialmente nos propusimos verificar si la IL-6 presenta el mismo efecto en el modelo de angiogénesis de células HUVEC cultivadas en matrigel.

Para ello, las células HUVEC fueron cultivadas en microplacas de 24 pocillos cubiertos con matrigel en presencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo específico anti-IL-6 durante 24 h. Se observó una reducción significativa en la formación de los tubos capilares en presencia del anticuerpo anti-IL-6 dado que sólo se detectaron un 5% de cordones respecto del control sin anticuerpo, de la misma manera que al utilizar fibroblastos en lugar de matrigel (Hashizume *et al*, 2009).

Dado que la IL-6 resulta importante en el desarrollo de los tubos capilares en el modelo de HUVEC crecidas en matrigel, y que CDM es capaz de reducir la producción de IL-6 en distintas líneas celulares frente a estímulos virales y no virales, nos planteamos si el mecanismo por el cual CDM está ejerciendo su efecto inhibitor de la formación de los tubos capilares es a través de una disminución en la síntesis de IL-6.

Para ello, las células HUVEC fueron sembradas en microplacas de 24 pocillos cubiertos con matrigel en presencia de distintas concentraciones de CDM y, al cabo de 24 h (Ensayo A), se cosecharon los sobrenadantes de cultivo para medir la secreción de IL-6 mediante un ELISA.

Se observa que una concentración de 1,25 μM de CDM redujo significativamente en un 33% la producción de IL-6 secretada por las células HUVEC crecidas en matrigel, mientras que con 10 μM de CDM se obtuvo un 87% (Figura 33A).

Además de inhibir la síntesis de IL-6 producida por los capilares que se encuentran en formación, CDM podría afectar la IL-6 secretada por aquellos capilares que ya están formados. Para ello, se agregaron distintas

concentraciones de CDM en células HUVEC crecidas en microplacas de 24 pocillos con matrigel e incubadas por 24 h, en las que ya se visualiza la red de capilares (Ensayo B), y se cuantificó la producción de IL-6 en los sobrenadantes de cultivo mediante un ELISA.

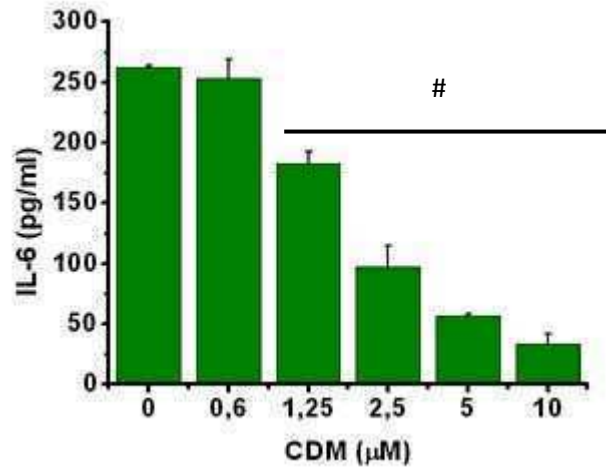
El tratamiento con 80 μM de CDM redujo la síntesis de IL-6 significativamente respecto del control sin tratar ($p < 0,05$), mientras que con 40 μM no se observaron diferencias significativas (Figura 33B).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con ambos tipos de ensayos (A y B) se concluye que CDM disminuyó la producción de IL-6 en los cultivos de células HUVEC crecidas en matrigel en el mismo rango de concentraciones en el cual inhibe la formación de los tubos capilares. Por otro lado, en la concentración en la que no se afectan los tubos por la presencia de CDM (Ensayo A: 0,6 μM ; Ensayo B: 40 μM) no se redujo la producción de IL-6.

Considerando que la reducción de IL-6 puede ser el mecanismo por el cual CDM inhibe la formación de los tubos capilares, se analizó si el agregado de IL-6 exógena revierte el efecto inhibitor de CDM.

Para ello, las células HUVEC fueron sembradas en presencia o no de 40 μM de CDM y de 100 ng/ml de IL-6 en microplacas de 24 pocillos cubiertos con matrigel, durante 24 h. Cuando se realizó el recuento de nuevos vasos formados no se detectaron variaciones significativas en el número de tubos capilares constituidos luego de la estimulación con IL-6 respecto del control sin estimular (Figura 34). Como era de esperar, una concentración de 40 μM de CDM produjo una reducción significativa en el número de cordones ($p < 0,01$) (Figura 34). Asimismo, se observa que el agregado de IL-6 revirtió sólo parcialmente la inhibición de la formación de tubos capilares ejercida por CDM, ya que el número de tubos capilares continúa siendo significativamente menor respecto del control sin tratar ($p < 0,01$) (Figura 34). En consecuencia, además de reducir la producción de IL-6, CDM debe estar ejerciendo otro efecto sobre las células HUVEC para inhibir la formación de los tubos capilares.

A



B

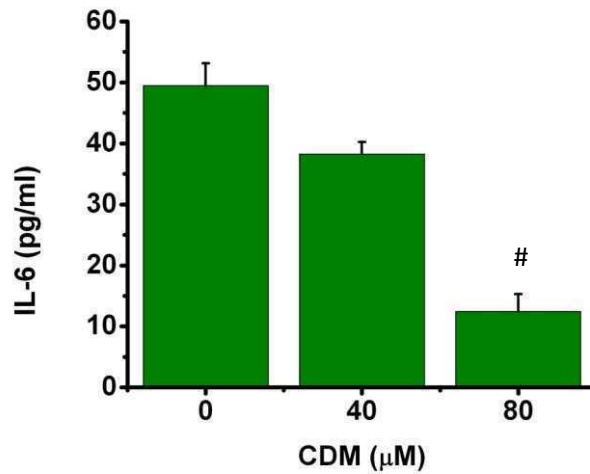


Figura 33. Efecto de CDM sobre la secreción de IL-6 en las células HUVEC crecidas en matrigel. A) Las células fueron crecidas en presencia o no de distintas concentraciones de CDM. A las 24 h se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó IL-6 por ELISA. B) Las células fueron crecidas durante 24 h, y al cabo de dicha incubación, fueron tratadas o no con distintas concentraciones de CDM. A las 24 h p.t. se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó IL-6 por ELISA. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm el desvío estándar. # indica diferencias significativas respecto al control de células sin tratar ($p < 0,05$)

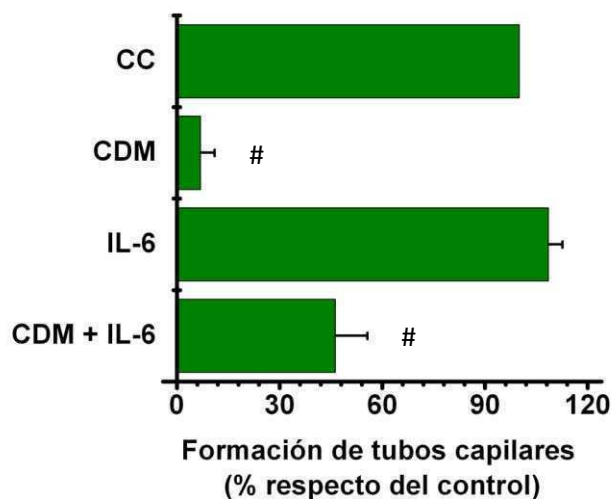


Figura 34. Efecto de CDM en la formación de los tubos capilares en presencia de IL-6. Células HUVEC crecidas en matrigel en presencia de CDM (40 μ M) e IL-6 (100 ng/ml). A las 24 h fueron fotografiadas en un microscopio invertido y se evaluó la formación de tubos capilares. Las estructuras tubulares fueron cuantificadas por conteo manual de un mínimo de 3 campos, y el porcentaje de inhibición fue expresado considerando los pocillos sin tratar como el 100%. # indica diferencias significativas respecto al control sin tratar ($p < 0,01$)

Otra citoquina que presenta un rol importante en la angiogénesis es el TNF- α , dado que estudios previos realizados mediante el co-cultivo de fibroblastos y células HUVEC demostraron un papel inhibitorio del TNF- α en la formación de tubos capilares, antagonizando el efecto del VEGF (Hashizume *et al*, 2009; Fujita *et al*, 2007). Entonces, inicialmente nos propusimos verificar si el TNF- α presenta los mismos efectos en el modelo de angiogénesis de células HUVEC cultivadas en matrigel.

Para ello, las células HUVEC fueron cultivadas en microplacas de 24 pocillos cubiertos con matrigel en presencia de distintas concentraciones de TNF- α durante 24 h. Se observó una inhibición de la formación de cordones dependiente de la concentración de TNF- α y se encontraron diferencias significativas desde los 0,5 pg/ml de TNF- α respecto del control sin tratar ($p < 0,05$) (Figura 35). En consecuencia, en las células HUVEC crecidas en matrigel también observamos un efecto inhibitorio del TNF- α en la formación de cordones, de la misma manera que al utilizar fibroblastos en lugar de matrigel (Hashizume *et al*, 2009).

Teniendo en cuenta que CDM es capaz de aumentar la producción de TNF- α en distintas líneas celulares frente a estímulos virales y no virales, se

consideró que además de inhibir la producción de IL-6, CDM podría incrementar la producción de TNF- α .

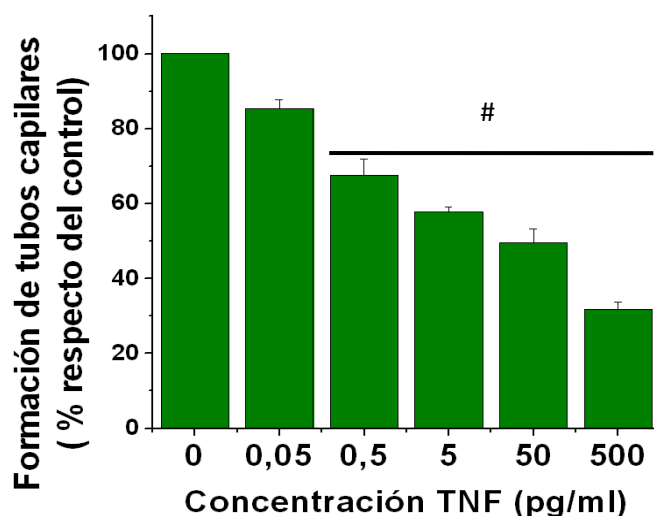


Figura 35. Efecto de TNF- α en la formación de los tubos capilares. Células HUVEC fueron crecidas en matrigel en presencia de distintas concentraciones de TNF- α . A las 24 h fueron fotografiadas en un microscopio invertido y se evaluó la formación de tubos capilares. Las estructuras tubulares fueron cuantificadas por conteo manual de un mínimo de 3 campos, y el porcentaje de inhibición fue expresado considerando los pocillos sin tratar como el 100%. # indica diferencias significativas respecto al control sin tratar ($p < 0,05$)

Para ello, las células HUVEC fueron sembradas en presencia de distintas concentraciones de CDM en microplacas de 24 pocillos cubiertos con matrigel por 24 h, y se cosecharon los sobrenadantes de cultivo para medir los niveles de TNF- α mediante un ELISA.

No se detectó producción de TNF- α tanto en las células control como en las células tratadas con CDM. Dado que los niveles de TNF- α fueron cuantificados a través de un ELISA, es posible que dicho ensayo no fuera lo suficientemente sensible como para detectar concentraciones de TNF- α muy bajas, pero que fueran suficientes como para inhibir la formación de neovasos.

Entonces, se trató de establecer si un exceso de anticuerpos anti-TNF- α es capaz de neutralizar la inhibición ejercida por CDM en la formación de los tubos capilares.

Para ello, las células HUVEC fueron cultivadas en presencia o no de 40 μ M de CDM y de 1 μ g/ml de un anticuerpo específico anti-TNF- α en microplacas de 24 pocillos cubiertos con matrigel, durante 24 h. No se

detectaron variaciones significativas en el número de tubos capilares formados en las células tratadas con el anticuerpo anti-TNF- α respecto del control sin tratar (Figura 36). Por otro lado, se observa que el agregado del anticuerpo revirtió sólo parcialmente la inhibición de la formación de tubos capilares ejercida por CDM, ya que el número de tubos capilares continúa siendo significativamente menor respecto del control sin tratar ($p < 0,01$) (Figura 36).

Dado que el agregado de IL-6 y del anticuerpo anti-TNF- α por separado redujeron sólo parcialmente la inhibición de CDM en la formación de los tubos capilares (Figuras 34 y 36), se determinó si el agregado de ambos en forma simultánea lograba revertir el efecto inhibitorio del CDM sobre la formación de cordones.

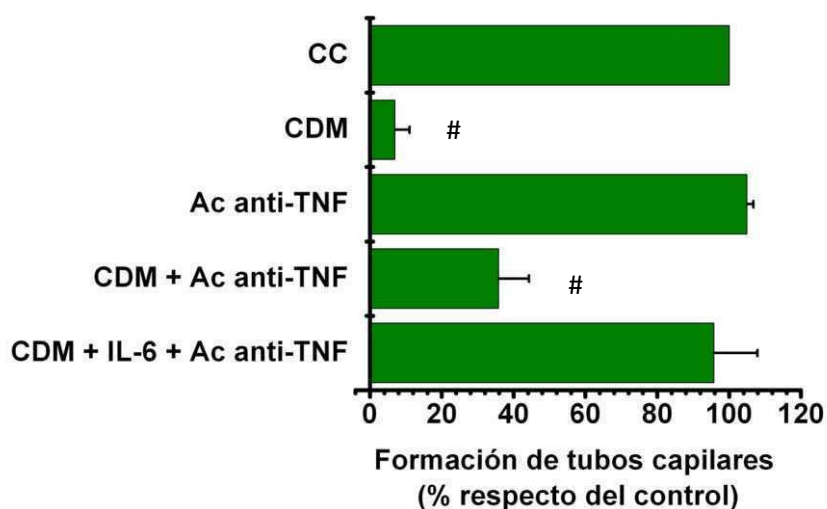


Figura 36. Efecto de CDM en la formación de los tubos capilares en presencia de IL-6 y de un anticuerpo anti-TNF- α . Células HUVEC fueron crecidas en matrigel en presencia de CDM (40 μ M), IL-6 (100 ng/ml), y de un anticuerpo anti-TNF- α (1 μ g/ml). A las 24 h fueron fotografiadas en un microscopio invertido y se evaluó la formación de tubos capilares. Las estructuras tubulares fueron cuantificadas por conteo manual de un mínimo de 3 campos, y el porcentaje de inhibición fue expresado considerando los pocillos sin tratar como el 100%. # indica diferencias significativas respecto al control sin tratar ($p < 0,01$).

Las células HUVEC fueron cultivadas en microplacas de 24 pocillos cubiertos con matrigel durante 24 h, en presencia de CDM (40 μ M), de IL-6 (100 ng/ml) y de un anticuerpo específico anti-TNF- α (1 μ g/ml). La IL-6 junto con el anticuerpo anti-TNF- α revirtieron el efecto inhibitorio ejercido por CDM en la formación de tubos capilares, dado que no existen diferencias

significativas respecto de los tubos formados en el control sin tratar (Figura 36). Sin embargo, resulta importante destacar que los cordones no presentaron el mismo aspecto bajo observación en microscopio, ya que los mismos son más delgados y cortos respecto del control sin tratar (Figura 37).

A partir de estas observaciones, se deduce que CDM reduce el número de tubos capilares formados porque inhibe la producción de IL-6 y aumenta la del TNF- α . Por otro lado, los resultados también sugieren que CDM posiblemente medie otros mecanismos que afecten cualitativamente el desarrollo de los tubos capilares.

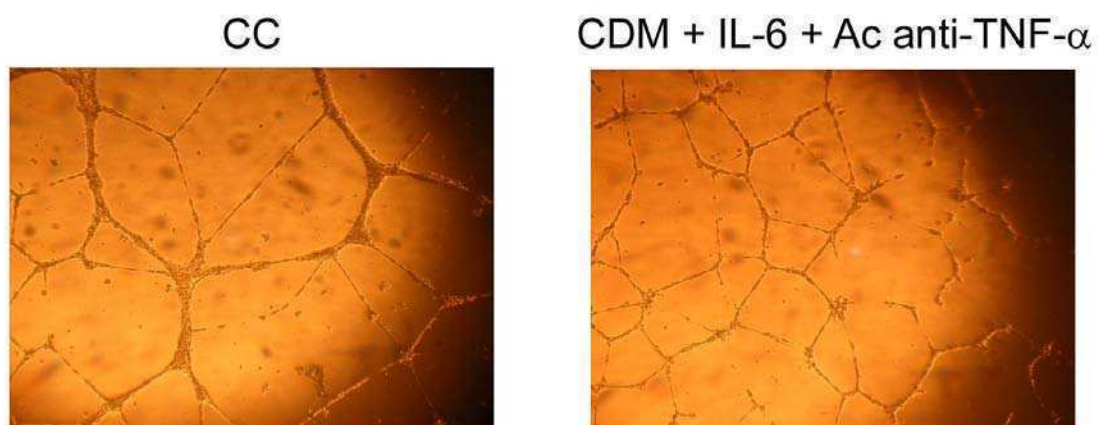


Figura 37. Efecto de CDM, IL-6 y un anticuerpo anti-TNF- α en la formación de cordones en las células HUVEC. Células HUVEC fueron crecidas en matrigel en presencia de CDM (40 μ M), IL-6 (100 ng/ml) y un anticuerpo anti-TNF- α (1 μ g/ml) y a las 24 h fueron fotografiadas en un microscopio invertido. Las fotografías son representativas de todo el cultivo.

DISCUSIÓN

La mayoría de las patologías inducidas por virus son provocadas por el sistema inmune del hospedador. Algunos ejemplos de virus que inducen inmunopatologías relevantes para la salud humana son el VIH, el CMV, HSV, el virus dengue y el HBV. (Davis *et al*, 2007; French *et al*, 2007; Fujinami *et al*, 2006; Guidotti y Chisari, 2006; King *et al*, 2007; Posnett *et al*, 2008; Randone *et al*, 2008). Actualmente, los antivirales de uso clínico son relativamente exitosos en frenar la diseminación viral, pero no impiden la inmunopatogénesis mediada por el virus. Entonces, el tratamiento de estas inmunopatologías suele realizarse a través de la administración al paciente de inmunosupresores tales como los corticosteroides. Sin embargo, estos tratamientos pueden resultar en la prolongación de la enfermedad debido a la reactivación de los virus que persisten en las células hospedadoras, tal como ocurre en el caso de la QH. Se supone que esto se debe a que el virus latente está en reactivación permanente, pero es inhibido por el sistema inmune que reconoce el antígeno viral (Khanna *et al*, 2003; Fujinami *et al*, 2006). Se ha descrito una respuesta inmune persistente durante la latencia caracterizada por infiltrados de LTc y producción de citoquinas responsable de una inmunovigilancia, que tiene como consecuencia impedir que el virus pueda reactivar de la latencia. De allí que aquellos estímulos que afectan la funcionalidad de los LTc (stress, drogas inmunosupresoras tales como los corticosteroides, radiación UV) permiten una reactivación del HSV-1. (Khanna *et al*, 2003; Ramachandran *et al*, 2010).

En el caso particular del tratamiento de la QH en el hombre, se recomienda administrar un antiviral junto con los corticoesteroides de manera tal que mitigue la eventual reactivación viral debida a la inmunosupresión provocada por las drogas antiinflamatorias (Knickelbein *et al*, 2009). Sin embargo, la disponibilidad de drogas antiherpéticas es escasa, y el empleo de los antivirales de uso habitual contra HSV-1 está condicionado por la aparición de mutantes virales resistentes a dichas drogas, tanto en pacientes inmunosuprimidos como en inmunocompetentes (Duan *et al*, 2008). Este hecho, sumado a la inexistencia de una vacuna profiláctica para el HSV-1 plantea la necesidad de la búsqueda de nuevas drogas efectivas contra este virus.

En la actualidad la búsqueda está orientada no sólo a obtener antivirales que interfieran específicamente en alguna etapa del ciclo de multiplicación viral sino que también contempla el hecho de que la droga en cuestión afecte alguna señal celular que participe en la inmunopatogénesis viral. Así se obtiene un efecto final doble: antiviral e inmunomodulador. La obtención de compuestos que presenten en la misma molécula las actividades antiviral e inmunomoduladora permitiría el tratamiento de las inmunopatologías de origen viral como la QH mediante la administración de una única droga, facilitando su uso por parte del paciente, abaratando los costos del tratamiento, y evitando los efectos adversos de los corticosteroides.

En este sentido, en varios trabajos se ha propuesto el uso de inhibidores de la COX para el tratamiento de la QH, dado que presentan tanto actividades antivirales como antiinflamatorias en ratones infectados con HSV-1 (Gebhardt *et al*, 2004, 2005; Biswas *et al*, 2006; Higaki *et al*, 2009; Yin *et al*, 2009). Asimismo, la corporación farmacéutica Redox patentó el complejo quelante de cobalto CTC-96, designándolo como Doxovir™. El CTC-96 presenta actividad antiherpética *in vitro* y propiedades antiinflamatorias en un modelo de artritis murina (Schwartz *et al*, 2001; Woolley *et al*, 1992). Estudios preclínicos realizados con Doxovir™ demostraron una excelente eficacia contra infecciones oculares provocadas por la infección con HSV-1, presentando actividades antiviral y antiinflamatoria. El componente antiinflamatorio de Doxovir™ no es esteroide, por lo cual no presenta las complicaciones asociadas a la terapia esteroideal. Los estudios clínicos de Fase I finalizaron exitosamente mientras que están siendo desarrollados actualmente los estudios de Fase II (Redox Pharmaceutical, 2010).

En nuestro laboratorio, hemos demostrado que la fracción parcialmente purificada MA exhibe ambas propiedades, inmunomoduladora y antiviral, en el modelo de la QH murina, reduciendo la carga viral, la inflamación ocular y la neovascularización (Pifarré *et al*, 2002). En 2003, se purificó y describió la estructura química del principio activo CDM, que, además de su efecto antiviral, ejerce una acción citoprotectora sin citotoxicidad (Alché *et al*, 2003; Barquero *et al*, 2004, 2006).

Tanto Biswas y Rouse (2005) como Deshpande (2001) describen que la replicación de HSV-1 en la córnea es necesaria y responsable del desencadenamiento de la respuesta inflamatoria que origina la inmunopatología de la QH. Además, el blanco de localización y replicación del HSV-1 es el epitelio de la córnea (Carr *et al*, 2001, Biswas y Rouse, 2005). En las células de córnea (HCLE), CDM presentó una actividad antiviral más efectiva a la observada en células J774A.1, NHC y Vero (Figura 2) (Barquero *et al*, 2004). En cuanto a su mecanismo de acción antiviral, al igual que se describió en las células Vero y NHC, se demostró que basifica el pH de los endosomas y afecta el transporte de, al menos, la gD de HSV-1 en las células HCLE (Figura 3,4), (Barquero *et al*, 2004 y 2006). Asimismo, se observó que no sólo afecta el transporte de la gD, sino que además CDM altera dramáticamente el patrón de localización de distintas proteínas estructurales del virus YK608 en células Vero infectadas (Figura 25). En la etapa del ensamblado de la partícula viral, se concentran proteínas de la envoltura, la cápside y el tegumento en el aparato de Golgi (Turcotte *et al*, 2005; Sugimoto *et al*, 2008; Desai *et al*, 2008). Entonces, la alteración de CDM en el transporte de las glicoproteínas virales a través del aparato de Golgi podría estar afectando la localización de las proteínas de la cápside y el tegumento. De todas formas, no podemos descartar un efecto directo sobre la localización de estas proteínas.

De acuerdo a estos resultados, la reducción de la carga viral en los ojos de los ratones infectados y tratados con MA podría atribuirse al efecto antiviral de CDM observado *in vitro* (Pifarré *et al*, 2002).

Por otra parte, la IL-6 y el TNF- α son algunas de las numerosas citoquinas producidas luego de la infección ocular con HSV-1, involucradas en el desarrollo de la inmunopatología (Biswas y Rouse, 2005). La modulación de la producción de citoquinas observada en macrófagos estimulados con LPS e infectados con HSV-1 tratados con CDM *in vitro* (Figuras 9, 10, 16), indican que CDM exhibe propiedades inmunomoduladoras independientemente de su actividad antiviral.

Dado que se observa una disminución en la secreción de IL-6 en los ratones tratados con MA en un modelo de inflamación murino inducido por UVB

(Figura 17), se confirma *in vivo* que MA reduce la producción de IL-6, independientemente de la actividad antiviral. Sin embargo, la producción del TNF- α no se vio afectada en los ratones irradiados y tratados con MA (Figura 17). La discrepancia en el efecto sobre el TNF- α observado *in vitro* e *in vivo* probablemente se deba a que los estímulos de inducción de la inflamación fueron diferentes. Además, en el proceso inflamatorio se conjuga la interacción de muchos tipos celulares, que pueden ser afectados o no por MA, y el resultado global de la producción de TNF- α no sea afectado.

Las citoquinas TNF- α e IL-6 son producidas luego de la infección con HSV-1 como consecuencia de la activación del factor de transcripción NF- κ B (Matsusaka *et al*, 1993; Paludan y Mogensen, 2001). En las células HCLE, J774A.1 y NHC infectadas con HSV-1, CDM reduce significativamente el porcentaje de células translocadas, a las 24 h p.i. (Barquero *et al*, 2006) (Figura 6). Este hecho sería consecuencia de la actividad inhibitoria de CDM sobre la propagación de HSV-1 *in vitro* dado que CDM no inhibió de forma directa la translocación del NF- κ B, sino que redujo la multiplicación viral, y con ella, el número de células infectadas en las cuales se produjo la translocación del NF- κ B al núcleo celular (Figura 7). Este hallazgo se corrobora con la inhibición de la expresión del gen que codifica para la luciferasa como reportero de la actividad de NF- κ B en las células de córnea infectadas (Figura 8).

Por lo tanto, la reducción significativa en la secreción de IL-6 en los macrófagos y en las células epiteliales infectadas y tratadas con CDM podría ser consecuencia de la inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B (Figura 9). Por el contrario, el incremento en la secreción de TNF- α en los macrófagos infectados y tratados con CDM observado en ausencia de activación de NF- κ B (Figura 10) sugiere que podría estar involucrada una vía de señalización intracelular alternativa a la del NF- κ B. Esta posibilidad es apoyada por el hecho que en los macrófagos estimulados con LPS el tratamiento con CDM incrementó la producción de TNF- α y redujo la secreción de IL-6 sin impedir ni la translocación ni la activación del NF- κ B (Figuras 13, 14 y 16).

Dado que se han descrito otras vías de señalización que regulan la producción de citoquinas en macrófagos estimulados con LPS o infectados con

HSV-1, se investigó también la vía de p38 MAPK (Diao *et al*, 2005; Zachos *et al*, 1999). CDM no afectó la activación de p38 MAPK en células J774A.1 estimuladas con LPS, dado que la densitometría de la banda correspondiente a la forma activa de p38 no presentó diferencias entre las células tratadas con CDM y el control de estimulación con LPS, mediante un Western Blot utilizando anticuerpos específicos para la forma fosforilada de p38 MAPK (datos no presentados). Si bien la síntesis de muchas citoquinas tales como el TNF- α y la IL-6 están reguladas fundamentalmente por el NF- κ B y p38 MAPK, la producción de dichas citoquinas en las células tratadas con CDM podría estar modulada por otras vías de señalización intracelular, tales como la c-Jun N-terminal kinase (JNK), también perteneciente a la familia de las MAPK. Asimismo, las MAPK activan otras quinasas, tales como las quinasas de interacción con MAPK (MNK), que también regulan la producción de citoquinas y son blanco de acción de compuestos antiinflamatorios (Rowlett *et al*, 2008). Las MAPK, finalmente, inducen la translocación nuclear del factor de transcripción AP-1, promoviendo la expresión génica del TNF- α y de la IL-6 (Kumagai *et al*, 2008). Por lo tanto, además de las MAPK, AP-1 también podría constituir un blanco de acción de CDM.

El aumento de la intensidad de fluorescencia correspondiente al TNF- α observado en las células tratadas con CDM y LPS respecto del control con LPS a las 6 h p.t., indicaría un aumento de la transcripción y síntesis de la proteína (Figura 23A). Además, se observó un incremento del ARNm del TNF- α correspondiente al tratamiento con LPS y CDM respecto al tratamiento con LPS solo en las células J774A.1, mediante una RT-PCR cualitativa (datos no mostrados), pero estos resultados preliminares obtenidos mediante un ensayo cualitativo deben ser confirmados mediante una RT-PCR cuantitativa. Por lo tanto, el incremento de la producción del TNF- α observado en macrófagos tratados con CDM frente a estímulos virales y no virales (Figuras 10, 16) sugiere que CDM debe activar transcripcionalmente la expresión de esta citoquina por una vía de señalización independiente a la del NF- κ B y p38 MAPK.

Sin embargo, en el caso de la IL-6, el cuadro es diferente, dado que si bien CDM podría estar inhibiendo una vía de señalización diferente a la del NF- κ B y p38 MAPK involucrada en la producción de la IL-6 (Figuras 9 y 16), también podría estar afectando el transporte de la misma a través de la vía secretoria, como ya fuera descrito para las glicoproteínas virales (Barquero *et al.*, 2004, 2006). Además, CDM no afectó la expresión del ARNm de la IL-6 en macrófagos estimulados con LPS detectado mediante una RT-PCR cualitativa (datos no mostrados), y tampoco modificó los niveles de la IL-6 en células epiteliales estimuladas con TNF- α (Figura 15). En consecuencia, la disminución de IL-6 en los macrófagos estimulados con LPS podría ser consecuencia de un efecto post-transcripcional de CDM (Figura 16). A favor de esta presunción, demostramos que CDM no sólo afecta el transporte de las glicoproteínas virales sino que también afecta el transporte de las glicoproteínas celulares, tal como el del TfR-GFP (Figura 18, 24). El bloqueo transiente del transporte de las glicoproteínas celulares y virales (Figura 18, 24) se hace evidente cuando se inhibe la síntesis de las proteínas, ya sea por el “shut off” inducido por HSV-1 en las células infectadas, o por el tratamiento con CHX (Figura 19, 20, 24). En las células J774A.1 tratadas con CDM y LPS, el TNF- α llega a la membrana plasmática para su secreción luego de 24h, de manera similar a lo observado para el TfR-GFP (Figura 23). En este caso, no es necesario agregar CHX para observar su localización final, porque la expresión de TNF- α es rápidamente activada luego del tratamiento con LPS y declina después de 4-6 h (Figura 23) (Manderson *et al.*, 2007).

Entonces, si bien a los tiempos medidos detectamos una reducción en la producción de la IL-6 en los macrófagos tratadas con CDM (Figuras 9 y 16), la misma podría ser una disminución transitoria debida al retraso en el tráfico intracelular de las glicoproteínas, y no verse afectada en tiempos más tardíos. Probablemente, de allí que CDM no haya modificado los niveles de la IL-6 en células epiteliales estimuladas con TNF- α (Figura 15).

Si bien el efecto de CDM sobre el TNF- α puede ser a nivel transcripcional o post-transcripcional, vale la pena destacar que no afecta su actividad citotóxica (Figuras 10 y 16). Asimismo, CDM tampoco afecta la

capacidad del TfR de interactuar con su ligando (Figura 22), razón por lo cual CDM tampoco afecta la funcionalidad biológica de las glicoproteínas celulares.

Los compuestos acidotrópicos, tales como la CON y el MON, bloquean irreversiblemente el transporte de las glicoproteínas, y resultan ser tóxicos para las células e inducen apoptosis (Ohkuma *et al* 1993; Yoshimoto *et al*, 2002; Shaik *et al*, 2004; Souza *et al*, 2005; Singh *et al*, 2006; Gao *et al*, 2010). Dado que CDM sólo retrasa el transporte de las glicoproteínas sin alterar su funcionalidad biológica, esto podría justificar la ausencia de citotoxicidad en todos los cultivos celulares en los que fueron ensayados tanto la fracción semipurificada MA como el compuesto puro CDM, aún cuando ejerce una acción a nivel celular (Figura 2) (Wachsman, 1982, 1984, 1987, 1998; Andrei *et al*, 1985, 1988, 1990; Villamil *et al*, 1995; Castilla *et al*, 1998; Alché *et al*, 2002, 2003; Barquero *et al*, 2004; 2006).

Aunque la CON, el MON y el CDM inducen la alcalinización de los compartimentos intracelulares, afectan diferencialmente el tráfico de las glicoproteínas (Figuras 20, 21). Esto indica que los cambios en el pH no serían la única causa responsable del bloqueo transiente en el transporte de las glicoproteínas provocado por CDM. Se ha descrito una familia de GTPasas llamadas Rabs que están vinculadas a la organización de las vías endocíticas y exocíticas, por lo cual podrían ser el blanco de acción de CDM y de otros compuestos que afectan el tránsito intracelular (Seaman, 2008).

Tanto la IL-6 como el TNF- α están asociados al proceso inflamatorio y a la cascada de eventos que resultan en las lesiones estromales características de la QH murina. Uno de los eventos necesarios para la patogénesis de la QH es la neovascularización de la córnea avascular. Durante la QH, es sabido que la neovascularización es inducida fundamentalmente por el VEGF, el cual es sintetizado por las células de córnea y los macrófagos estimulados por la IL-6, secretadas, a su vez, por las células infectadas (Biswas y Rouse, 2005; Biswas *et al*, 2006).

Las células endoteliales estimuladas por el VEGF migran y forman los neovasos, hechos necesarios para el desarrollo de la vasculatura y propuestos como blancos de numerosos compuestos antiangiogénicos (Dredge *et al*, 2004; De Luisi *et al*, 2009; Cook y Figg, 2010). Asimismo, el TNF- α bloquea el efecto

angiogénico del VEGF en las células endoteliales (Fujita *et al*, 2007; Hashizume *et al*, 2009)

Si bien la neovascularización es un elemento clave en la patogénesis de muchas enfermedades oculares, sólo en la AMD está aprobado el tratamiento con inhibidores de la angiogénesis, como los Ac monoclonales anti-VEGF (Bevacizumab y Ranibizumab) y un aptámero inhibidor de VEGF (Pegaptanib) (Carneiro *et al*, 2009; Cook y Figg, 2010). Muchos proponen el tratamiento de la QH con compuestos antiangiogénicos, considerando la importancia de este evento en la patología (Hosseini *et al*, 2007; Carrasco, 2008; Saravia *et al*, 2009).

Se han investigado propiedades antiangiogénicas de diversos compuestos obtenidos de plantas medicinales, tales como el isoliquiritigenin aislado de la *Glycyrrhiza glabra* L, el epigallocatequin galato (EGCG) de la *Camellia sinensis* L. (té verde), el alcaloide pterogynidine obtenido a partir de *Alchornea glandulosa*, el resveratrol de la uva, el ácido gambónico del *Gamboge Hanburyi*, la Wogonina, un flavonoide obtenido de la *Scutellaria baicalensis*, la curcumina obtenido de la *Curcuma longa* L., y los terpenoides triptolide y celastrol, de la *Tripterygium wilfordii* (Albini *et al*, 2005; Lin *et al*, 2006; Yi *et al*, 2008; Lopes *et al*, 2009; He *et al*, 2009; Cao *et al*, 2010)

El EGCG, el resveratrol, la wogonina y los terpenoides triptolide y celastrol exhiben propiedades inmunomoduladoras, siendo discutida su acción antiangiogénica como consecuencia de su acción moduladora de la respuesta inmune (Albini *et al*, 2005; He *et al*, 2009). Asimismo, el resveratrol, además de las actividades inmunomoduladoras y antiangiogénicas, presenta actividad anti-HSV-1 (Faith *et al*, 2006).

Se postula la investigación de compuestos inmunomoduladores en la búsqueda de agentes antiangiogénicos, dado que muchos mediadores involucrados en la respuesta inmune, como las citoquinas IL-1 α , IL-6 y diversas quemoquinas como la IL-8, también están vinculados al proceso angiogénico. Por lo tanto, la modulación de la respuesta inmune podría afectar la angiogénesis (Albini *et al*, 2005; He *et al*, 2009; Cook y Figg, 2010). Por ejemplo, el compuesto inmunomodulador wogonina posee propiedades

antiangiogénicas *in vitro* e *in vivo* a través de la inhibición de la IL-6 (Lin *et al*, 2006).

Asimismo, hay una fuerte relación entre las células de la inmunidad innata y las células endoteliales, dado que comparten un origen embrionario, y las células endoteliales median el reclutamiento de los leucocitos a los tejidos. De hecho, factores angiogénicos como el VEGF están vinculados en el proceso inflamatorio, pues interviene en la activación de las células endoteliales favoreciendo la adherencia de los leucocitos y su reclutamiento a los tejidos (Scaldaferri *et al*, 2009). Además, los leucocitos producen un gran número de factores que afectan la activación y migración de las células endoteliales, tales como el VEGF y la IL-6 (Albini *et al*, 2005).

Se han explorado propiedades antiangiogénicas de otros compuestos inmunomoduladores tales como los antiinflamatorios no esteroideos, que actuarían a través de la inhibición de la COX, reduciendo la producción mediadores angiogénicos como el VEGF y las prostanglandinas. También se ha desarrollado un derivado del TNF- α , el NGR-TNF, que presenta la particularidad de interactuar con receptores expresados mayoritariamente en la vasculatura tumoral, favoreciendo su acción antiangiogénica sobre los neovasos tumorales y reduciendo sus efectos adversos sobre el resto de los vasos (Albini *et al*, 2005; Corti *et al*, 2010; Cook y Figg, 2010).

En este sentido, hallamos que CDM inhibe la transcripción de VEGF como consecuencia de la reducción de la producción de la IL-6 en células de córnea y macrófagos frente a estímulos virales (HSV-1) y no virales (LPS) (Figura 26). Por otra parte, está descrito que las citoquinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-1 β inhiben la señalización inducida por la IL-6 a través de diversos mecanismos en células epiteliales y macrófagos, tales como la internalización y degradación del receptor de la IL-6 (Bode *et al*, 1999; Bode *et al*, 2003; Radtke *et al*, 2010). A pesar de ello, en los macrófagos tratados con CDM en los que se detecta un incremento del TNF- α , no se observaron efectos sobre la activación transcripcional del VEGF inducida por la IL-6 (Figura 27). De todas formas, no podemos descartar que, en otras condiciones, el TNF- α secretado en las células tratadas con CDM (Figuras 10, 16) pueda influir

negativamente en la señalización de la IL-6, tal como la inhibición de la migración de las células HUVEC inducida por la IL-6 (Figura 29).

Asimismo, CDM inhibe la formación de los tubos capilares en las células HUVEC crecidas en matrigel como consecuencia de la reducción de la síntesis de la IL-6 y el aumento del TNF- α (Figuras 30, 31, 33A, 34, 36, 37). Teniendo en cuenta que se necesitan concentraciones menores de CDM para impedir la formación de los nuevos capilares que aquéllas necesarias para desorganizar los tubos previamente constituidos (Figuras 32, 33B), resultaría interesante como antiangiogénico *in vivo*, de manera de reducir potenciales efectos adversos sobre el resto de los vasos.

Si comparamos el efecto de CDM sobre las células HUVEC y el de otros compuestos antiangiogénicos utilizados actualmente en la clínica, encontramos que, al igual que el CDM, el lenalidomide no exhibe citotoxicidad o efectos antiproliferativos en estas células, e inhibe la formación de los tubos capilares en iguales condiciones a las ensayadas con CDM (Dredge *et al*, 2002; Carneiro *et al*, 2009). Llamativamente, el lenalidomide y el CDM presentan las mismas actividades sobre las células HUVEC y en concentraciones similares, dado que con una concentración de 38,61 μ M, el lenalidomide inhibe la migración de estas células y con 3,86 μ M afecta la formación de los tubos capilares (Dredge *et al*, 2002; Mangiameli *et al*, 2007). Por otra parte, el bevacizumab y el ranibizumab presentan una actividad antiproliferativa e inhiben la formación de los cordones, y no son citotóxicos (Carneiro *et al*, 2009). En cambio, el compuesto pegaptanib no presenta citotoxicidad ni actividad antiproliferativa, no inhibe la migración y tampoco afecta la formación de los tubos capilares (Carneiro *et al*, 2009). Actualmente, los supuestos beneficios clínicos del pagaptanib están en discusión, lo cual es concordante con su inactividad sobre las células HUVEC (Carneiro *et al*, 2009).

Actualmente, están aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer los compuestos inmunomoduladores y antiangiogénicos lenalidomide e imiquimod. El imiquimod se utiliza para el tratamiento del carcinoma de células basales y del sarcoma de Kaposi, entre otros. Éste es un agonista del RTL-7, y se supone que actúa como antiangiogénico por distintos mecanismos, entre ellos la inducción de la expresión de citoquinas antiangiogénicas, como el TNF-

α (Gupta *et al*, 2004; Li *et al*, 2005). Por otro lado, el lenalidomide se utiliza en el tratamiento del mieloma múltiple. Entre los mecanismos propuestos por el cual exhibe sus propiedades antiangiogénicas se encuentra la reducción de la expresión de citoquinas proangiogénicas, tales como la IL-6, la IL-8 y el VEGF (Corti *et al*, 2010). La similitud entre el efecto de CDM y del lenalidomide sobre las células HUVEC antes mencionada, podría deberse a que ambos exhiben su efecto antiangiogénico como consecuencia de un efecto inmunomodulador. Además, CDM inhibe la expresión de una citoquina proangiogénica como la IL-6, al igual que el lenalidomide, e induce la expresión de otra antiangiogénica como el TNF- α , al igual que el imiquimod, por lo cual CDM combina efectos inmunomoduladores de ambos compuestos a favor de una actividad antiangiogénica.

Por todo lo expuesto, proponemos un modelo para explicar el modo de acción de CDM, y la posible razón por la cual MA resultó efectiva para reducir los signos de enfermedad de la QH (Figura 38). La infección de las células epiteliales de la córnea produce un aumento en los niveles de citoquinas proinflamatorias tales como la IL-6, que actuaría como un estimulante de la secreción de factores angiogénicos, permitiendo la incipiente formación de neovasos a través de los cuales se produciría la llegada de macrófagos y neutrófilos al sitio de infección. Las mismas citoquinas y quemoquinas liberadas por las células epiteliales actuarían como quimioattractantes de las células inflamatorias. Una vez en la córnea, macrófagos y neutrófilos serían los responsables de la eliminación del virus replicativo, pero también son responsables del desarrollo de la inmunopatología, siendo una fuente importante de VEGF y de IL-6 adicional. Entonces, el tratamiento de la córnea infectada con CDM reduciría la multiplicación del virus, la activación del NF- κ B y la producción de IL-6 y de VEGF, inhibiendo la llegada de células inflamatorias al sitio de infección. De todas formas, los macrófagos que logren alcanzar la córnea serían estimulados por CDM a aumentar su secreción de TNF- α , por una vía de señalización independiente a la del NF- κ B y p38 MAPK. Por un lado, esta citoquina va a favorecer la eliminación del virus, y por otro, va a contribuir en la inhibición del proceso angiogénico. Además, CDM reduciría la secreción de IL-6 en los macrófagos, probablemente como consecuencia de un

efecto post-transcripcional de CDM. La IL-6 es una citoquina clave requerida particularmente para la inducción de la segunda ola de invasión de las células inflamatorias a la córnea, a través del VEGF. Por lo cual, el VEGF también sería inhibido por CDM como consecuencia de la reducción de la IL-6. El VEGF ocasiona el crecimiento y expansión de los vasos sanguíneos y favorece la llegada de un infiltrado persistente de células inflamatorias. Esta segunda ola de infiltrado inflamatorio está particularmente asociada a la inmunopatología de la QH. En consecuencia, tanto el incremento del TNF- α como la reducción de IL-6 en los macrófagos tratados con CDM contribuirían a una inhibición indirecta del proceso angiogénico. No obstante, CDM también exhibiría un efecto antiangiogénico directo en las células endoteliales, inhibiendo su migración y la formación de tubos capilares a partir de estas células. Asimismo, CDM reduciría la producción de IL-6 e incrementaría la de TNF- α en las células endoteliales, dando lugar a la inhibición de la formación de vasos.

Con todos estos resultados, postulamos que la mejoría de la QH en los ratones tratados con MA puede ser consecuencia de su efecto inmunomodulador observado *in vivo*, y del efecto antiviral, inmunomodulador y antiangiogénico de CDM observado *in vitro*.

Las actividades antiviral, inmunomoduladora y antiangiogénica de CDM en ausencia de toxicidad, sugieren que el blanco de acción de CDM podría ser una o más funciones celulares no esenciales para la supervivencia de la célula, pero involucradas en el transporte de las glicoproteínas y la modulación de citoquinas.

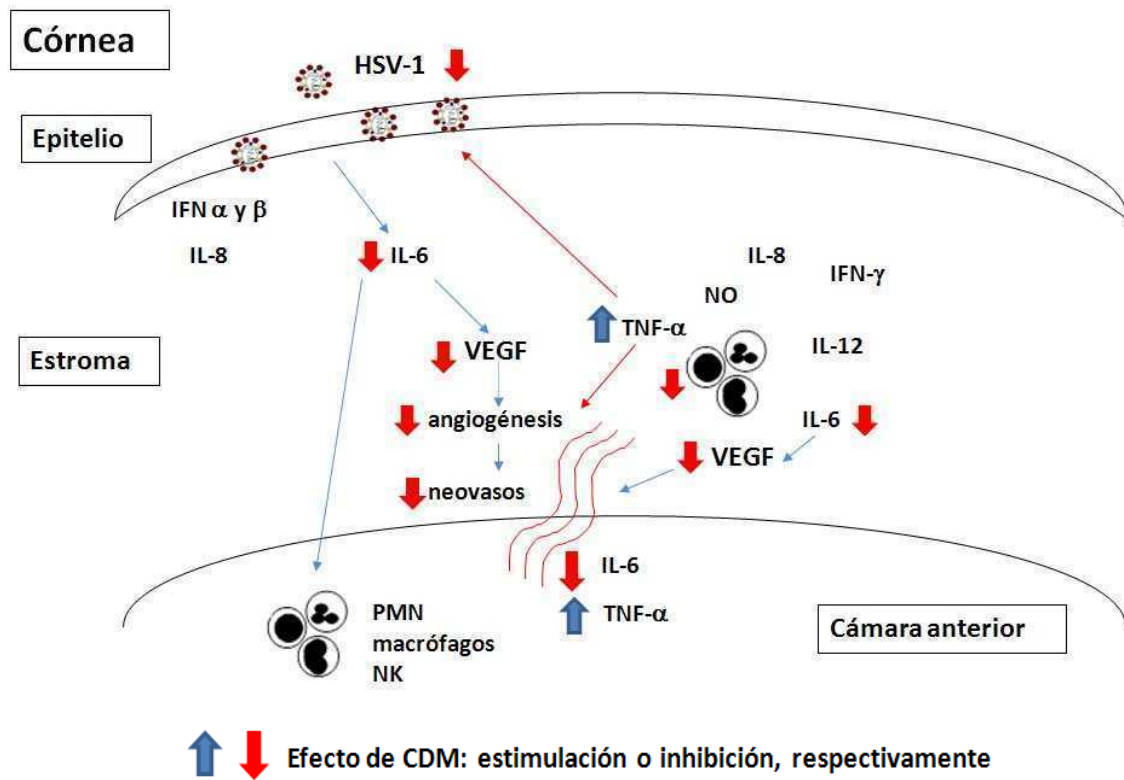


Figura 38. Modelo de acción de CDM propuesto para explicar la mejoría de la QH murina.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pillai S. (Eds.) (2007). Cellular and Molecular Immunology. Saunders-Elsevier, Estados Unidos.
- Abdelgaleil, S.A., Iwagawa, T., Doe, M. y Nakatani, M. (2004) Antifungal limonoids from the fruits of *Khaya senegalensis*. *Fitoterapia*. 75, 566-72.
- Advani, S.J., Hagglund, R., Weichselbaum, R.R. y Roizman, B. (2001). Posttranslational processing of infected cell proteins 0 and 4 of herpes simplex virus 1 is sequential and reflects the subcellular compartment in which the proteins localize. *J Virol* 75, 7904-12.
- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-56.
- Ahmad, A. y Menezes, J. (1996). Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *Faseb J* 10, 258-66.
- Akhtar, J., Tiwari, V., Oh, M. J., Kovacs, M., Jani, A., Kovacs, S. K., Valyi-Nagy, T. y Shukla, D. (2008). HVEM and nectin-1 are the major mediators of herpes simplex virus 1 (HSV-1) entry into human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 4026-35.
- Albini, A., Tosetti, F. y Benelli, R. y Noonan, D.M. (2005). Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res*, 65, 10637-41.
- Alché, L.E., Berra, A., Veloso, M.J., Coto, C.E. (2000). Treatment with meliacine, a plant derived antiviral, prevents the development of herpetic stromal keratitis in mice. *J Med Virol* 61, 474-80.
- Alché, L.E., Barquero, A.A., Sanjuan, N.A. y Coto C.E. (2002). An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains herpes simplex virus type 1 propagation. *Phytother Res* 16, 348-52
- Alché, L.E., Assad Ferek, G., Meo, M., Coto, C.E., Maier, M.S., (2003). An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L. *Z. Naturforsch.* 58c, 215–219.
- Amici, C., Rossi, A., Costanzo, A., Ciafre, S., Marinari, B., Balsamo, M., Levrero, M. y Santoro, M. G. (2006). Herpes simplex virus disrupts NFkappaB regulation by blocking its recruitment on the IkappaBalph promoter and directing the factor on viral genes. *J Biol Chem* 281, 7110-7.

- Andrei, G.M., Coto, C.E. y de Torres, R.A. (1985). Ensayos de citotoxicidad y actividad antiviral de extractos crudos y semipurificados de hojas verdes de *Melia Azedarach* L. *Rev Argent Microbiol* 17, 187-194.
- Andrei, G.M., Damonte, E.B., Torres, R.A. y Coto, C.E. (1988). Induction of a refractory state to viral infection in mammalian cells by a plant inhibitor isolated from leaves of *Melia Azedarach* L. *Antiviral Research* 9, 221-231.
- Andrei, G.M., Coulombie, F.C., Courreges, M.C. y de Torres, R.A. (1990) Meliacine, an antiviral compound from *Melia Azedarach* L., inhibits interferon production. *J Interferon Res* 10, 469-75.
- Arama, V., Cercel, A.S., Vladareanu, R., Mihai, C., Mihailescu, R., Rankin, J., Goschin, S., Filipescu, A., Rafila, A., Arama, S., Hristea, A., Malkin, J.E., Pimenta, J.M. y Smith, J.S., (2010). Type-specific herpes simplex virus-1 and herpes simplex virus-2 seroprevalence in Romania: comparison of prevalence and risk factors in women and men. *Int J Infect Dis*, en prensa
- Arena, A., Bisignano, G., Pavone, B., Tomaino, A., Bonina, F.P., Saija, A., Cristani, M., D'Arrigo, M., Trombetta, D., (2008) Antiviral and immunomodulatory effect of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. buds. *Phytother. Res.* 22, 313–317.
- Armstrong, B.K. y Kricker A. (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*, 63(1-3):8-18.
- Asres, K., Bucar, F. (2005) Anti-HIV activity against immunodeficiency virus type 1 (HIV-I) and type II (HIV-II) of compounds isolated from the stem bark of *Combretum molle*. *Ethiop Med J.* 43, 15-20.
- Aubert, M., O'Toole, J. y Blaho, J.A. (1999). Induction and prevention of apoptosis in human HEp-2 cells by herpes simplex virus type 1. *J Virol* 73, 10359-70.
- Azam, F. y Koulaouzidis, A. (2008). Hepatitis B virus and hepatocarcinogenesis. *Ann Hepatol* 7, 125-9.
- Babu, J. S., Thomas, J., Kanangat, S., Morrison, L. A., Knipe, D. M. y Rouse, B. T. (1996). Viral replication is required for induction of ocular immunopathology by herpes simplex virus. *J Virol* 70, 101-7.

- Baeuerle, P.A. y Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12, 141-79
- Barak, V., Halperin, T. y Kalickman, I. (2001) The effect of Sambucol, a black elderberry-based, natural product, on the production of human cytokines: I. Inflammatory cytokines. *Eur Cytokine Netw.* 12, 290-6.
- Barquero, A.A. (2001). Actividad antiviral presente en hojas de *Melia Azedarach* L.: modelo de acción contra el virus VSV. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Barquero, A.A., Alché, L.E. y Coto, C.E. (2004). Block of vesicular stomatitis virus endocytic and exocytic pathways by 1-cinnamoyl-3, 11-dihydroxymeliacarpin, a tetranortriterpenoid of natural origin. *J. Gen. Virol.* 85, 483–493.
- Barquero, A.A., Michelini, F.M. y Alché, L.E. (2006). 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin is a natural compound with antiviral and nuclear factor- κ B modulating properties. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 344, 955–962
- Barquero, A.A. (2007) Plantas sanadoras: Pasado, presente y futuro. *Revista Química Viva*, Número 2.
- Bauer, D., Schmitz, A., Van Rooijen, N., Steuhl, K., Heiligenhaus, A., (2002). Conjunctival macrophage-mediated influence of the local and systemic immune response after corneal herpes simplex virus-1 infection. *Immunology* 107, 118–128.
- Benencia, F., Courreges, M.C., Massouh, E.J. y Coulombie, F.C. (1994). Effect of *Melia Azedarach* L. leaf extracts on human complement and polymorphonuclear leukocytes. *J Ethnopharmacol* 41, 53-57.
- Benencia, F., Courreges, M.C., Coulombie, F.C. y Coto, C.E. (1997). Immunomodulatory activities of *Melia Azedarach* leaf extracts on human monocytes. *J Herbs, Spices Med Pl.*
- Bidani, A. y Heming, T.A. (1995) Effects of bafilomycin A1 on functional capabilities of LPS-activated alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 57, 275-81.

- Biswas, P. S., Banerjee, K., Kinchington, P. R. y Rouse, B. T. (2006). Involvement of IL-6 in the paracrine production of VEGF in ocular HSV-1 infection. *Exp Eye Res* 82, 46-54.
- Biswas, P. S. y Rouse, B. T. (2005). Early events in HSV keratitis-setting the stage for a blinding disease. *Microbes Infect* 7, 799-810.
- Bode, J.G., Nimmesgern, A., Schmitz, J., Schaper, F., Schmitt, M., Frisch, W., Häussinger, D., Heinrich, P. C. y Graeve, L. (1999). LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett*, 463, 365-370
- Bode, J.G., Schweigart, J., Kehrmann, J., Ehltling, C., Schaper, F., Heinrich, P.C. y Häussinger, D. (2003). TNF-alpha induces tyrosine phosphorylation and recruitment of the Src homology protein-tyrosine phosphatase 2 to the gp130 signal-transducing subunit of the IL-6 receptor complex. *J. Immunol*, 171, 257-266.
- Bresnahan, W. A., Boldogh, I., Chi, P., Thompson, E. A. y Albrecht, T. (1997). Inhibition of cellular Cdk2 activity blocks human cytomegalovirus replication. *Virology* 231, 239-47.
- Brideau, R. J., Knechtel, M. L., Huang, A., Vaillancourt, V. A., Vera, E. E., Oien, N. L., Hopkins, T. A., Wieber, J. L., Wilkinson, K. F., Rush, B. D., Schwende, F. J. y Wathen, M. W. (2002). Broad-spectrum antiviral activity of PNU-183792, a 4-oxo-dihydroquinoline, against human and animal herpesviruses. *Antiviral Res* 54, 19-28.
- Bueno, C., Almeida, J., Alguero, M.C., Sánchez, M.L., Vaquero, J.M., Laso, F.J., San Miguel, J.F., Escribano, L. y Orfao, A. (2001) Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods. *Cytometry* 15, 33-40.
- Buckwold, V.E., Wilson, R.J., Nalca, A., Beer, B.B., Voss, T.G., Turpin, J.A., Buckheit, R.W. 3rd, Wei, J., Wenzel-Mathers, M., Walton, E.M., Smith, R.J., Pallansch, M., Ward, P., Wells, J., Chuvala, L., Sloane, S., Paulman, R., Russell, J., Hartman, T. y Ptak, R. (2004). Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. *Antiviral Res.* 6, 57-62.

- Burton, D. R., Williamson, R. A. y Parren, P. W. (2000). Antibody and virus: binding and neutralization. *Virology* 270, 1-3.
- Cabral, M.M.O., Crescente, E.R.F., Mendonça, P.M., Gomes, C.M.S., Oliveira, V.C. y Kelecom, A. (2008) *Melia azedarach* L. extracts and their activity on *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Brazilian J. Phcog* 18, 699-702.
- Canbay, A., Feldstein, A. E., Higuchi, H., Werneburg, N., Grambihler, A., Bronk, S. F. y Gores, G. J. (2003). Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology* 38, 1188-98.
- Cao, Y. (2010). Angiogenesis: What can it offer for future medicine? *Exp Cell Res* 316, 1304-8.
- Carballal, G., Oubiña, J.R. (Eds.) (1998), *Virología Médica*. Ed. El Ateneo, Argentina.
- Carbia-Nagashima, A., Gerez, J., Perez-Castro, C., Paez-Pereda, M., Silberstein, S., Stalla, G.K., Holsboer, F., Arzt, E. (2007). RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1alpha during hypoxia. *Cell* 19, 309-23.
- Carneiro, A., Falcão, M., Pirraco, A., Milheiro-Oliveira, P., Falcão-Reis, F. y Soares, R. (2009) Comparative effects of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib at intravitreal dose range on endothelial cells. *Exp Eye Res* 88, 522-7.
- Carmeliet, P. y Jain, R. K. (2001). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-57.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.
- Carpinella, M.C., Giorda, L.M., Ferrayoli, C.G. y Palacios, S.M. (2003) Antifungal effects of different organic extracts from *Melia azedarach* L. on phytopathogenic fungi and their isolated active components. *J Agric Food Chem* 51, 2506-11.
- Carpinella, M.C., Ferrayoli, C.G. y Palacios, S.M. (2005) Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. *J. Agric. Food Chem* 53, 2922-2927

- Carpinella, M.C., Miranda, M., Almirón, W.R., Ferrayoli, C.G., Almeida, F.L. y Palacios, S.M. (2007). *In vitro* pediculicidal and ovicidal activity of an extract and oil from fruits of *Melia azedarach* L. *J Am Acad Dermatol* 56, 250-6
- Carr, D. J., Harle, P. y Gebhardt, B.M. (2001). The immune response to ocular herpes simplex virus type 1 infection. *Exp Biol Med (Maywood)* 226, 353-66.
- Carrasco, M.A. (2008) Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization in herpetic stromal keratitis. *Cornea* 27, 743-5.
- Carty, M. y Bowie, A.G. (2010) Recent insights into the role of Toll-like receptors in viral infection. *Clinical and Experimental Immunology*. En prensa.
- Castilla, V., Barquero, A.A., Mersich, S.E. y Coto, C.E. (1998). In vitro anti-Junin virus activity of a peptide isolated from *Melia Azedarach* L. leaves. *Int J Antimicrob Agents* 10, 67-75.
- Chang, J.H., McCluskey, P J. y Wakefield, D. (2006). Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. *Br J Ophthalmol* 90, 103–108.
- Chantrill, B.H., Coulthard, C.E., Dickinson, L., Inkley, G.W., Morris, W. y Pyle, A.H. (1952). The action of plant extracts on a bacteriophage of *Pseudomonas pyocyanea* and on influenza A virus. *J Gen Microbiol* 6, 74–84.
- Chen, J.L., Kernan, M.R., Jolad, S.D., Stoddart, C.A., Bogan, M. y Cooper, R., (2007). Dysoxylins A-D, tetranortriterpenoids with potent anti-rsv activity from *Dysoxylum gaudichaudianum*. *J. Nat. Prod.* 70, 312–315.
- Cheng, H., Tumpey, T. M., Staats, H. F., van Rooijen, N., Oakes, J. E. y Lausch, R. N. (2000). Role of macrophages in restricting herpes simplex virus type 1 growth after ocular infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1402-9.
- Cheng, H., Yan, X., Lin, J., Wang, F. y Xu, W. (2007). Depolymerized products of lambda-carrageenan as a potent angiogenesis inhibitor. *J Agric Food Chem.* 55, 6910-7

- Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., Lin, C.C., (2003). Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med.* 69, 600–604.
- Chintalapati, M., Truax, R., Stout, R., Portier, R., Losso, J.N. (2009). *In vitro* and *in vivo* anti-angiogenic activities and inhibition of hormone-dependent and -independent breast cancer cells by ceramide methylaminoethylphosphonate *J Agric Food Chem.* 57, 5201-10
- Claoue, C. M., Menage, M. J. y Easty, D. L. (1988). Severe herpetic keratitis. Prevalence of visual impairment in a clinic population. *Br J Ophthalmol* 72, 530-3.
- Coelmont, L., Kaptein, S., Paeshuyse, J., Vliegen, I., Dumont, J.M., Vuagniaux, G., Neyts, J. (2009) Debio 025, a cyclophilin binding molecule, is highly efficient in clearing hepatitis C virus (HCV) replicon-containing cells when used alone or in combination with specifically targeted antiviral therapy for HCV (STAT-C) inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 967–976
- Coen, D. M. y Schaffer, P. A. (2003). Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2, 278-88.
- Conboy, I. M., Manoli, D., Mhaiskar, V. y Jones, P. P. (1999). Calcineurin and vacuolar-type H⁺-ATPase modulate macrophage effector functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6324-9.
- Cook, K.M. y Figg, W.D. (2010) Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *Cancer J Clin* 60, 222-43.
- Cooper, N. R. y Nemerow, G. R. (1984). The role of antibody and complement in the control of viral infections. *J Invest Dermatol* 83, 121s-127s
- Coria, C., Almiron, W., Valladares, G., Carpinella, C., Ludueña, F., Defago, M. y Palacios, S. (2008) Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technol* 99, 3066-3070.
- Corti, A., Giovannini, M., Belli, C. y Villa, E.J. (2010). Immunomodulatory Agents with Antivascular Activity in the Treatment of Non-Small Cell Lung

- Cancer: Focus on TLR9 Agonists, IMiDs and NGR-TNF. *J Oncol*, 2010:732680.
- Courreges, M.C., Benencia, F., Coto, C.E., Massouh, E.J. y Coulombie, F.C. (1994). *In vitro* antiphagocytic effect of *Melia Azedarach* leaf extracts on mouse peritoneal exudates cells. *J Ethnopharmacol* 43, 135-140.
- Courreges, M.C., Benencia, F., Coulombie, F.C. y Coto, C.E. (1998). *In vitro* and *in vivo* activities of *Melia Azedarach* L. aqueous leaf extracts on murine lymphocytes. *Phytomedicine* 5, 47-53.
- Crotty, S., Saleh, M.C., Gitlin, L., Beske y O., Andino, R. (2004). The poliovirus replication machinery can escape inhibition by an antiviral drug that targets a host cell protein. *J Virol* 78, 3378-86.
- Cunningham, A.L., Diefenbach, R.J., Miranda-Saksena, M., Bosnjak, L., Kim, M., Jones, C. y Douglas, M.W. (2006). The cycle of human herpes simplex virus infection: virus transport and immune control. *J Infect Dis* 194 Suppl 1, S11-8.
- Daheshia, M., Kanangat, S. y Rouse, B. T. (1998). Production of key molecules by ocular neutrophils early after herpetic infection of the cornea. *Exp Eye Res* 67, 619-24.
- Davis, G.L., Krawczynski, K. y Szabo, G. (2007). Hepatitis C virus infection--pathobiology and implications for new therapeutic options. *Dig Dis Sci* 52, 857-75.
- De Clercq, E. (1997). In search of a selective antiviral chemotherapy. *Clin Microbiol Rev* 10, 674-93.
- De Clercq, E. (2010). 40-Year Journey in Search of Selective Antiviral Chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* En prensa.
- De Luisi, A., Mangialardi, G., Ria, R., Acuto, G., Ribatti, D. y Vacca, A. (2009) Anti-angiogenic activity of carebistine: a plausible mechanism affecting airway remodelling. *Eur Respir J*. 34, 958-66
- Debiaggi, M., Pagani, L., Cereda, P.M., Landini, P., Romero, E. (1988) Antiviral activity of *Chamaecyparis lawsoniana* extract: study with herpes simplex virus type 2. *Microbiologica*. 11,55-61.
- Decker, T., Lohmann-Matthes, M. L. y Gifford, G. E. (1987). Cell-associated tumor necrosis factor (TNF) as a killing mechanism of activated cytotoxic

- macrophages. *J Immunol* 138, 957-62.
- Denizot, F. y Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89, 271-7.
- Desai, P., Sexton, G.L., Huang, E., Person, S., (2008) Localization of herpes simplex virus type 1 UL37 in the Golgi complex requires UL36 but not capsid structures, *J.Virol.* 82 11354–11361.
- Deshpande, S.P., Zheng, M., Lee, S. y Rouse, B.T. (2002). Mechanisms of pathogenesis in herpetic immunoinflammatory ocular lesions. *Vet Microbiol* 86, 17-26.
- Diao, L., Zhang, B., Xuan, C., Sun, S., Yang, K., Tang, Y., Qiao, W., Chen, Q., Geng, Y. y Wang, C., 2005. Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by HSV-1 immediate early protein ICP0. *Exp. Cell Res.* 308, 196–210
- Didkovskii, N. A., Malashenkova, I. K., Tanasova, A. N., Zuikov, I. A., Zuikova, I. N., Khitrik, N. M. y Sarsaniya, Z. S. (2007). Pathogenetic aspects of severe course of herpetic infection. *Bull Exp Biol Med* 144, 447-51.
- Diebold, Y., Calonge, M., Enriquez de Salamanca, A., Callejo, S., Corrales, R. M., Saez, V., Siemasko, K. F. y Stern, M. E. (2003). Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4263-74.
- Dinter, A. Berge E.G. (1998) Golgi-disturbing agents, *Histochem. Cell Biol.* 109 571–590.
- Diwan, P., Lacasse, J. J. y Schang, L. M. (2004). Roscovitine inhibits activation of promoters in herpes simplex virus type 1 genomes independently of promoter-specific factors. *J Virol* 78, 9352-65.
- Doctor, P.P., Bhat, P.V. y Foster, C.S. (2008) Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Cornea* 27, 992-5.
- Dolar, N., Serdaroglu, S., Yilmaz, G. y Ergin, S., (2006). Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Turkey. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 20, 1232-6.
- Dredge, K., Marriott, J.B., Macdonald, C.D., Man, H.W., Chen, R., Muller, G.W., Stirling, D. y Dalgleish, A.G.. (2002) Novel thalidomide analogues display

- anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *Br J Cancer* 4, 1166-72.
- Dredge, K., Horsfall, R., Robinson, S.P., Zhang, L.H., Lu, L., Tang, Y., Shirley, M.A., Muller, G., Schafer, P., Stirling, D., Dalglish, A.G. y Bartlett, J.B. (2005). Orally administered lenalidomide (CC-5013) is anti-angiogenic in vivo and inhibits endothelial cell migration and Akt phosphorylation in vitro. *Microvasc Res* 69, 56-63.
- Du, M., Roy, K.M., Zhong, L., Shen, Z., Meyers, H.E. y Nichols, R.C. (2006) VEGF gene expression is regulated post-transcriptionally in macrophages. *FEBS J* 273, 732-45.
- Duan, R., de Vries, R.D., Osterhaus, A.D., Remeijer, L. y Verjans, G.M. (2008) Acyclovir-resistant corneal HSV-1 isolates from patients with herpetic keratitis. *J Infect Dis.* 198, 659-63.
- Duffield, J. S., Forbes, S. J., Constandinou, C. M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R. y Iredale, J. P. (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 115, 56-65.
- Ellermann-Eriksen, S. (2005). Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology* 2, 59.
- Enquist, L. W., Husak, P. J., Banfield, B. W. y Smith, G. A. (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* 51, 237-347.
- Epstein, S.P., Pashinsky, Y.Y., Gershon, D., Winicov, I., Srivilasa, C., Kristic, K.J. y Asbell, P.A. (2006). Efficacy of topical cobalt chelate CTC-96 against adenovirus in a cell culture model and against adenovirus keratoconjunctivitis in a rabbit model. *BMC Ophthalmol.* 5, 6-22
- Erdurmus, M. y Totan, Y. (2007) Subconjunctival bevacizumab for corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245, 1577-9.
- Faith, S.A., Sweet, T.J., Bailey, E., Booth, T. y Docherty, J.J. (2006). Resveratrol suppresses nuclear factor-kappaB in herpes simplex virus infected cells. *Antiviral Res* 72, 242-51.

- Feldman, L.T., Ellison, A.R., Voytek, C.C., Yang, L., Krause, P., y Margolis, T. P. (2002) Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 978–983.
- Fenton, R.R., Molesworth-Kenyon, S., Oakes, J.E. y Lausch, R.N. (2002). Linkage of IL-6 with neutrophil chemoattractant expression in virus induced ocular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 737-43.
- Ferrara, N. y Kerbel, R.S. (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 15, 967-74.
- Folkman, J. (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 6, 273-86.
- French, M. A. (2007). Disorders of immune reconstitution in patients with HIV infection responding to antiretroviral therapy. *Curr HIV/AIDS Rep* 4, 16-21.
- Fujinami, R.S., von Herrath, M.G., Christen, U. y Whitton, J.L. (2006). Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clin Microbiol Rev* 19, 80-94.
- Fujita, S., Saika, S., Kao, W.W., Fujita, K., Miyamoto, T., Ikeda, K., Nakajima, Y., Ohnishi, Y., 2007. Endogenous TNF alpha suppression of neovascularization in corneal stroma in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 3051–3055.
- Gamache, D.A., Dimitrijevic, S.D., Weimer, L.K., Lang, L.S., Spellman, J. M., Graff, G. y Yanni, J.M. (1997). Secretion of proinflammatory cytokines by human conjunctival epithelial cells. *Ocul Immunol Inflamm* 5, 117-28.
- Gangappa, S., Deshpande, S.P. y Rouse, B.T. (2000). Bystander activation of CD4+ T cells accounts for herpetic ocular lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 453-9.
- Gao, M., Nettles, R.E., Belema, M., Snyder, L.B., Nguyen, V.N., Fridell, R.A., Serrano-Wu, M.H., Langley, D.R., Sun, J.H., O'Boyle, D.R. 2nd, Lemm, J.A., Wang, C., Knipe, J.O., Chien, C., Colonno, R.J., Grasela, D.M., Meanwell, N.A. y Hamann, L.G. (2010). Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature*, 465, 96-100.

- Gao, Y., Lei, Z., Lu, C., Roisen, F.J. y El-Mallakh, R.S. (2010). Effect of ionic stress on apoptosis and the expression of TRPM2 in human olfactory neuroepithelial-derived progenitors. *World J Biol Psychiatry*. En prensa.
- Gatti, E. y Pierre, P. (2003). Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Curr Opin Cell Biol* 15, 468-73.
- Gebhardt ,B.M., Varnell, E.D. y Kaufman, H.E. (2004). Acetylsalicylic acid reduces viral shedding induced by thermal stress. *Curr Eye Res*, 2-3:119-25.
- Gebhardt, B.M., Varnell, E.D. y Kaufman, H.E. (2005). Inhibition of cyclooxygenase 2 synthesis suppresses Herpes simplex virus type 1 reactivation. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2:114-20
- Ghosh, S., May, M. J. y Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-60.
- Ghosh, S. y Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109
- Gipson, I.K. (2007). The ocular surface: the challenge to enable and protect vision: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 4390; 4391-8.
- Gonzalez Maglio, D.H., Paz, M.L., Ferrari, A., Weill, F.S., Czerniczyniec, A., Leoni, J. y Bustamante, J. (2005). Skin damage and mitochondrial dysfunction after acute ultraviolet B irradiation: relationship with nitric oxide production. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 21, 311-7.
- Goodkin, M.L., Ting, A.T. y Blaho, J.A. (2003). NF-kappaB is required for apoptosis prevention during herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* 77, 7261-80.
- Greco, A., Diaz, J.J., Thouvenot, D., Morfin, F. (2007). Novel targets for the development of anti-herpes compounds. *Infect Disord Drug Targets*. 7, 11-8.
- Gregory, D., Hargett, D., Holmes, D., Money, E., Bachenheimer, S. (2004). Efficient replication by herpes simplex virus type 1 involves activation of the IkappaB kinase-IkappaB-p65 pathway. *J. Virol.* 78, 13582–13590
- Griffiths, P.D. (2009). A perspective on antiviral resistance. *J Clin Virol.* 46, 3-8.

- Guan, Z.H., Shorgen (2008). The role of cyclin-dependent protein kinase 2 in the replication of herpes simplex virus. *Bing Du Xue Bao* 24, 96-100.
- Guidotti, L. G. y Chisari, F. V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 1, 23-61.
- Gupta, A.K., Cherman, A.M. y Tyring, S.K. (2004). Viral and nonviral uses of imiquimod: a review. *J Cutan Med Surg*, 8, 338-52.
- Haenchen, S.D., Utter, J.A., Bayless, A.M., Dobrowsky, R.T., Davido, D.J. (2010). Role of a cdk5-associated protein, p35, in herpes simplex virus type 1 replication in vivo. *J Neurovirol.* 16, 405-9.
- Hanifa Moursi, S.A. y Al-Khatib, I.M. (1984) Effect of Melia azedarach fruits on gipsing-restraint stress-induced ulcers in rats. *Jpn J Pharmacol* 36, 527-33.
- Hao, S., y Baltimore, D. (2009) The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol.* 10, 281–288
- Hashizume, M., Hayakawa, N., Suzuki, M. y Mihara, M. (2009) IL-6/sIL-6R trans-signalling, but not TNF-alpha induced angiogenesis in a HUVEC and synovial cell co-culture system *Rheumatol Int* 29, 1449-54.
- He, M.F., Liu, L., Ge, W., Shaw, P.C., Jiang, R., Wu, L.W. y But, P.P. (2009). Antiangiogenic activity of Tripterygium wilfordii and its terpenoids. *J Ethnopharmacol*, 121, 61-8.
- Hendricks, R. L. (1997). An immunologist's view of herpes simplex keratitis: Thygeson Lecture 1996, presented at the Ocular Microbiology and Immunology Group meeting, October 26, 1996. *Cornea* 16, 503-6.
- Higaki, S., Watanabe, K., Itahashi, M. y Shimomura, Y. (2009) Cyclooxygenase (COX)-inhibiting drug reduces HSV-1 reactivation in the mouse eye model. *Curr Eye Res*, 3,171-6.
- Hiscott, J., Kwon, H. y Genin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* 107, 143-51.
- Hober, D. y Sauter, P., (2010) Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat Rev Endocrinol*, 6, 279-89.
- Hohmann, H. P., Remy, R., Scheidereit, C. y van Loon, A. P. (1991). Maintenance of NF-kappa B activity is dependent on protein synthesis

- and the continuous presence of external stimuli. *Mol Cell Biol* 11, 259-66.
- Horowitz, R., Aierstuck, S., Williams, E.A. y Melby, B., (2010). Herpes simplex virus infection in a university health population: clinical manifestations, epidemiology, and implications. *J Am Coll Health.*, 59, 69-74.
- Hosseini, H. y Khalili, M.R. (2007) Therapeutic potential of bevacizumab (Avastin) in herpetic stromal keratitis (HSK). *Med Hypotheses* 2007 69, 568-70.
- Hou, L., Mori, D., Takase, Y., Meihua, P., Kai, K. y Tokunaga, O. (2009) Fumagillin inhibits colorectal cancer growth and metastasis in mice: in vivo and in vitro study of anti-angiogenesis. *Pathol Int.* 59, 448-61.
- Huang, R.C., Tadera, K., Yagi, F., Minami, Y., Okamura, H., Iwagawa, T. y Nakatani, M. (1996) Limonoids from *Melia Azedarach*. *Phytochemistry* 50, 977-982.
- Iannello, A., Debbeche, O., Martin, E., Attalah, L. H., Samarani, S. y Ahmad, A. (2006). Viral strategies for evading antiviral cellular immune responses of the host. *J Leukoc Biol* 79, 16-35.
- Isman, M.B. (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol* 51, 45-66.
- Jaidane, H., Sauter, P., Sane, F., Goffard, A., Gharbi, J. y Hober, D., (2010) Enteroviruses and type 1 diabetes: towards a better understanding of the relationship. *Rev Med Virol.* 20, 265-80
- Joycharat, N., Greger, H., Hofer, O. y Saifah, E. (2008) Flavaglines and triterpenoids from the leaves of *Aglaia forbesii*. *Phytochemistry.* 69, 206-11
- Kanangat, S., Babu, J.S., Knipe, D.M. y Rouse, B.T. (1996). HSV-1-mediated modulation of cytokine gene expression in a permissive cell line: selective upregulation of IL-6 gene expression. *Virology* 219, 295-300.
- Kakimi, K., Lane, T.E., Wieland, S., Asensio, V.C., Campbell, I.L., Chisari, F. V. y Guidotti, L.G. (2001). Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*

- 194, 1755-66.
- Kase, S., Aoki, K., Harada, T., Harada, C., Ohgami, K., Shiratori, K., Nishi, S., Ohno, S. y Yoshida, K., 2004. Activation of nuclear factor-kappa B in conjunctiva with epithelial scraping of the Mouse cornea and human epidemia keratoconjunctivitis. *Br. J. Ophthalmol.* 88, 947–949.
- Kaufman, H.E., Rayfield y M.A., Gebhardt, B.M. (1998). Herpes simplex viral infections. En Kaufman, H. E., Barron, B. A. y McDonald, M. B. (Eds.), *The cornea*. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 247-78.
- Kaye, S.B., Baker, K., Bonshek, R., Maseruka, H., Grinfeld, E., Tullo, A., Easty, D.L., Hart, C.A. (2000). Human herpesviruses in the cornea. *Br J Ophthalmol.* 84, 563-71.
- Kaye, S. y Choudhary, A. (2006) Herpes simplex keratitis. *Prog Retin Eye Res.* 25, 355-80.
- Khan, M.R., Kihara, M. y Omoloso, A.D. (2001) Antimicrobial activity of *Horsfieldia helwigii* and *Melia azedarach*. *Fitoterapia*72, 423-7.
- Khanavi, M., Safavi, M., Siavoshi, F., Fallah Tafti, A., Haji Mahmoodi, M., Haji Akhoondi, A., Rezazadeh, Sh., R y Foroumadi, A. (2008) Evaluation of anti *Helicobacter pylori* activity of methanol extracts of some species of *Stachys* and *Melia*. *J. Med. Plants* 7, 74-80.
- Khanna, K.M., Bonneau, R.H., Kinchington, P. R., Hendricks y Ro. L. (2003) Herpes Simplex Virus-Specific Memory CD8+ T Cells Are Selectively Activated and Retained in Latently Infected Sensory Ganglia. *Immunity*, 18, 593–603.
- Kim, M., Kim, S.K., Park, B.N., Lee, K.H., Min, G.H., Seoh, J.Y., Park, C.G., Hwang, E.S., Cha, C.Y. y Kook, Y.H. (1999) Antiviral effects of 28-deacetylSENDANIN on herpes simplex virus-1 replication. *Antiviral Res.*43, 103-12.
- Kim, Y.W., Zhao, R.J., Park, S.J., Lee, J.R., Cho, I.J., Yang, C.H., Kim, S.G. y Kim, S.C. (2008). Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br J Pharmacol* 154, 165-73
- King, N.J., Getts, D.R., Getts, M.T., Rana, S., Shrestha, B. y Kesson, A.M. (2007). Immunopathology of flavivirus infections. *Immunol Cell Biol* 85,

33-42.

- Kleymann, G., Fischer, R., Betz, U.A., Hendrix, M., Bender, W., Schneider, U., Handke, G., Eckenberg, P., Hewlett, G., Pevzner, V., Baumeister, J., Weber, O., Henninger, K., Keldenich, J., Jensen, A., Kolb, J., Bach, U., Popp, A., Maben, J., Frappa, I., Haebich, D., Lockhoff, O. y Rubsamen Waigmann, H. (2002). New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease. *Nat Med* 8, 392-398
- Klyce, S.D. y Beuerman, R.W. (1998). Structure and function of the cornea. En: Kaufman, H. E., Barron, B. A. y McDonald, M. B. (Eds.), Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 3-50.
- Knickelbein, J.E., Hendricks, RL. y Charukamnoetkanok P. (2009) Management of Herpes Simplex Virus Stromal Keratitis: An Evidence-based Review. *Surv Ophthalmol* 54, 226--234
- Knipe, D. M., Samuel, C. E. y Palese, P. (2001). Virus-Host cell interactions. En :Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Straus, S. E. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, versión electrónica.
- Kotwal, G.J., Kaczmarek, J.N., Leivers, S., Ghebremariam, Y.T., Kulkarni, A.P., Bauer, G., De Beer, C., Preiser, W. y Mohamed, A.R. (2005) Anti-HIV, anti-poxvirus, and anti-SARS activity of a nontoxic, acidic plant extract from the *Trifolium* species Secomet-V/anti-vac suggests that it contains a novel broad-spectrum antiviral. *Ann N Y Acad Sci*.1056, 293-302.
- Kramer, M.F., Chen, S.H., Knipe, D.M., y Coen, D.M. (1998). Accumulation of viral transcripts and DNA during establishment of latency by herpes simplex virus. *The Journal of Virology* 72, 1177–1185.
- Kumagai, Y., Takeuchi, O. y Akira, S. (2008) Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother*.14, 86–92.
- Kumagai, Y., y Akira, S. (2010) Identification and functions of pattern-recognitionReceptors. *J Allergy Clin Immunol*. En prensa.
- Kumar, A. y Yu, F.X. (2006) Toll-Like Receptors and Corneal Innate Immunity. *Curr Mol Med* 6, 327–337.

- Kunz, S. (2009) The role of the vascular endothelium in arenavirus haemorrhagic fevers. *Thromb Haemost*, 102: 1024–1029
- Kuritzkes, D.R. (2009) HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr Opin HIV AIDS*. 4, 82-7.
- Kwon, D.H., Kwon, H.Y., Kim, H.J., Chang, E.J., Kim, M.B., Yoon, S.K., Song, E.Y., Yoon, D.Y., Lee, Y.H., Choi, J.S., Choi, Y.K. (2005) Inhibition of hepatitis B virus by an aqueous extract of *Agrimonia eupatoria* L. *Phytother Res*. 19, 355-8.
- Kwong, A.D. y Frenkel, N. (1989). The herpes simplex virus virion host shutoff Function. *J Virol* 63, 4834-9.
- Lee, S., Zheng, M., Deshpande, S., Eo, S.K., Hamilton, T.A. y Rouse, B.T. (2002a). IL-12 suppresses the expression of ocular immunoinflammatory lesions by effects on angiogenesis. *J Leukoc Biol* 71, 469-76.
- Lee, S., Zheng, M., Kim, B. y Rouse, B.T. (2002b). Role of matrix metalloproteinase-9 in angiogenesis caused by ocular infection with herpes simplex virus. *J Clin Invest* 110, 1105-11.
- Lee, T.H., Kwak, H.B., Kim, H.H., Lee, Z.H., Chung, D.K., Baek, N.I. y Kim, J. (2007) Methanol extracts of *Stewartia koreana* inhibit cyclooxygenase-2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by blocking NF-kappaB transactivation in LPS-activated RAW 264.7 cells. *Mol Cells*.30, 398-404.
- Lepisto, A.J., Frank, G.M. y Hendricks, R.L. (2007). How herpes simplex virus type 1 rescinds corneal privilege. *Chem Immunol Allergy*. 92, 203-12.
- Li, D.Q., Lokeshwar, B.L., Solomon, A., Monroy, D., Ji, Z. y Pflugfelder, S.C.(2001). Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 73, 449-59.
- Li, V.W., Li, W.W., Talcott, K.E. y Zhai, A.W. (2005). Imiquimod as an antiangiogenic agent. *J Drugs Dermatol*, 4, 708-17.
- Li, H., Zhang, J., Kumar, A., Zheng, M., Atherton, S. S. y Yu, F. S. (2006). Herpes simplex virus 1 infection induces the expression of proinflammatory cytokines, interferons and TLR7 in human corneal epithelial cells. *Immunology* 117, 167-76.

- Li, W.W., Hutnik, M. y Gehr, G. (2008) Antiangiogenesis in haematological malignancies. *British Journal of Haematology* 07372, 1365-2141.
- Lichtman, S.N., Wang, J. y Lemasters, J.J. (1998) Lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha release from cultured rat Kupffer cells: sequence of intracellular signaling pathways. *J Leukoc Biol* 64, 368-72.
- Lin, C.M., Chang, H., Chen, Y.H., Wu, I.H. y Chiu, J.H. (2006). Wogonin inhibits IL-6-induced angiogenesis via down-regulation of VEGF and VEGFR-1, not VEGFR- *Planta Med* 72, 1305-10
- Liu, T., Tang, Q. y Hendricks, R.L. (1996). Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 corneal infection. *J Virol* 70, 264-71.
- Looker, K.J. y Garnett, G.P., (2005). A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex Transm Infect.*, 8, 103-7.
- Lopes, F.C., Rocha, A., Pirraco, A., Regasini, L.O., Silva, D.H., Bolzani, V.S., Azevedo, I., Carlos, I.Z. y Soares, R. (2009) Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. *Complement Altern Med* 22;9:15.
- Ludwig, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Wurzer, W.J., Reinhardt, J., Planz, O. y Pleschka, S. (2004). MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS Lett* 561, 37-43.
- Ludwig, S., Pleschka, S., Planz, O., Wolff, T., (2006). Ringing the alarm bells: signalling and apoptosis in influenza virus infected cells. *Cell Microbiol.*, 8, 375-86.
- Madibela, O.R. y Kelemogile, K.M. (2008) Exposure of *Melia azedarach* fruits to *Eimeria* lowers oocyst output in yearling Tswana goats. *Small Rumin Res* 76, 207-210.
- Manderson, A.P., Kay, J.G., Hammond, L.A., Brown, D.L., Stow, J.L., (2007) Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha, *J. Cell. Biol.* 178 57–69
- Mangiameli, D.P., Blansfield, J.A., Kachala, S., Lorang, D., Schafer, P.H., Muller, G.W., Stirling, D.I. y Libutti, S.K. (2007) Combination therapy

- targeting the tumor microenvironment is effective in a model of human ocular melanoma. *J Transl Med* 18, 5:38.
- Manners, G.D. (2007) Citrus limonoids: analysis, bioactivity, and biomedical prospects *J Agric Food Chem.* 55, 8285-94..
- Marsolais, D., Hahmb, B., Walshb, K.B., Edelmannb, K.H., McGavernb, D., Hattad, Y., Kawaokad, Y., Rosena, H., y Oldstoneb M. (2008) A critical role for the sphingosine analog AAL-R in dampening the cytokine response during influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1560–1565.
- Marsters, S. A., Ayres, T. M., Skubatch, M., Gray, C. L., Rothe, M. y Ashkenazi, A. (1997). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR associated factor family and activates the transcription factors NFkappaB and AP-1. *J Biol Chem* 272, 14029-32.
- Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T. y Akira, S. (1993). Transcription factors NF-IL6 and NFkappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10193-7.
- McMahon, M.A., Siliciano, J.D., Lai, J., Liu, J.O., Stivers, J.T., Siliciano, R.F. y Kohli, R.M. (2008). The antiherpetic drug acyclovir inhibits HIV replication and selects the V75I reverse transcriptase multidrug resistance mutation. *J Biol Chem* 283, 31289-93.
- Medzhitov, R. y Janeway, C.A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300.
- Melchjorsen, J., Sirén, J., Julkunen, I., Paludan, S.R. y Matikainen, S. (2006) Induction of cytokine expression by herpes simplex virus in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells is dependent on virus replication and is counteracted by ICP27 targeting NF-kappaB and IRF-3. *J Gen Virol.* 87(Pt 5):1099-108.
- Mester, J.C. y Rouse, B.T. (1991). The mouse model and understanding immunity to herpes simplex virus. *Rev Infect Dis* 13 Suppl 11, S935-45.

- Michelini, F.M., Berra, A. y Alché, L.E. (2007). The in vitro immunomodulatory activity of a synthetic brassinosteroid analogue World account for the improvement of herpetic stromal keratitis in mice. *J. Steroid. Biochem.* 108, 164–170.
- Michelini, F.M. (2009). Actividades antiviral e inmunomoduladora de nuevas moléculas esteroideas obtenidas por síntesis química. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Minagawa, H., Hashimoto, K. y Yanagi, Y. (2004). Absence of tumour necrosis factor facilitates primary and recurrent herpes simplex virus-1 infections. *J Gen Virol* 85, 343-7.
- Mogensen, T.H., Melchjorsen, J., Malmgaard, L., Casola, A. y Paludan, S.R. (2004). Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1. *J Virol* 78, 5883-90.
- Mott, K., Brick, D.J., van Rooijen, N., Ghiasi, H., (2007). Macrophages are important determinants of acute ocular HSV-1 infection in immunized mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 5605–5615
- Müller, B. y Kräusslich, H.G., (2009). Antiviral strategies. *Handb Exp Pharmacol.* 189, 1-24.
- Mukhtar, M., Arshad, M., Ahmad, M., Pomerantz, R.J., Wigdahl, B., Parveen, Z. (2008). Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Res.* 131, 111–120.
- Muregi, F.W., Chhabra, S.C., Njagi, E.N.M., Lang'at-Thoruwa, C.C., Njue, W.M., Orago, A.S.S., Omar, S.A. y Ndiege, I.O. (2004) Anti-plasmodial activity of some Kenyan medicinal plant extracts singly and in combination with chloroquine. *Phytotherapy Res* 18, 379-384.
- Nair, A.S., Shishodia, S., Ahn, K.S., Kunnumakkara, A.B., Sethi, G. y Aggarwal, B.B. (2006) Deguelin, an Akt inhibitor, suppresses I κ B kinase activation leading to suppression of NF- κ B-regulated gene expression, potentiation of apoptosis, and inhibition of cellular invasion. *J Immunol* 177, 5612-22.
- Nakatani, M., Huang, R.C., Okamura, H., Iwagawa, T. y Tadera, K. (1998) Degraded limonoids from *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 49, 1773-1776.

- Nevins, J.R. (2001). Cell transformation by viruses. En : Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Straus, S. E. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, versión electrónica.
- Nicholas, C., Batra, S., Vargo, M.A., Voss, O.H., Gavrillin, M.A., Wewers, M.D., Guttridge, D.C., Grotewold, E. y Doseff, A.I. (2007) Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *J Immunol* 15, 7121-7
- Ntalli, N.G., Cottiglia, F., Bueno, C.A., Alché, L.E., Leonti, M., Vargiu, S., Bifulco, E., Menkissoglu-Spiroudi, U. y Caboni, P. (2010). Cytotoxic tirucallane triterpenoids from *Melia azedarach* fruits. *Molecules*. 15, 5866-77.
- Ohkuma, S., Shimizu, S., Noto, M., Sai, Y., Kinoshita, K. y Tamura, H. (1993). Inhibition of cell growth by bafilomycin A1, a selective inhibitor of vacuolar H(+)-ATPase. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 29A, 862-6.
- Oien, N.L., Brideau, R.J., Hopkins, T.A., Wieber, J.L., Knechtel, M.L., Shelly, J.A., Anstadt, R.A., Wells, P A., Poorman, R.A., Huang, A., Vaillancourt, V.A., Clayton, T.L., Tucker, J.A. y Wathen, M.W. (2002). Broad-spectrum antiherpes activities of 4-hydroxyquinoline carboxamides, a novel class of herpesvirus polymerase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 724-30.
- Oldstone, M.B. (2006). Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. *Virology* 344, 111-8.
- Onunu, A.N. y Uhumwangho, A. (2004). Clinical spectrum of herpes zoster in HIV-infected versus non-HIV infected patients in Benin City, Nigeria. *West Afr J Med* 23, 300-4.
- Ooi, L.S., Wang, H., Luk, C.W. y Ooi, V.E. (2004) Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae) *J Ethnopharmacol*. 94, 117-22.
- Osborn, L., Kunkel, S. y Nabel, G.J. (1989). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86,

- 2336-40.
- Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-66.
- Paludan, S.R. (2001). Requirements for the induction of interleukin-6 by herpes simplex virus-infected leukocytes. *J Virol* 75, 8008-15.
- Paludan, S.R. y Mogensen, S.C. (2001). Virus-cell interactions regulating induction of tumor necrosis factor alpha production in macrophages infected with herpes simplex virus. *J Virol* 75, 10170-8.
- Papadogeorgakis, H., Caroni, C., Katsambas, A., Pimenta, J.M., Avdeliodi, C., Kotrotsou, T., Frangoulis y E., Smith, J.S., (2008). Herpes simplex virus seroprevalence among children, adolescents and adults in Greece. *Int J STD AIDS*, 19, 272-8
- Parrotta, J. y Chaturvedi, A. (1994). *Azadirachta indica*. A. Juss. Neem, margosa. Dirección URL
<http://www.fs.fed.us/global/iitf/Azadirachtaindica.pdf>Azadirachtaindica.pdf
- Pasare, C. y Medzhitov, R. (2005). Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 560, 11-8.
- Patan S. (2004) Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res.* 117:3-32.
- Pavan-Langston, D. (1997). Ocular viral infections: Herpes simplex virus, Epstein-Barr virus, Adenovirus and Poxviruses. En: Galasso, Whitley y Merigan (Eds.), *Antiviral Agents and Human Viral Diseases*, Lippincott-Raven, USA.
- Paz, M.L., Ferrari, A., Weill, F.S., Leoni, J. y Maglio, D.H. (2008) Time-course evaluation and treatment of skin inflammatory immune response after ultraviolet B irradiation. *Cytokine*. 44(1):70-7.
- Perng, G.C., Jones, C., Ciacci-Zanella, J., Stone, M., Henderson, G., Yukht, A., Slanina, S.M., Hofman, F.M., Ghiasi, H., Nesburn, A.B. y Wechsler, S. L. (2000). Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* 287, 1500-3.
- Perng, G.C., y Jones, C. (2010) Towards an Understanding of the Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Reactivation Cycle. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010.

- Petrera, E. y Coto, C.E. (2003). Effect of meliacine, a plant derived antiviral, on tumor necrosis factor alpha. *Fitoterapia* 74, 77–83.
- Pifarré, M.P., Berra, A., Coto, C.E., Alché, L.A., (2002). Therapeutic action of Meliacine, a plant-derived antiviral, on HSV-induced ocular disease in mice. *Exp. Eye Res.* 75, 327–334.
- Pirola, L. y Frojdo, S. (2008). Resveratrol: one molecule, many targets. *IUBMB Life* 60, 323-32.
- Polcicova, K., Biswas, P.S., Banerjee, K., Wisner, T.W., Rouse, B.T., y Johnson, D.C.(2005) Herpes keratitis in the absence of anterograde transport of virus from sensory ganglia to the cornea. *Proc Natl Acad Sci.* 102, 11462–11467
- Pomerantz, J. L. y Baltimore, D. (2002). Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell* 10, 693-5.
- Pompei, R., Flore, O., Marccialis, M.A., Pani, A. y Loddo, B. (1979) Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature* 25,689-90.
- Pope, L.E., Marcelletti, J.F., Katz, L.R., Lin, J.Y., Katz, D.H., Parish, M.L. y Spear, P.G. (1998). The anti-herpes simplex virus activity of ndocosanol includes inhibition of the viral entry process. *Antiviral Res* 40, 85-94.
- Posnett, D.N. (2008) Herpesviruses and autoimmunity. *Curr Opin Investig Drugs.* 9, 505-14.
- Radtke, S., Wüller ,S., Yang, X.P., Lippok, B.E., Mütze, B., Mais, C., de Leur, H.S., Bode, J.G., Gaestel, M., Heinrich, P.C., Behrmann, I., Schaper, F. y Hermanns, H.M. (2010). Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation. *J Cell Sci*, 15, 947-59.
- Ramanathan, M., Pinhal-Enfield, G., Hao, I., Leibovich, S.J. (2007) Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in macrophages by adenosine A2A receptor agonists and endotoxin involves transcriptional regulation via the hypoxia response element in the VEGF promoter. *Mol Biol Cell* 18, 14-23.

- Ramachandran, S., Davoli, K.A., Yee, M.B., Hendricks, R.L. y Kinchington P.R. (2010). Delaying the expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B to a true late gene alters neurovirulence and inhibits the gB-CD8+ 2 T cell response in the trigeminal ganglion. *J. Virol*, En prensa.
- Randone, S.B., Guiducci, S. y Cerinic, M.M. (2008). Systemic sclerosis and infections. *Autoimmun Rev* 8, 36-40.
- Rawls, W. E. y Campione-Piccardo, J. (1981). En: Nahmias, A., Dowdle, W. y Schinazi, R. (Eds.), *The human herpes viruses : an interdisciplinary perspective*, Elsevier, Amsterdam, pp. 137-52.
- Remick, D.G. (1995). Applied molecular biology of sepsis. *J Crit Care* 10, 198-212.
- Richer, M.J. y Horwitz, M.S. (2009). Preventing Viral-induced Type 1 Diabetes. Are Regulatory T Cells the Answer? *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1173, 487–492
- Rodenhuis-Zybert, I.A., Wilschut, J., Smit ,J.M. (2010) Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci.* 67, 2773-86
- Rowlett, R.M., Chrestensen, C.A., Nyce, M., Harp, M.G., Pelo, J.W., Cominelli, F., Ernst , P.B., Pizarro, T.T., Sturgill, T.W. y Worthington, M.T. (2007). MNK kinases regulate multiple TLR pathways and innate proinflammatory cytokines in macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294:G452-9.
- Roy, A. y Saraf, S. (2006) Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol Pharm Bull* 29, 191-201.
- Saleem, R., Ahmed, S.I., Shamim, S.M., Faizi, S. y Siddiqui, B.S. (2002) Antibacterial effect of *Melia azedarach* flowers on rabbits. *Phytother Res* 16, 762-4.
- Sanchez, R. y Mohr, I. (2007). Inhibition of cellular 2'-5' oligoadenylate synthetase by the herpes simplex virus type 1 Us11 protein. *J Virol* 81,3455-64.
- Sanfilippo, C.M., Chirimuuta, F.N. y Blaho, J.A. (2004). Herpes simplex virus type 1 immediate-early gene expression is required for the induction of apoptosis in human epithelial HEp-2 cells. *J Virol* 78, 224-39.
- Sanfilippo, C.M. y Blaho, J.A. (2006). ICP0 gene expression is a herpes

- simplex virus type 1 apoptotic trigger. *J Virol* 80, 6810-21.
- Santoro, M.G., Rossi, A. y Amici, C. (2003). NF-kappaB and virus infection: who controls whom. *Embo J* 22, 2552-60.
- Saravia M, Zapata G, Ferraiolo P, Racca L, Berra A. (2009) Anti-VEGF monoclonal antibody-induced regression of corneal neovascularization and inflammation in a rabbit model of herpetic stromal keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247, 1409-16.
- Sarangi, P.P., Woo, S.R., Rouse, B.T. (2009). Control of viral immunoinflammatory lesions by manipulating CD200:CD200 receptor interaction. *Clinical Immunology* 131, 31–40
- Scaldaferri, F, Vetrano, S, Sans, M, Arena, V, Straface, G, Stigliano, E, Repici, A, Sturm, A, Malesci, A, Panes, J, Yla-Herttuala, S, Fiocchi, C y Danese, S (2009). VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 136, 585-95.
- Schang, L. M., Phillips, J. y Schaffer, P. A. (1998). Requirement for cellular cyclin-dependent kinases in herpes simplex virus replication and transcription. *J Virol* 72, 5626-37.
- Schang, L. M., Rosenberg, A. y Schaffer, P. A. (2000). Roscovitine, a specific inhibitor of cellular cyclin-dependent kinases, inhibits herpes simplex virus DNA synthesis in the presence of viral early proteins. *J Virol* 74, 2107-20.
- Schang, L. M., Bantly, A., Knockaert, M., Shaheen, F., Meijer, L., Malim, M. H., Gray, N. S. y Schaffer, P. A. (2002a). Pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors inhibit replication of wild-type and drug-resistant strains of herpes simplex virus and human immunodeficiency virus type 1 by targeting cellular, not viral, proteins. *J Virol* 76, 7874-82.
- Schang, L. M., Bantly, A. y Schaffer, P. A. (2002b). Explant-induced Reactivation of herpes simplex virus occurs in neurons expressing nuclear cdk2 and cdk4. *J Virol* 76, 7724-35.
- Schuerwegh, A.J., Stevens, W.J., Bridts, C.H. y De Clerck, L.S. (2001) Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. *Cytometry* 15, 172-6.

- Schwartz, J.A., Lium, E.K. y Silverstein, S.J. (2001). Herpes simplex virus type 1 entry is inhibited by the cobalt chelate complex CTC-96. *J Virol* 75, 4117-28.
- Seaman, M.N. (2008) Endosome protein sorting: motifs and machinery, *Cell. Mol. LifeSci.* 65 2842–2858.
- Sehrawat, S., Suryawanshi, A., Hirashima, M., Rouse, B.T. (2009). Role of Tim-3/Galectin-9 Inhibitory Interaction in Viral-Induced Immunopathology: Shifting the Balance toward Regulators. *The Journal of Immunology* 182: 3191–3201.
- Serkedjieva, J., Velcheva, M. (2003) In vitro anti-influenza virus activity of the pavine alkaloid (-)-thalimonine isolated from *Thalictrum simplex* L. *Antivir Chem Chemother* 14, 75-80
- Sethi, G., Ahn, K.S., Sandur, S.K., Lin, X., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, BB. (2006). Indirubin enhances tumor necrosis factor-induced apoptosis through modulation of nuclear factor-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* 18, 23425-35.
- Shaik, M.S., Chatterjee, A. y Singh, M., (2004). Effects of monensin liposomes on the cytotoxicity, apoptosis and expression of multidrug resistance genes in doxorubicin-resistant human breast tumour (MCF-7/dox) cell-line. *J Pharm Pharmacol*, 56, 899-907.
- Shimeld, C., Efstathiou, S. y Hill, T. (2001). Tracking the spread of a lacZtagged herpes simplex virus type 1 between the eye and the nervous system of the mouse: comparison of primary and recurrent infection. *J Virol* 75, 5252-62
- Sidhu, G., Singh, A., Sundarrajan, R.N., Sundar, S.V., Maheshwari, R.K., (1999). Role of vacuolar H⁺-ATPase in interferon-induced inhibition of viral glycoprotein transport. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 1297–1303
- Singh, M., Kalla, N.R. y Sanyal, S.N. (2006). Effect of monensin on the enzymes of oxidative stress, thiamine pyrophosphatase and DNA integrity in rat testicular cells in vitro. *Exp Toxicol Pathol.* 58, 203-8.
- Siow, Y.L., Gong, Y., Au-Yeung, K.K., Woo, C.W. y Choy, P.C. (2005) Emerging issues in traditional Chinese medicine. *Can J Physiol Pharmacol.* 83, 321-34.

- Smith, J.S., Rosinska, M., Trzcinska, A., Pimenta, J.M., Litwinska, B., Siennicka, J., (2006). Type specific seroprevalence of HSV-1 and HSV-2 in four geographical regions of Poland. *Sex Transm Infect.*, 82, 159-63.
- Song, G.Y., DeJong, G. y Jia, W. (1999). Cell surface expression of MHC molecules in glioma cells infected with herpes simplex virus type-1. *J Neuroimmunol* 93, 1-7.
- Souza, A.C., Machado, F.S., Celes, M.R., Faria, G., Rocha, L.B., Silva, J.S. y Rossi, M.A. (2005). Mitochondrial damage as an early event of monensin-induced cell injury in cultured fibroblasts L929. *Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 52, 230-7.
- Staats, H.F. y Lausch, R.N. (1993). Cytokine expression in vivo during murine herpetic stromal keratitis. Effect of protective antibody therapy. *J Immunol* 151, 277-83.
- Stockman, L.J., Bellamy, R., Garner, P. (2006). SARS: systematic review of treatment effects. *PLoS Med.*, 3(9):e343
- Streilein, J.W., Dana, M.R. y Ksander, B.R. (1997). Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunol Today* 18, 443-9.
- Stumpf, T.H., Case, R., Shimeld, C., Easty, D.L. y Hill, T. J. (2002). Primary herpes simplex virus type 1 infection of the eye triggers similar immune responses in the cornea and the skin of the eyelids. *J Gen Virol* 83, 1579-90.
- Sugimoto, K., Uema, M., Sagara, H., Tanaka, M., Sata, T., Hashimoto, Y., Kawaguchi, Y. (2008). Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus. *J. Virol.* 5198–5211.
- Sunthitikawinsakul, A., Kongkathip, N., Kongkathip, B., Phonnakhu, S., Daly, J.W., Spande, T.F., Nimit, Y., Napaswat, C., Kasisit, J. y Yoosook, C. (2003) Anti-HIV-1 limonoid: first isolation from *Clausena excavata* *Phytother Res* 17, 1101-3.
- Superti, F., Ammendolia, M. G. y Marchetti, M. (2008). New advances in anti-HSV chemotherapy. *Curr Med Chem* 15, 900-11.
- Suvas, S., Azkur, A. K., Kim, B. S., Kumaraguru, U. y Rouse, B. T. (2004).

- CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol* 172, 4123-32.
- Szewczuk, V.D., Mongelli, E.R. y Pomilio, A.B. (2006) In vitro anthelmintic activity of *Melia azedarach* naturalized in Argentina. *Phytother Res* 20, 993-6.
- Tang, Q. y Hendricks, R.L. (1996). Interferon gamma regulates platelet endothelial cell adhesion molecule 1 expression and neutrophil infiltration into herpes simplex virus-infected mouse corneas. *J Exp Med* 184, 1435-47.
- Tada, K., Takido, M. y Kitanaka, S. (1999) Limonoids from fruit of *Melia toosendan* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry* 5,787-91
- Takehara, T., Tatsumi, T., Suzuki, T., Rucker, E. B., 3rd, Hennighausen, L., Jinushi, M., Miyagi, T., Kanazawa, Y. y Hayashi, N. (2004). Hepatocytespecific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* 127, 1189-97.
- Terasaka, Y., Miyazaki, D., Yakura, K., Haruki, T. y Inoue Y. (2010). Induction of IL-6 in transcriptional networks in corneal epithelial cells after herpes simplex virus type 1 infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2441-9.
- Thomas, J., Kanangat, S. y Rouse, B. T. (1998). Herpes simplex virus Replication-induced expression of chemokines and proinflammatory cytokines in the eye: implications in herpetic stromal keratitis. *J Interferon Cytokine Res* 18, 681-90.
- Thomsen, D. R., Oien, N. L., Hopkins, T. A., Knechtel, M. L., Brideau, R. J., Wathen, M. W. y Homa, F. L. (2003). Amino acid changes within conserved region III of the herpes simplex virus and human cytomegalovirus DNA polymerases confer resistance to oxodihydroquinolines, a novel class of herpesvirus antiviral agents. *J Virol* 77, 1868-76.
- Tolo, F.M., Rukunga, G.M., Muli, F.W., Njagi, E.N., Njue, W., Kumon, K., Mungai, G.M., Muthaura, C.N., Muli, J.M., Keter, L.K., Oishi, E., Kofi-Tsekpo, M.W. (2006) Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against herpes simplex virus. *J Ethnopharmacol* 8,92-9

- Tumpey, T.M., Chen, S.H., Oakes, J. E. y Lausch, R.N. (1996). Neutrophilmediated suppression of virus replication after herpes simplex virus type 1 infection of the murine cornea. *J Virol* 70, 898-904
- Turcotte, S., Letellier, J., Lippe, R., (2005) Herpes Simplex Virus Type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress, *J. Virol.* 79 8847–8860.
- Tyler, K.L. y Nathanson, N. (2001). Pathogenesis of viral infections. En : Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Straus, S. E. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, versión electrónica.
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Viñals, F., Capellá, G. (2010). Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des* 16, 3-10.
- van der Werf, N., Kroese, F., Rozing, J., Luuk Hillebrands, J., (2007). Viral infections as potential triggers of type 1 Diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 23, 169–183.
- van Zeijl, M., Fairhurst, J., Jones, T. R., Vernon, S. K., Morin, J., LaRocque, J., Feld, B., O'Hara, B., Bloom, J. D. y Johann, S. V. (2000). Novel class of thiourea compounds that inhibit herpes simplex virus type 1 DNA cleavage and encapsidation: resistance maps to the UL6 gene. *J Virol* 74, 9054-61.
- Vassileva, P.I. y Hergeldzhieva, TG. (2009) Avastin use in high risk corneal transplantation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 247, 1701-6.
- Vermani, K. y Garg S. J (2002) Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. *Ethnopharmacol.* 80, 49-66.
- Villamil, S.M., Alché, L.E. y Coto, C.E. (1995). Inhibition of herpes simplex virus type-1 multiplication by meliacine, a peptide of plant origin. *Antiviral Chem Chemother* 6, 239-44.
- Villarreal, E.C., (2001). Current and potential therapies for the treatment of herpesvirus infections. *Prog Drug Res*, 56,77-120.
- Wagner, E.K. y Bloom, D.C. (1997). Experimental investigation of herpes simplex virus latency. *Clin Microbiol Rev* 10, 419-43.

- Wachsman, M.B., Martino, V., Gutkind, G.O., Coussio, J.D., Coto, C.E. y Torres, R.A. (1982). Antiviral activity of a *Melia Azedarach* L. plant extract. *Fitoterapia* 53:167-170.
- Wachsman, M.B., Andrei, G.M., Daelli, M.G., Coto, C.E. y Torres, R.A. (1984) Actividad antiviral asociada a una fracción polipeptídica obtenida de extractos de *Melia Azedarach* L. *Acta Farm, Bonaerense* 3, 27-31.
- Wachsman, M.B., Damonte, E.B., Coto, C.E. y Torres, R.A. (1987) Antiviral effect of *Melia Azedarach* L. leaves extracts on Sindbis virus-infected cells. *Antiviral Res* 8:1-12.
- Wachsman, M.B., Castilla, V. y Coto, C.E. (1998) Inhibition of foot and mouth disease virus (FMDV) uncoupling by a plant-derived peptide isolated from *Melia Azedarach* L. leaves. *Arch Virol* 143, 581-590.
- Wandscheer, C.B., Duque, J.E., da Silva, M.A., Fukuyama, Y., Wohlke, J.L., Adelman, J. y Fontana, J.D. (2004) Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon*. 44, 829-35.
- Weber, S.M. y Levitz, S.M. (2000) Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomal mechanism. *J Immunol* 165, 1534-40.
- Webster, D., Taschereau, P., Lee, T.D. y Jurgens, T. (2006) Immunostimulant properties of *Heracleum maximum* Bartr. *J Ethnopharmacol*. 106, 360-3.
- Wickham, S. y Carr, D. J. (2004). Molecular mimicry versus bystander activation: herpetic stromal keratitis. *Autoimmunity* 37, 393-7.
- Wilgus, T.A., Ross, M.S., Parrett, M.L. y Oberyszyn, T.M. (2000) Topical application of a selective cyclooxygenase inhibitor suppresses UVB mediated cutaneous inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 62(4):367-84.
- Wilson, S.S., Fakioglu, E. y Herold, B.C. (2009). Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 7, 559-68.
- Wolf, M.C., Freiberg, A.N., Zhang, T., Akyol-Ataman, Z., Grock, A., Hong, P.W., Li, J., Watson, N.F., Fang, A.Q., Aguila, H.C., Porotto, M., Honko, A.N., Damoiseaux, R., Miller, J.P., Woodson, S.E., Chantasirivisal, S.,

- Fontanes, V., Negrete, O.A., Krogstad, P., Dasgupta, A., Moscona, A., Hensley, L.E., Whelan, S.P., Faull, K.F., Holbrook, M.R., Jung, M.E., Lee, B. (2010) A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 3157-62.
- Wooley, P.H. y Whalen, J.D. (1992) The influence of superoxide scavenging compound CTC 23 on type II collagen-induced arthritis in mice. *Agents Actions* 35, 273-9.
- Wu, S.B., Ji, Y.P., Zhu, J.J., Zhao, Y., Xia, G., Hu, Y.H. y Hu, J.F. (2009) Steroids from the leaves of Chinese *Melia azedarach* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines. *Steroids* 74, 761-765.
- Wuest, T.R. y Carr, D.J. (2008). The role of chemokines during herpes simplex virus-1 infection. *Front Biosci* 13, 4862-72.
- Yamamoto, Y., Gaynor, R.B. (2004). I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochem* 29, 72-9.
- Yan, X. T., Tumpey, T. M., Kunkel, S. L., Oakes, J. E. y Lausch, R.N. (1998). Role of MIP-2 in neutrophil migration and tissue injury in the herpes Simplex virus-1-infected cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 1854-62.
- Yanes, A., Finol, H.J. y Hasegawa, M. (2004) Effects of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts from leaves on *Trypanosoma cruzi* growth and ultrastructure. *J Submicrosc Cytol Pathol* 36, 149-54
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J. S., Wiegand, S.J. y Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407, 242-8.
- Yi, T., Yi, Z., Cho, S.G., Luo, J., Pandey, M.K., Aggarwal, B.B. y Liu, M. (2008) Gambogic acid inhibits angiogenesis and prostate tumor growth by suppressing vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling. *Cancer Res* 68, 1843-50.
- Yin, J., Huang, Z., Xia, Y., Ma, F., Zhang, L.J., Ma, H.H. y Wang, L.L. (2009) Lornoxicam suppresses recurrent herpetic stromal keratitis through down-regulation of nuclear factor- κ B: an experimental study in mice *Molecular Vision* 15, 1252-1259.
- Yoshimoto, Y., Jyojima, T., Arita, T., Ueda, M., Imoto, M., Matsumura, S. y Toshima, K. (2002). Vacuolar-type H(+)-ATPase inhibitory activity of

- synthetic analogues of the concanamycins: is the hydrogen bond network involving the lactone carbonyl, the hemiacetal hydroxy group, and the C-19 hydroxy group essential for the biological activity of the concanamycins? *Bioorg Med Chem Lett*, 16, 3525-8.
- Young, R.C., Hodge, D.O., Liesegang, T.J. y Baratz, K.H, (2010). Incidence, recurrence, and outcomes of herpes simplex virus eye disease in Olmsted County, Minnesota, 1976-2007: the effect of oral antiviral prophylaxis. *Arch Ophthalmol*, 128,178-83.
- Zachos, G., Clements, B., Conner, J., (1999). Herpes simplex virus type 1 infection stimulates p38/c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinase pathways and activates transcription factor AP-1. *J. Biol. Chem.* 274, 5097–5103.
- Zagon, I.S., Donahue, R.N., Rogosnitzky, M., McLaughlin, P.J., (2008). Imiquimod upregulates the opioid growth factor receptor to inhibit cell proliferation independent of immune function. *Exp Biol Med*, 233, 968-79.
- Zhang, G. y Ghosh, S. (2001). Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 107, 13-9.
- Zhang, B., Wang, Z.F., Tang, M.Z. y Shi, Y.L. (2005) Growth inhibition and apoptosis-induced effect on human cancer cells of toosendanin, a triterpenoid derivative from Chinese traditional medicine. *Invest. New Drugs* 23, 547-553.
- Zhao, Z.S., Granucci, F., Yeh, L., Schaffer, P.A. y Cantor, H. (1998). Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* 279, 1344-7.
- Zheng, M., Klinman, D. M., Gierynska, M. y Rouse, B. T. (2002). DNA containing CpG motifs induces angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8944-9.
- Zheng, M., Deshpande, S., Lee, S., Ferrara, N. y Rouse, B. T. (2001a). Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *J Virol* 75, 9828-35.
- Zheng, M., Schwarz, M. A., Lee, S., Kumaraguru, U. y Rouse, B. T. (2001b).

Control of stromal keratitis by inhibition of neovascularization. *Am J Pathol* 159, 1021-9.

Ziyaeyan, M., Alborzi, A., Japoni, A., Kadivar, M., Davarpanah, M.A., Pourabbas, B., Abassian, A. (2007) Frequency of acyclovir-resistant herpes simplex viruses isolated from the general immunocompetent population and patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Int J Dermatol.* 46, 1263-6.

.

Citas electrónicas

Redox Pharmaceutical Corporation (en línea)
<http://www.redoxpharm.com/ourcompany.asp>