

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO E INVESTIGACIÓN EN SALUD



**Caracterización de la actividad biológica de *Opuntia soehrensii* empleando
como modelo la infección *in vitro* del virus Herpes simplex**

Tesis para optar al grado de Magíster Scientiarum
Mención: Virología

POSTULANTE: Lic. Silvia Tatiana Zambrana Santander

TUTORES: Katty Terrazas Aranda, M.Sc.
Roger Carvajal Saravia, Ph.D.

La Paz – Bolivia

2007

ÍNDICE

	Página
	RESUMEN..... 1
	ABSTRACT..... 2
1.	INTRODUCCIÓN..... 3
2.	OBJETIVOS..... 6
2.1.	Objetivo General..... 6
2.2.	Objetivos Específicos..... 6
3.	MARCO TEORICO..... 7
3.1.	Virus Herpes simplex..... 7
3.1.1.	Generalidades..... 7
3.1.2.	Estructura..... 7
3.1.2.1.	El core..... 8
3.1.2.2.	Cápside..... 8
3.1.2.3.	Tegumento..... 8
3.1.2.4.	Envoltura..... 8
3.1.2.5.	Polipéptidos..... 9
3.1.2.6.	Genoma..... 9
3.1.3.	Ciclo replicativo..... 11
3.1.3.1.	Adsorción y Penetración..... 12
3.1.3.2.	Transporte al núcleo celular..... 12
3.1.3.3.	Replicación del ADN..... 13
3.1.3.4.	Ensamblaje de la cápside viral..... 14
3.1.3.5.	Empaquetamiento del genoma..... 14
3.1.3.6.	Brote..... 15
3.1.4.	Latencia..... 15
3.1.5.	Reactivación del estado de latencia..... 16
3.1.6.	Patología..... 17
3.1.7.	Patogénesis de Infección Humana..... 17
3.1.8.	Respuesta Inmune..... 19
3.1.9.	Evasión de la Respuesta Inmune..... 20
3.1.10	Epidemiología y Transmisión..... 21
3.1.11	Tratamiento y Prevención..... 23
3.1.11.1	Fármacos anti-VHS..... 23
3.1.11.2	Microbicidas anti-VHS-2..... 24
3.1.11.3	Productos Naturales anti-VHS..... 24
3.2.	<i>Opuntia soehrensii</i> 30
3.3.	Métodos usados para el estudio de agentes antivirales.... 31
4.	MATERIALES Y MÉTODOS..... 34
4.1.	Material vegetal..... 34
4.2	Extracto vegetal..... 34
4.3	Células..... 34
4.3.1.	Cultivo de células BHK-21..... 35
4.3.2.	Cultivo de linfocitos humanos..... 35
4.4.	Virus..... 35
4.4.1.	Titulación viral..... 35
4.5.	Evaluación del efecto biológico de <i>O. soehrensii</i> sobre cultivos celulares..... 37
4.5.1	Efecto citotóxico..... 37
4.6.	Evaluación de la actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> 37

4.6.1.	Evaluación de la actividad de <i>O. soehrensii</i> <u>durante</u> el proceso de infección activa.....	38
4.6.1.1.	Evaluación de la actividad de <i>O. soehrensii</i> sobre las etapas iniciales de la cinética de infección viral.....	38
4.6.1.2.	Evaluación de la actividad de <i>O. soehrensii</i> sobre el proceso de adsorción viral.....	38
4.6.1.3.	Evaluación de la actividad de <i>O. soehrensii</i> sobre el proceso de penetración viral.....	39
4.6.1.4.	Evaluación de la actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> <u>después</u> de la infección viral.....	39
4.6.2.	Evaluación de la actividad protectora antiviral de <i>O. soehrensii</i> de las células en cultivo.....	39
4.6.2.1.	Evaluación de la infección viral en células pretratadas con <i>O. soehrensii</i>	39
4.6.2.2.	Evaluación del mecanismo de protección antiviral.....	40
4.6.3.	Monitores para la evaluación de la inhibición de la infección viral mediada por <i>O. soehrensii</i>	40
4.7.	Análisis Estadístico	41
5.	RESULTADOS.....	42
5.1.	Caracterización de la cepa viral.....	42
5.1.1.	Identificación del virus	42
5.1.2.	Titulación viral.....	43
5.2.	Efecto biológico de <i>O. soehrensii</i> sobre sistemas de cultivo celular.....	45
5.2.1.	Efecto de <i>O. soehrensii</i> sobre la viabilidad de células BHK-21.....	45
5.3.	Actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> <u>durante</u> el proceso de infección activa de VHS-2.....	51
5.3.1.	Inhibición de las etapas tempranas de la infección viral de VHS-2 por <i>O. soehrensii</i>	51
5.3.2.	Actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> <u>después</u> de la infección de VHS-2.....	54
5.4.	Actividad preventiva-protectora de <i>O. soehrensii</i> contra la infección de VHS-2	55
5.4.1.	Condiciones del pretratamiento de células huésped con <i>O. soehrensii</i> para una efectiva protección antiviral.....	57
5.4.2.	Inducción de componentes antivirales por <i>O. soehrensii</i> , como factores de protección	58
6.	DISCUSION.....	62
6.1	Efecto biológico sobre sistemas de cultivo celular.....	63
6.2	Actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> <u>durante</u> la infección activa <i>in vitro</i> de VHS-2	65
6.3	Actividad preventiva-protectora de <i>O. soehrensii</i> sobre la célula huésped contra la infección por VHS-2.....	68
6.4	<i>O. soehrensii</i> efectivo producto natural anti-VHS-2.....	71
7.	CONCLUSIONES.....	74
	CONCLUSIÓN GENERAL.....	74
	CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.....	74
8.	RECOMENDACIONES	75
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
	ANEXOS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de los virus Herpes simplex.....	7
Figura 2. Estructura del genoma de VHS-1.....	9
Figura 3. Esquema del ciclo replicativo de los VHS.....	11
Figura 4. Manifestaciones clínicas de las infecciones causadas por los VHS.....	18
Figura 5. Prevalencia de VHS-2 en mujeres en edad fértil.....	22
Figura 6. <i>Opuntia soehrensii</i> Britt & Rose.....	31
Figura 7. Identificación y Tipificación por Inmunofluorescencia directa de la cepa de laboratorio VHS-LV11.....	42
Figura 8. Efecto citopático producto de la infección por VHS-2.....	43
Figura 9. Sobrevivencia celular luego de la infección por VHS-2.....	44
Figura 10. Efecto de <i>O. soehrensii</i> sobre la viabilidad de células BHK-21.....	46
Figura 11. Visualización microscópica del efecto biológico de <i>O. soehrensii</i> sobre cultivo de células BHK-21.....	47
Figura 12. Determinación de la concentración citotóxica al 50% de <i>O. soehrensii</i> sobre cultivo de células BHK-21.....	48
Figura 13. Efecto citotóxico de <i>O. soehrensii</i> sobre células BHK-21 evaluado por ensayo de reducción del MTT.....	50
Figura 14. Efecto citotóxico de <i>O. soehrensii</i> sobre cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica.....	51
Figura 15. Cinética de infección de VHS-2 en presencia de <i>O. soehrensii</i>	52
Figura 16. Efecto de <i>O. soehrensii</i> sobre la adsorción y penetración de VHS-2.....	53
Figura 17. Actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> <u>después</u> de la infección de VHS-2.....	54
Figura 18. Actividad preventiva-protectora antiviral de <i>O. soehrensii</i> sobre células BHK-21.....	56
Figura 19. Cinética de pretratamiento con <i>O. soehrensii</i>	58
Figura 20. Protección antiviral de componentes antivirales inducidos por efecto del tratamiento con <i>O. soehrensii</i>	59
Figura 21. Relación concentración-respuesta de la actividad del lisado de células pretratadas con <i>O. soehrensii</i>	60

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Relación de los modelos más utilizados para la evaluación de actividad <i>in vitro</i> de plantas anti-VHS.....	26
Tabla 2. Resumen de los mecanismos de actividad antiviral de compuestos provenientes de plantas medicinales.....	28
Tabla 3. Evaluación de extractos vegetales contra infecciones herpéticas en modelos animales	29
Tabla 4. Cuantificación de efecto citopático en función a las alteraciones morfológicas celulares.....	36
Tabla 5. Concentración citotóxica media <i>O. soehrensii</i> en cultivo de células BHK-21.....	49
Tabla 6. Actividad Antiviral media (CE ₅₀) de <i>O. soehrensii</i> <u>después</u> de la infección de VHS-2 en cultivo de células BHK-21.....	55
Tabla 7. Actividad protectora media (CE ₅₀) de <i>O. soehrensii</i> sobre el huésped celular contra la infección por VHS-2 en cultivo de células BHK-21.....	57

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Evaluación de la significancia estadística de la actividad de <i>O. soehrensii</i> en las etapas iniciales de la infección viral.....	88
Anexo 2. Evaluación de la significancia estadística de la actividad de <i>O. soehrensii</i> sobre el proceso de adsorción viral.....	90
Anexo 3. Evaluación de la significancia estadística de la actividad de <i>O. soehrensii</i> sobre el proceso de penetración viral.....	91
Anexo 4. Evaluación de la significancia estadística de la actividad antiviral de <i>O. soehrensii</i> <u>después</u> de la infección viral.....	92
Anexo 5. Evaluación de la significancia estadística de la actividad preventiva-protectora de <i>O. soehrensii</i>	94
Anexo 6. Evaluación de la significancia estadística de la actividad preventiva-protectora de <i>O. soehrensii</i> a tiempos cortos de exposición.....	96
Anexo 7. Evaluación de la significancia estadística de los ensayos de exploración del mecanismo de protección antiviral.....	98
Anexo 8. Diluciones del extracto acuoso de <i>O. soehrensii</i> empleadas en los ensayos de citotoxicidad.....	102
Anexo 9. Ensayo de RIV-MTT de células BHK-21 tratadas con <i>O. soehrensii</i> previo a la infección de VHS-2.....	103
Anexo 10. Visualización microscópica de las Placas virales producto de la infección de VHS-2.....	104

TRIBUNAL EXTERNO

Gabino Garrido Garrido, Ph.D. Jefe de Proyectos (CITMA y QUIMEFA). Laboratorio de Farmacología, Departamento de Investigaciones Biomédicas, Centro de Química Farmacéutica. La Habana- Cuba

Eva Nara, Ph.D. Docente Investigador. Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. Asunción-Paraguay.

Dr. Luis Miguel Romero Fernández. Rector Canciller, Universidad Técnica Particular de Loja. Loja-Ecuador.

TRIBUNAL LOCAL

Aleida Nina, M.Sc. Responsable de Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA).

Eduardo Gonzáles, Ph.D. Director, Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

Volga Iñiguez, Ph.D. Directora, Instituto de Biología Molecular y Biotecnología. Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Carrera de Biología.

DEDICATORIA

*A Dios, mi eterna luz guía, a la memoria de mi
siempre recordada abuelita Maruja y al
constante sacrificio, dedicación y amor de
mamita Lucy*

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

Docentes, administrativos, residentes e internos del instituto SELADIS, por la colaboración brindada durante la realización de este trabajo.

Institut de Recherche pour le Développement (IRD), por el financiamiento de la beca de estudios en el Programa de Maestría.

Mis asesores, Roger Carvajal por la enseñanza y confianza puesta en mi persona y Katty Terrazas por la paciencia, dedicación, enseñanza y consejos y principalmente por su amistad.

Tribunal revisor del manuscrito, Gabino Garrido, Eva Nara y Luis Miguel Romero, por sus valiosas sugerencias, opiniones y contribución a este trabajo.

El equipo de Virología del Instituto SELADIS (piso 7), Patricia, Gabriela C., Deyni, Victor, Gaby M., Nelly, Silvia M., Bladimir, Hilda y Marina, más que compañeros de trabajo, amigos con los que día a día hicimos agradable nuestro ambiente de trabajo.

Jacques Gardón y Eric Benefice, por el apoyo y colaboración desinteresada que fue muy importante para la culminación de este trabajo.

Mis apreciados amigos Sonia, Gabriela C., Jhonny, Oscar G., Diego, Catherine, Miguel y Selma, por las voces de aliento y su constante presencia en momentos de alegría y tristeza.

RESUMEN

Opuntia soehrensii (*O. soehrensii*) planta empleada por la medicina tradicional andina en el tratamiento de procesos febriles-eruptivos, en estudios previos, mostró actividad contra la infección *in vitro* del virus Herpes simplex (VHS). El presente trabajo, caracterizó la actividad biológica, anti-virus Herpes simplex tipo 2 (VHS-2), del extracto acuoso de *O. soehrensii* durante el proceso de infección viral activa y en la célula huésped previo a la infección. La concentración efectiva media (CE₅₀) y el índice selectivo (IS) fueron determinados por ensayo de Reducción de la Infectividad Viral (RIV-MTT), ensayo de Reducción del Efecto Citopático (RECP) y ensayo de Reducción de Placas de Lisis (PRA), empleando cultivos de células BHK-21. El efecto citotóxico fue determinado en cultivos de células BHK-21 y linfocitos humanos. Los experimentos de evaluación de actividad durante el proceso infeccioso mostraron que *O. soehrensii* inhibe la penetración viral en un 80 % a una concentración de 21 mg/ml, medida por RIV-MTT; adicionalmente, ejerce un efecto inhibitorio de los procesos de replicación viral en células infectadas, con valores de CE₅₀ e IS a 48 horas de tratamiento de $6,7 \pm 0,56$ mg/ml (IS = 4,7) medido por RIV-MTT, $3,8 \pm 0,07$ mg/ml (IS = 8,3) medido por RECP y $12 \pm 0,80$ mg/ml (IS = 2,6) medido por PRA. Por otro lado, *O. soehrensii* presenta actividad preventiva de la infección por VHS-2 a en células BHK-21 pretratadas con el producto por 48 horas; los valores de CE₅₀ e IS según ensayo fueron $0,012 \pm 0,02$ mg/ml (IS > 2000) medido por RIV-MTT, $0,029 \pm 0,71$ mg/ml (IS > 1000) medido por RECP y $0,95 \pm 0,11$ mg/ml (IS = 33) medido por PRA. El mecanismo de protección es compatible con la existencia de mediadores celulares no secretables inducidos por el producto vegetal. No se observaron efectos tóxicos a las concentraciones evaluadas. Estos hallazgos muestran que *O. soehrensii* es un potencial candidato, no tóxico, para el desarrollo de un agente terapéutico y preventivo de una de las infecciones de transmisión sexual más importantes a nivel mundial, el herpes genital.

PALABRAS CLAVE

Opuntia soehrensii, Antiviral, Virus Herpes simplex tipo 2, Herpes genital, Planta medicinal.

ABSTRACT

Opuntia soehrensii (*O. soehrensii*) a native medicinal plant from Los Andes has long been used to treat eruptive and febrile process, in early studies, showed an *in vitro* anti-Herpes simplex virus activity. The present study describes the biological activity, anti-Herpes simplex virus type 2 (VHS-2), of the aqueous extract from *O. soehrensii* during the active infectious process and on the host cells before infection. The 50% effective concentration (EC₅₀) and the selective index (SI) were determined by Viral Infectivity Reduction assay (VIR-MTT), Reduction of Cytophatic Effects (RCPE) and Plaque Reduction Assay (PRA), using BHK-21 cell line. The cytotoxic effect was also determined on BHK-21 cells and human lymphocytes cultures. The experiments performed to evaluate the antiviral activity during the infectious process showed that *O. soehrensii* inhibits 80 % of the viral penetration, at 21 mg/ml by VIR-MTT; additionally, inhibits viral replication process on already infected cells with EC₅₀ and SI values at 48 hours of treatment of $6,7 \pm 0,56$ mg/ml (SI = 4,7) by VIR-MTT, $3,8 \pm 0,07$ mg/ml (SI = 8,3) by RCPE and $12 \pm 0,80$ mg/ml (SI = 2,6) by PRA. Furthermore, preventive antiviral activity was found when host cells were incubated 48 h before infection with mean EC₅₀ and SI values of $0,012 \pm 0,02$ mg/ml (SI > 2000) by VIR-MTT, $0,029 \pm 0,71$ mg/ml (SI > 1000) by RCPE y $0,95 \pm 0,11$ mg/ml (SI = 33) by PRA. The protective mechanism is consistent with the induction of soluble mediator by the natural product. No cytotoxic effect was observed at tested concentrations. Our findings demonstrate that *O. soehrensii* is a potential non-toxic candidate for development of a preventive and therapeutic agent for one of the most important transmission infectious diseases, the genital herpes.

KEYWORDS

Opuntia soehrensii., Antiviral, Herpes simplex virus type 2, Genital herpes, Medicinal Plant.

1. INTRODUCCIÓN.

El uso de plantas con fines terapéuticos por las comunidades originarias a nivel mundial, se remonta a épocas en que eran la única medicina conocida y se ha mantenido hasta nuestros días por preservación de las costumbres y la transmisión oral del saber originario de generación en generación (Anderson et al., 2000; PAHO, 1998; Domingo & López-Brea, 2003; Vidaurre de la Riva, 2006). Este conocimiento ancestral ha permitido contar en la actualidad con agentes terapéuticos para el tratamiento de diversas patologías; el 40% de los medicamentos utilizados en la medicina actual proviene de plantas utilizadas inicialmente de modo tradicional (Anderson et al., 2000; Jassim & Naji, 2003).

Al margen de la gran aceptación del uso de plantas medicinales por la población mundial, debido a sus efectos beneficiosos, pocos o ningún tipo de efectos adversos y costo accesible (Domingo & López-Brea, 2003; Jassim & Naji, 2003), el interés de la comunidad científica de trabajar con productos de origen natural se ha incrementado debido a la amplia evidencia científica de las virtudes de estos productos y al avance tecnológico que hace más accesible encarar este tipo de investigaciones (Anderson et al., 2000; Vlieyincx & Vanden Berghe, 1991).

Así, en el contexto internacional, se han estudiado varias especies vegetales con diferentes principios activos responsables de su actividad terapéutica. En cuanto a agentes antivirales provenientes de plantas, se han documentado productos con actividad biológica para el tratamiento de infecciones causadas por virus respiratorios, retrovirus, virus herpes, virus hepáticos, etc., (Vlieyincx & Vanden Berghe, 1991; Beuscher, 1994; McCutcheon, 1995; Kott et al. 1999; Kudi & Myint, 1999; López et al., 2001; Cos et al., 2002; Vermani & Garg, 2002; Domingo & López-Brea, 2003; Jassim & Naji, 2003; Lipipun et al., 2003).

Bolivia, debido a su ubicación geográfica y diversidad biológica y climática, cuenta con una de las más ricas y variadas floras medicinales del mundo (Calvo, 2003; Carvajal, 2003; Gimenez & Ibisch, 2003; Vidaurre de la Riva, 2006). Se han reportado especies vegetales con actividad analgésica, antiinflamatoria, antioxidante, antiparasitaria, antibacteriana y antiviral, entre otros (Andel-Malek et al., 1996; Arrázola, 1999; Girault, 1999; De Lucca, 2004; Aguirre, 2006). Si bien existe amplia información acerca del uso tradicional de diferentes plantas, la gran mayoría carece de evidencia científica que soporte su empleo terapéutico (PAHO, 1998; Vandebroek, 2003; Hassan Khana et al.,

2005; Macía et al., 2005). En este sentido, el presente trabajo se enmarca en el propósito general de proporcionar soporte científico al uso tradicional de una planta de la herbolaria medicamentosa andina, contra procesos infecciosos causados por el virus Herpes simplex.

Los virus Herpes simplex tipo 1 y 2 (VHS-1 y 2) son patógenos que afectan a gran parte de la población mundial producen infecciones orales y ano-genitales (Wald, 2006). Estos virus, luego de establecer una infección inicial a nivel de las mucosas, son capaces de establecer una infección latente en los ganglios nerviosos que afecta al individuo de por vida (Whitley & Roizman, 2001). Frecuentemente, debido a factores externos (temperatura, radiación solar, estrés) o depresión inmunológica, se presentan reactivaciones que pueden ser sintomáticas, con manifestaciones clínicas similares a las observadas en una primoinfección, o asintomáticas con liberación del virus en ausencia de las manifestaciones clínicas clásicas; la reactivación asintomática es la causa más común de la transmisión de estos virus (Wald et al., 2000; Whitley & Roizman, 2001; Cunningham & Mikloska, 2001).

Se estima que entre el 60 y 95% de la población mundial esta infectada por VHS-1, de los cuales un 30% presentan infecciones recurrentes. La seroprevalencia de VHS-2 varía según la población estudiada pero, en general, se estima que existe una mayor prevalencia (60-80%) en países en desarrollo (Stanberry et al., 1999; OMS, 2001; Gatcheva et al., 2004; Corey, 2007a).

En los últimos años, las infecciones causadas por VHS han cobrado gran importancia. Estudios clínicos han demostrado que la infección por VHS-2 se constituye en un factor de riesgo para la adquisición y transmisión sexual del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Severson & Tyring, 1999; Moriuchi et al., 2000; McClelland et al., 2002; Corey, 2007b). Esta evidencia sugiere que el control de las infecciones causadas por VHS-2 representa una medida de prevención de la transmisión sexual del VIH (Scordi-Bello et al., 2002; Herold et al., 2002; Nagot et al., 2007).

Aciclovir y sus derivados son los fármacos de elección para el tratamiento de infecciones herpéticas. Para el tratamiento de infecciones causadas por cepas resistentes, se han desarrollado compuestos como foscarnet y cidofovir, capaces de controlar estas infecciones pero que presentan cierto grado de nefro y hepatotoxicidad (Balfour, 1999; Snoeck, 2000; Field, 2001; Snoeck & de Clercq, 2002; de Clercq, 2004).

Ante la necesidad de contar con nuevas estrategias de tratamiento o control de las infecciones causadas por VHS, en este trabajo se exploró la actividad antiviral de *Opuntia soehrensii* (*O. soehrensii*), planta utilizada en la medicina tradicional para el alivio de procesos febriles y ulcero-respiratorios (Camaqui, 2007; de Lucca, 1992; Girault, 1999). Estudios previos, realizados en nuestro laboratorio, evidenciaron que *O. soehrensii* presenta actividad *in vitro* anti-virus Herpes simplex (Mamani et al., 2004). Con base en esta evidencia, este trabajo caracterizó la actividad biológica del extracto acuoso de *O. soehrensii* en cultivos *in vitro* del virus Herpes simplex, con el objetivo de definir las condiciones que permiten evidenciar dicha actividad y proponer el posible mecanismo de acción.

2. OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar la actividad biológica del extracto acuoso de *Opuntia soehrensii* empleando como modelo sistemas de cultivo celular y de cultivo *in vitro* del virus Herpes simplex tipo-2.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Evaluar el efecto biológico de *Opuntia soehrensii* sobre sistemas de cultivo celular, cultivos primarios y de líneas celulares establecidas.
- Establecer los criterios de toxicidad *in vitro*, concentración citotóxica y tiempo de exposición media de *Opuntia soehrensii* en sistemas celulares.
- Evaluar la actividad biológica antiviral de *Opuntia soehrensii* en el proceso activo de replicación viral *in vitro* del virus Herpes simplex.
- Evaluar la actividad preventiva-protectora antiviral de *Opuntia soehrensii* sobre células blanco de infección.
- Determinar los parámetros de actividad media e índice selectivo anti-virus Herpes simplex de *Opuntia soehrensii*

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. VIRUS HERPES SIMPLEX.

3.1.1. Generalidades.

Los virus Herpes simplex son miembros de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesviridae*, que alberga, entre otros, al virus Herpes simplex tipo 1 y tipo 2 y el virus Varicela-Zoster. Se caracterizan por tener un ciclo reproductivo corto, propagación rápida en cultivo, eficiente destrucción de las células infectadas y capacidad de establecer infecciones latentes (Whitley & Roizman, 2001; Fields et al., 2004). Los VHS-1 y 2 se distinguen entre sí por el comportamiento clínico y epidemiológico, pero comparten un 40% de homología genética por lo que presentan características antigénicas comunes y muchas similitudes biológicas (Fields et al., 2004).

3.1.2. Estructura.

Los viriones de VHS miden entre 200 – 300 nm, presentan envoltura y tienen genoma ADN; la figura 1 muestra los principales componentes estructurales de los VHS.

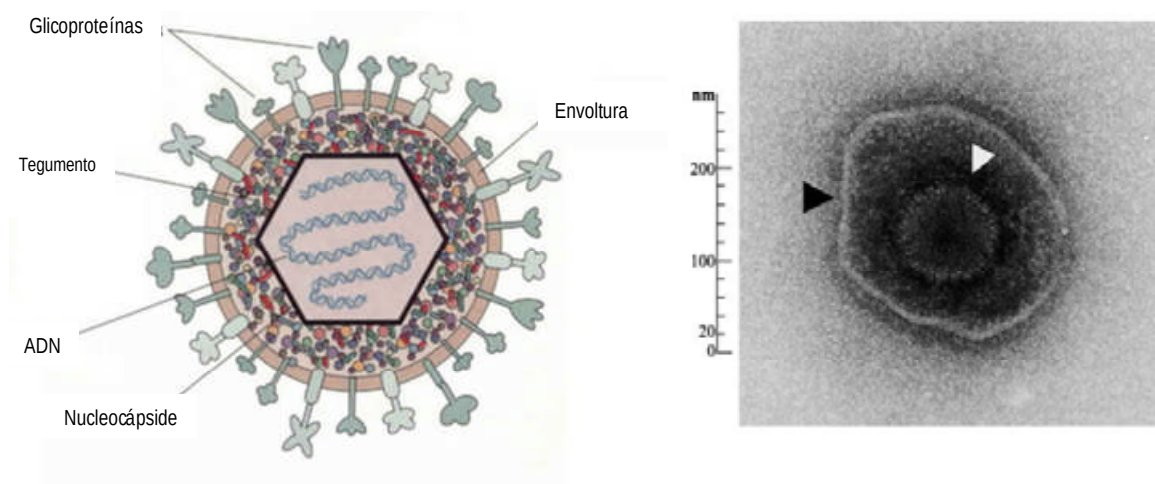


Figura 1. Estructura de los virus Herpes simplex. (A) Componentes estructurales de los VHS: core que rodea al ADN, cápside icosaédrica, tegumento amorfo, envoltura viral y glicoproteínas virales (Todar, 2006). (B) Fotografía por microscopía electrónica del virión del VHS-1; la envoltura (▲) y la cápside (△) están claramente delimitadas (Jacobs & Fraefel, 1999).

3.1.2.1. El core.

El core de un virión maduro contiene el ADN viral rodeado de una proteína toroidal. El toroide se encuentra suspendido por un huso proteico de fibrillas embebidas en la cara interna de la cápside que atraviesa el toroide entero; la estructura precisa del ADN en el toroide es aún desconocida (Fields et al., 2004).

3.1.2.2. Cápside.

La cápside mide aproximadamente 100 nm de diámetro y está constituida por aproximadamente 162 subunidades denominadas capsómeros. Los capsómeros pentaméricos situados en los vértices no están bien caracterizados, los capsómeros hexaméricos miden 9,5 x 12,5 nm en sección longitudinal; de la superficie y a lo largo del axis se extiende un canal de 4 nm de diámetro (Fields et al., 2004).

3.1.2.3. Tegumento.

Término introducido para describir las estructuras existentes entre la cápside y la envoltura; la polaridad de la estructura se determinó por microscopia electrónica. El tegumento puede estar distribuido asimétricamente y su densidad depende de la localización del virión dentro la célula infectada; mayor densidad se observa en viriones acumulados en vacuolas citoplasmáticas que en los acumulados en el espacio perinuclear (Fields et al., 2004).

3.1.2.4. Envoltura.

La envoltura viral tiene una apariencia trilaminar, puede decirse que son segmentos provenientes de la membrana celular. La presencia de lípidos fue demostrada por la sensibilidad a detergentes y solventes orgánicos. Contiene numerosas glicoproteínas que son más cortas que las de otros virus con envoltura. Los VHS contienen al menos 11 glicoproteínas y el número de copias de estos puede exceder de 1,000 unidades por virión (Fields et al., 2004).

3.1.2.5. Polipéptidos.

Se estima que el virión contiene 30 polipéptidos denominados VP con un número de serie de 1 a 30, que son sintetizados después de la infección. De entre estos polipéptidos, al menos un tercio están en la superficie del virión y son accesibles a anticuerpos, por lo menos 10 están glicosilados [gB (VP7 y VP8.5), gC (VP8), gD (VP17 y VP18), gE (VP12.3 y VP12.6), gG, gH, gI, gK, gL y gM] y existe un buen número de polipéptidos de membrana no glicosilados (U_L24, 20 y 34) (Fields et al, 2004).

3.1.2.6. Genoma.

El genoma de los VHS es ADN lineal doble hebra de longitud entre 120 a 250 kpb, codifica más de 80 genes (Figura 2). La composición de bases del genoma varía de 31% a 75% de pares G-C (Fields et al, 2004).

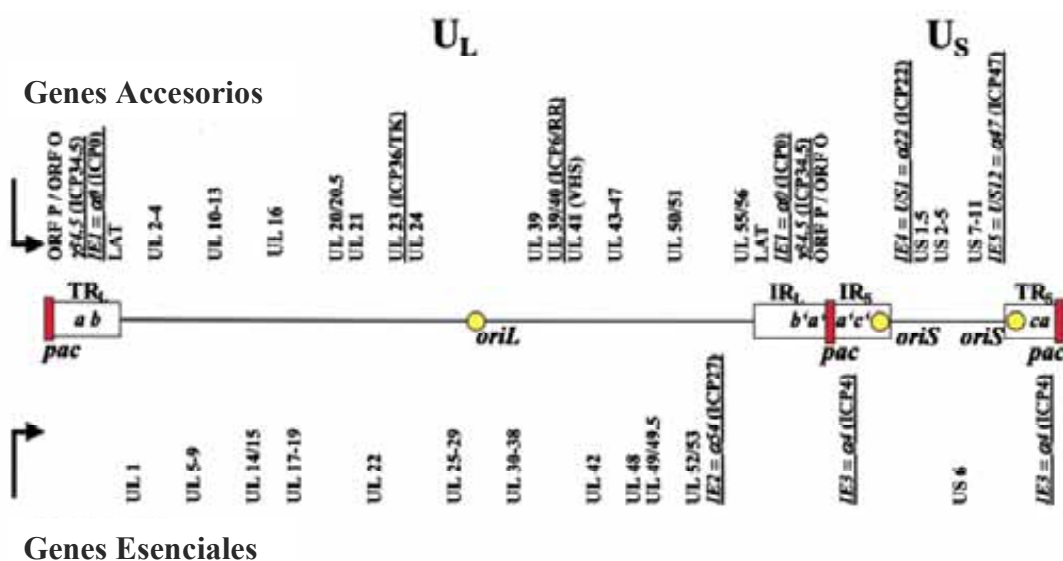


Figura 2. Estructura del genoma de VHS-1. El genoma está organizado en dos segmentos, uno largo (UL) y otro corto (US). Cada segmento contiene una única región U flanqueada por regiones repetidas inversas (R), internas (IR) y terminales (TR). El genoma contiene un origen de replicación del segmento largo (*oriL*) y dos en el segmento corto (*oriS*) (Jacobs & Fraefel, 1999).

En su mayoría los genes contienen una secuencia promotora reguladora de 50 a 20 pb por delante la caja TATA, un sitio de iniciación de la transcripción de 20 a 25 pb después de la caja TATA, una secuencia líder 5' no codificante de 30 a 300 pb, un único marco de lectura abierto (ORF), un codón de inicio de traducción, una secuencia 3' no codificante de 10 a 30 pb y una señal de poliadenilización (Flemington, 2001; Fields et al, 2004).

Los genes se clasifican en grupos cuya síntesis es regulada de modo coordinado. Los genes de un determinado grupo se activan o desactivan por las mismas señales y se expresan en forma de cascada; en el inicio se expresan los genes inmediato tempranos, siguen los genes tempranos y por último los genes tardíos (Fields et al, 2004).

Los genes inmediatos-tempranos o genes alfa, se expresan en presencia de inhibidores de la síntesis proteica. El HSV-1 codifica un total de 5 genes inmediato-tempranos, designados como ICP (*Infected Cell Proteins* = proteínas de células infectadas) 0, 4, 22, 27 y 47. De éstos, solo ICP4 e ICP27 son necesarios para la replicación viral en cultivos de tejido. Estas proteínas son reguladoras de transcripción de los genes virales tempranos y tardíos, y el ICP4 también inhibe la expresión de los genes inmediato-tempranos, lo que conduce a parar la actividad de los genes inmediato-tempranos en las fases tardías de la infección viral. La expresión de los genes tempranos ocurre antes de la replicación del ADN viral, para su expresión actúan enzimas que participan en el metabolismo del ADN; como la timidin-cinasa (TK), ribonucleótido-reductasa (RR), polimerasa ADN y helicasa ADN. Finalmente, los genes tardíos se expresan después de la replicación del ADN, incluyen genes que codifican proteínas estructurales, el VP16 y el vhs, que son incorporados en el tegumento viral, además del gen tardío gamma 1-34.5, un factor de virulencia que es necesario para la replicación en líneas celulares de origen neuronal, en las que se dispara una respuesta de estrés que produce una parada total y prematura de toda la síntesis proteica (Flemington, 2001; Fields et al, 2004).

El VHS-1 codifica 75 proteínas, de las cuales solo 37 son necesarias para la replicación viral en cultivos celulares, los restantes genes virales presumiblemente tienen funciones importantes en la relación con el huésped, entre las cuales pueden incluirse una eficiente expresión viral y la evasión de la respuesta inmune frente a la infección (Flemington, 2001; Fields et al, 2004).

3.1.3. Ciclo replicativo.

Fuera de su célula huésped los virus son partículas inertes. Sin embargo, al reconocer a la célula huésped, son capaces de cumplir su ciclo biológico utilizando la maquinaria enzimática celular para sintetizar las proteínas virales y replicar su ácido nucleico (Flemington, 2001). El ciclo replicativo viral tiene diferentes etapas y para los VHS se han descrito las siguientes (Figura 3):

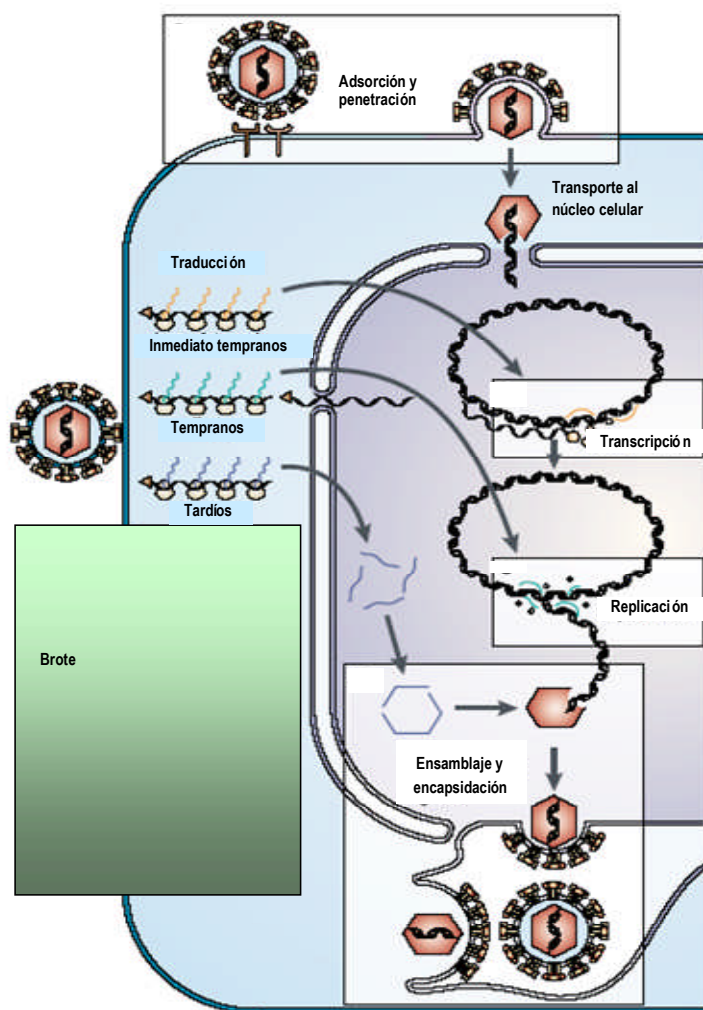


Figura 3. Esquema del ciclo replicativo de los VHS. Para los VHS se describen las siguientes etapas de ciclo replicativo: adsorción, penetración, transporte al núcleo celular, replicación del genoma, transcripción, traducción, ensamblaje, encapsidación y brote de las partículas virales (Coen & Schaffer, 2003).

3.1.3.1. Adsorción y Penetración.

La primera etapa de la infección de los VHS es la adsorción del virus a la célula huésped. Inicialmente, las glicoproteínas de la envoltura viral (gB, gC), se unen a los proteoglicanos de la membrana celular por medio de las cadenas laterales de los glicosaminoglicanos (GAGs); se ha descrito que la adhesión al heparán sulfato potencia la infección, pero no es un requerimiento absoluto para la infección (Longnecker & Spear, 2003). El segundo paso secuencial es la unión a co-receptores mediada por gD. En la célula huésped, las proteínas HveA [miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF)], HveB y HveC (miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas) participan como receptores para mediar la infección, en células linfáticas (HveA) y neuronas (HveC) (Flemington, 2001; Longnecker & Spear, 2003; Fields et al, 2004).

La última etapa en la entrada del virus a la célula, es la fusión de la envoltura viral con la membrana celular (penetración viral), que permite la liberación de la cápside al citoplasma celular. Esta etapa requiere de la participación de gD, que puede asumir más de una conformación: una en ausencia de su receptor, otra al unirse al mediador de entrada de herpesvirus (miembro de la familia del receptor de TNF), y una tercera al unirse a nectin-1, molécula de adhesión miembro de la familia de las inmunoglobulinas (Myscofski et al., 2006). Los cambios conformacionales de gD potencian la actividad fusogénica de gB, gH y gL; una evidencia de este proceso es que gI y gE pueden ser detectadas en la membrana de células infectadas inmediatamente después de la penetración del virus (Flemington, 2001; Longnecker & Spear, 2003; Fields et al, 2004).

3.1.3.2. Transporte al núcleo celular.

Luego de la fusión de la envoltura con la membrana celular, algunas proteínas del tegumento permanecen en el citoplasma (vhs, Us11) mientras que otras son transportadas al núcleo (VP16) o pueden permanecer asociadas a la cápside (VP1-2). La cápside y las proteínas del tegumento asociadas son transportadas a través de los microtúbulos hacia el poro nuclear. En el poro nuclear la nucleocápside libera el ADN al interior del núcleo, quedando la cápside vacía en el citoplasma. El mecanismo por el que el ADN ingresa al núcleo aún no está bien establecido; sin embargo, los datos disponibles sugieren que la interacción de la cápside con estructuras tegumentarias (VP1-2) asociadas con las proteínas del poro nuclear provoca un cambio estructural, que facilita la liberación del ADN. Algunas proteínas del tegumento ingresan con el ADN y juegan un rol importante en la generación de

un ambiente que permita una eficiente replicación viral. Por ejemplo, VP16 y UL41 promueven la transcripción de los genes alfa en el núcleo y detienen la síntesis de proteínas del huésped en el citoplasma, respectivamente (Flemington, 2001; Fields et al, 2004).

3.1.3.3. Replicación del ADN.

Aunque las partículas de los herpesvirus contienen ADN lineal, este se circulariza rápidamente en las células infectadas, por mecanismos aún no del todo claros. El origen de la replicación se inicia en un sitio específico de unión para una proteína esencial, codificada por el virus, proteína que abre la doble hélice del ADN y dirige la maquinaria de replicación del ADN viral (polimerasa, helicasa, timidin-cinasa, ribonucleótido reductasa y otras proteínas) (Fields et al, 2004; Strang & Stow, 2005).

La expresión genética viral ha sido bien estudiada en el caso del VHS-1, donde la transcripción viral es iniciada por una proteína trans-activadora que es parte del tegumento. Esta proteína, conocida como *alpha-TIF* o trans-activador de los genes alfa (VP16), activa la transcripción de los genes inmediato-tempranos virales, actuando conjuntamente con algunos factores de transcripción celular, como el *Oct-1* y el factor de proliferación endógena (HCF). Se cree que la presencia o ausencia de estos factores, son críticos para modular la expresión de los genes líticos del VHS-1 o por el contrario para establecer una infección latente. Otra proteína clave, en la replicación del virus, presente en el tegumento de la partícula viral de VHS-1 es el *vhs* (virion-host), que después de la infección celular, aumenta la efectividad de la producción viral por degradación no específica del ARN y detiene la síntesis de macromoléculas, esto permite controlar la maquinaria de síntesis de la célula huésped (Fields et al, 2004).

Al poco tiempo de que la replicación del ADN comienza, ocurre un cambio en el modo de replicación, probablemente producto de una recombinación homóloga, su resultado es la formación de una molécula ramificada de ADN; la repetición de este proceso genera una estructura compleja de ADN no lineal. Estas moléculas complejas, ramificadas de ADN, han sido encontradas en las células infectadas por VHS-1 y se ha demostrado que una endonucleasa codificada por el virus es necesaria para su de-ramificación y el posterior ensamblaje de las partículas virales (Fields et al, 2004).

3.1.3.4. Ensamblaje de la cápside viral.

El ensamblaje de la cápside viral ocurre en el núcleo de las células infectadas; sin embargo, el inicio de la encapsidación ocurre en el citoplasma, donde se encuentran las proteínas VP5, VP6, VP23 y VP26 proteínas que por si solas no pueden localizarse en el núcleo, pero que pueden ser transportadas al núcleo asociadas con VP19C y VP26 se localiza en núcleo solo asociada a VP5 y VP19C (Mettenleiter, 2002; Fields et al, 2004).

En primera instancia se ensamblan procápsides vacías conteniendo un armazón interno, que es eliminado luego de la inserción del ADN viral. Los capsómeros están unidos en estructuras triples compuestas de dos proteínas VP19C (U_L38) y VP23 (U_L18), cada complejo consiste de una molécula de VP19C y dos moléculas de VP23. Los complejos triples de proteínas se adicionan para formar parte de la procápside, que en principio adquiere una estructura esférica (Mettenleiter, 2002).

El ensamblaje de la cápside puede tener lugar en el interior de estructuras especializadas en el núcleo celular denominadas *ensamblones* o pueden ser ensambladas en compartimentos replicativos cercanos al sitio de la replicación del ADN viral (Fields et al, 2004).

3.1.3.5. Empaquetamiento del genoma.

El proceso de replicación produce concatámeros de ADN, segmentos cabeza-cola, que deben ser seccionados antes de ser empaquetados en la cápside. Este proceso es mediado por partición endonucleolítica específica de lugar en la unión entre los genomas individuales. Existen estructuras especializadas localizadas en la parte terminal del genoma, conocidas como “secuencias a”, secuencias de consenso *pac-1* y *pac-2*, que al unirse generan una zona sustrato para una partición endonucleolítica específica (Fields et al, 2004).

La encapsidación del ADN viral requiere la participación de varias proteínas U_L6, U_L15, U_L25, U_L28, U_L32, U_L33, U_L36 y U_L37; sin embargo, el mecanismo de este proceso aún no está definido. Algunos procesos descritos involucran la unión de estas proteínas a *pac-2* y a la endonucleasa viral que introducirían la doble hebra de ADN al interior de la cápside (Mettenleiter, 2002; Fields et al, 2004).

3.1.3.6. Brote.

Luego de la encapsidación de la molécula entera de ADN, la nucleocápside brota a través de la membrana interna nuclear. Interacciones entre la cápside y las proteínas del tegumento, entre las proteínas del tegumento y las glicoproteínas virales en la membrana nuclear interna facilitan este proceso. La cápside adquiere una capa de tegumento con la gemación a través de la membrana interna nuclear; posteriormente, el tegumento se hace más denso durante el egreso de la partícula viral debido a la maduración de estas proteínas o al intercambio de capas de tegumento en los organelos membranosos (Mettenleiter, 2002).

La ruta de egreso del virión entre la membrana nuclear interna y externa hacia el exterior de la célula infectada aún no está definida; dos vías han sido propuestas para el egreso del virión, basadas en resultados de microscopía electrónica. En la primera vía propuesta, la nucleocápside adquiere su envoltura en la membrana nuclear interna y la pierde al fusionarse con la membrana nuclear externa. Luego, al migrar por el aparato de Golgi adquiere finalmente la envoltura y la partícula envuelta es finalmente liberada a través de vesículas secretorias. En la segunda vía, la partícula envuelta se mueve a través del citoplasma, en el lumen del retículo endoplasmático o en vesículas del aparato de Golgi, donde ocurre la maduración final de las glicoproteínas del virión, sin pérdida de la envoltura proveniente de la membrana nuclear (Mettenleiter, 2002; Fields et al, 2004).

Para la propagación de una célula a otra vecina a través del espacio extracelular, los VHS utilizan las uniones celulares (desmosomas); gE y gI son requeridas para esta propagación. Ambas glicoproteínas forman un complejo que tiene como blanco las uniones celulares y median el traslado del virión a través de estas (Fields et al, 2004).

3.1.4. Latencia.

La habilidad de los VHS para establecer una infección latente a lo largo de la vida en el huésped humano es el mecanismo de persistencia y de evasión más importante de estos virus. Luego de establecer la infección en las mucosas, el virus migra por flujo axonal retrógrado a los ganglios nerviosos (trigéminos y espinales) estableciendo un estado de infección latente en los cuerpos neuronales (Thompson & Sawtell, 2001; Whitley & Roizman, 2001).

Existen dos razones por las que las neuronas sensoriales permanecen infectadas: primero, el virus se encuentra inactivo, en forma episomal con mínima expresión de proteínas virales, por lo que genera pocos péptidos virales que puedan ser presentados asociados a moléculas de histocompatibilidad tipo I (MHC-I); segundo, las neuronas presentan bajos niveles de MHC-I, lo que hace difícil el reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8 (Fields et al, 2004, Efstathiou & Preston, 2005).

El proceso molecular de la latencia de los VHS no está bien dilucidado. Un único promotor viral parece permanecer activo durante la latencia y este conduce a la expresión de especies no codificadoras de ARN designadas con el nombre de transcritos asociados a la latencia (LATs) (Thompson & Sawtell, 2001). Algunos estudios señalan que estos promueven el establecimiento de la latencia por ejercer un efecto negativo sobre la expresión de los genes líticos (Preston, 2000; Efstathiou & Preston, 2005).

3.1.5. Reactivación del estado de latencia.

La infección latente se caracteriza por la presencia continua del genoma viral en la célula, en ausencia de expresión viral; sin embargo, se requiere de varios genes virales para reactivarla, fenómeno que ocurre periódicamente en una parte de las neuronas que albergan al virus latente (Fields et al, 2004).

La infección latente se reactiva debido a un estímulo local, como daño en el tejido innervado por neuronas que acoge al virus latente, o por estímulo sistémico, como estrés físico o emocional, hipertermia, exposición a luz ultravioleta, menstruación o desbalance hormonal. Consecuentemente, el virus migra a través de los axones de la neurona sensorial y reinfecta el tejido epitelial. A este nivel, la respuesta inmune se activa nuevamente y controla la infección local destruyendo las células del epitelio, produciendo una nueva úlcera. Este ciclo puede repetirse varias veces (Janeway et al., 2005).

Los estudios destinados a establecer los mecanismos moleculares responsables de la reactivación, no han podido identificar a un gen específico o un grupo de genes responsables de este proceso. Concerniente a la expresión génica durante la reactivación, se piensa que esta debe ser regulada de manera diferente a una infección aguda. Se postula que, en neuronas, bajos niveles de expresión de genes α y β preceden a la síntesis de ADN viral y la expresión de genes γ . Inicialmente, la expresión viral puede no ser detectable; es la liberación de partículas virales la que amplifica la señal, generando elevados niveles de expresión de genes α y β que pueden ser detectados, luego de reiniciada la reactivación (Fields et al, 2004, Efstathiou & Preston, 2005)

3.1.6. Patología.

Los cambios patológicos inducidos por la replicación de los VHS son similares para la infección primaria y la infección recurrente, pero varían en la citopatología. Estos cambios representan una combinación de alteraciones celulares, muerte celular y respuesta inflamatoria asociada. Los cambios inducidos en la estructura celular por la infección viral incluyen, condensación de la cromatina seguida por degradación del núcleo, fragmentación de la membrana celular y formación de células gigantes multinucleadas. Con la lisis celular, se libera el fluido que contiene grandes cantidades de virus, que se disemina entre la dermis y epidermis (Fields et al, 2004).

En las estructuras de la piel, se monta una respuesta inflamatoria que es más intensa en una infección primaria que en una recidiva. En el área de la infección se producen cambios vasculares que forman necrosis hemorrágica; estos cambios histopatológicos son más intensos cuando la infección se establece en áreas diferentes a la piel, como ocurre en una encefalitis herpética o herpes neonatal (Whitley & Roizman, 2001; Fields et al, 2004).

3.1.7. Patogénesis de Infección Humana.

La infección por los VHS no tiene incidencia estacional, se transmite por contacto directo con secreciones infectadas de pacientes sintomáticos o asintomáticos; el período de incubación varía entre 1 y 26 días con media de 6-8 días. Lesiones orales y faciales son usualmente causadas por VHS-1 y lesiones ano-genitales por VHS-2; pero ambos tipos de virus pueden afectar ambas mucosas dependiendo de la región de contacto (Figura 4) (Kimberlin & Rouse, 2004; Wald, 2006).

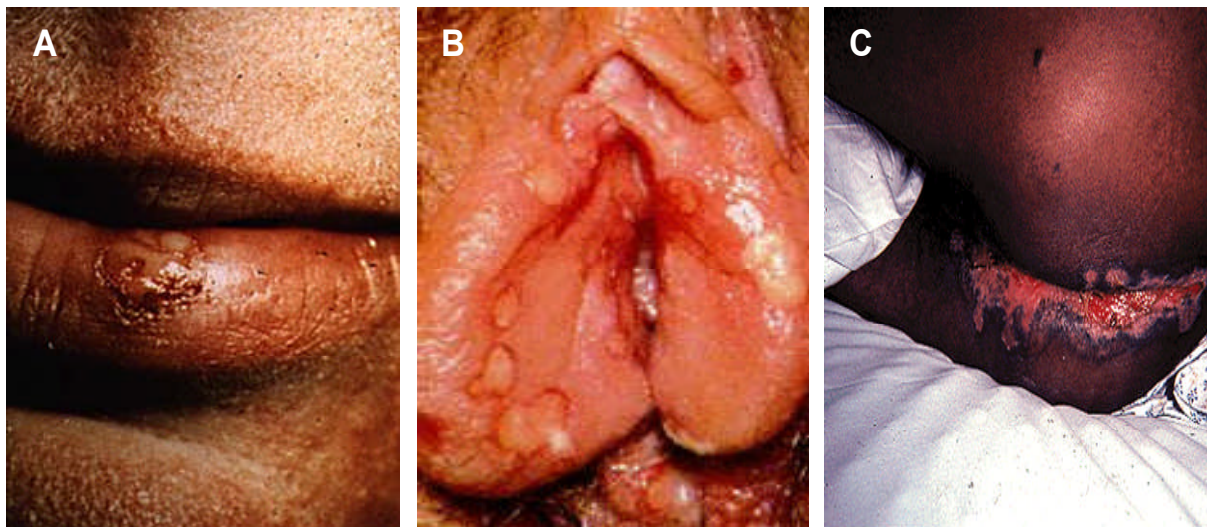


Figura. 4. Manifestaciones clínicas de las infecciones causadas por los VHS. (A) Herpes oral, lesión localizada en el labio inferior. **(B)** Herpes genital, úlceras localizadas en mucosa genital femenina y **(C)** Herpes ano-genital, lesión diseminada en paciente con SIDA (Todar, 2006).

La infección de piel o mucosas es usualmente seguida por la transmisión vía nervios sensoriales hacia los ganglios espinales o trigéminos, donde se establece la infección latente. Posteriormente, se presentan reactivaciones frecuentes e intermitentes, con replicación viral y traslado centrípeto que conduce a una liberación del virus en la cavidad oral o regiones ano-genitales. Frecuentemente las reactivaciones son asintomáticas constituyendo la mayor causa de transmisión del virus (Schneider-Schaulies, 2000; Wald et al., 2000; Wald, 2006).

Entre las complicaciones de las infecciones causadas por los VHS se pueden citar la queratoconjuntivitis, infecciones intrauterinas, neonatales y post-natales; una consecuencia común es la encefalitis herpética, la cual afecta a 1 de cada 3 bebés infectados, frecuentemente con un pronóstico malo. Los pacientes con inmunodepresión suelen presentar infecciones más severas con diseminación viral y un mayor número de reactivaciones.

La frecuencia de las reactivaciones depende del lugar anatómico afectado y del subtipo viral; así, las recurrencias de la infección por VHS-2 son de 8 a 10 veces más frecuentes que las causadas por VHS-1. El 70-80% de pacientes inmunodeprimidos sufren reactivaciones locales y en un 10% de estos se

produce la diseminación hematógena con lesión visceral (Wald et al., 2000; OMS, 2001; Whitley & Roizman, 2001; Fields et al., 2004).

3.1.8. Respuesta Inmune

Los mecanismos inmunes de control de las infecciones herpéticas primarias y recurrentes difieren en varios aspectos. En el herpes genital recurrente, los mecanismos de respuesta inmune específica se activan rápidamente en comparación a una lesión inicial. El tiempo promedio de duración de las lesiones y la liberación de partículas virales es de 21 y 10 días, para una lesión inicial, mientras que en infecciones recurrentes la duración de las lesiones es en promedio de 10 días y 4 días la liberación del virus (Cunningham & Mikloska, 2001).

La respuesta inmune específica demora varios días en desarrollarse, por lo que los mecanismos innatos de inmunidad, interferones, macrófagos y células NK, se constituyen en la primera línea de defensa, en tanto los anticuerpos neutralizantes y linfocitos T, que secretan citocinas antivirales comienzan a producirse. La producción de citocinas en el sitio de la lesión, por parte de las células epidérmicas y células inmunes infiltradas, es importante para el control del efecto citopático. En las vesículas herpéticas, la presencia de altas concentraciones de β -quimoquinas, interleucina 12 (IL-12) e interferón- α , β , y γ (IFN- α , β , y γ), reflejan la actividad de estas células (Goodbourn, 2000; Cunningham & Mikloska, 2001; Hernández-Urzúa, 2001).

Las lesiones herpéticas muestran todas las características de un predominante perfil de respuesta Th-1, con la inducción de MHC clase I en las células epidérmicas. Por otro lado, IFN- γ juega un importante papel regulando la expresión de MHC-I y II, activando macrófagos y en sinergia con IFN- α previniendo la propagación del virus (Brutkiewicz & Welsh, 1995; Sainz & Halford, 2002; Samuel, 2001; Sen, 2001).

Un perfil de citocinas Th-1 es importante en el control de la infección celular por el virus dado que solo las células T citotóxicas son capaces de eliminar las células infectadas, mientras que un perfil Th-2 a través de los anticuerpos neutralizantes previenen la transmisión del virus de célula a célula (Malmgaard & Paludan, 2003). La eliminación de las células infectadas y la inducción de la inmunidad antiviral en las células adyacentes no infectadas, son actividades complementarias de los linfocitos T CD4 y CD8 infiltrados en el sitio de la lesión (Cunningham & Mikloska, 2001).

Dado que los VHS ingresan a los axones sensoriales terminales para transportarse hacia los ganglios dorsales, es necesaria una protección inmune adicional para minimizar la liberación del virus de los ganglios dorsales y limitar la magnitud de las subsecuentes reactivaciones virales. El mecanismo inmune regulador no puede ser estudiado directamente en humanos; estudios realizados en modelos murinos indican que los linfocitos T CD8 son los responsables del control inicial de la replicación viral en el sistema nervioso central, incluso en ausencia de expresión de MHC-I por las neuronas (Cunningham & Mikloska, 2001).

3.1.9. Evasión de la Respuesta Inmune.

Una apropiada defensa contra los patógenos virales es esencial en los diferentes niveles de la infección viral. La protección mecánica provista por la piel y el epitelio protege la entrada de patógenos, pero los virus frecuentemente poseen mecanismos especializados para vencer estas barreras. El rápido reclutamiento de células y moléculas del sistema inmune innato es la siguiente línea de defensa. Sin embargo, debido a la exitosa evolución viral, estos mecanismos de defensa también pueden ser sobrepasados, del mismo modo que existen mecanismos que evaden la respuesta inmune adquirida (Tortorella et al., 2000; Janeway et al., 2005). A continuación se citan los principales mecanismos de evasión de la respuesta inmune descritos para los VHS:

- *Interferencia de la expresión de Moléculas de Histocompatibilidad tipo I.* La proteína ICP47 previene la unión de péptidos virales con MHC-I por interacción con TAP 1 y TAP 2, en el citosol del retículo endoplasmático (RE). Debido a que HLA-C y HLA-G requieren de péptidos TAP-dependientes para una estable expresión en la superficie celular, estas permanecen en el RE de las células infectadas (Tortorella et al., 2000).

- *Neutralización de Inmunoglobulinas antivirales.* Los VHS tienen receptores que reconocen la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas para evitar las consecuencias del reconocimiento por estos anticuerpos. Las glicoproteínas virales gE y gI son capaces de unirse a monómeros o agregados de IgG; este reconocimiento se puede realizar en los viriones y en las células infectadas. gE tiene baja afinidad en ausencia de gI y este último a su vez se une solo a agregados de IgG (Tortorella et al., 2000).

- *Interferencia con mecanismos complemento dependientes.* Los VHS tienen además la capacidad de bloquear los mecanismos de defensa mediados por el sistema del complemento. Expresan un cofactor para la ruptura de las fracciones C3b y C4b por el factor I, dando como resultado moléculas inactivas, iC3b e iC4b (Tortorella et al., 2000).

Por otro lado, gC-1/2 expresadas en la envoltura viral y en la superficie de células infectadas, protegen contra la neutralización mediada por el complemento. Aunque la función de gC2 no es del todo clara, gC1 inhibe la interacción de C3b con la proteína sérica properdina. Esto acelera la declinación de la vía alterna C3 convertasa, porque properdina estabiliza el complejo C3bBb (Lubinski et al., 1998; Tortorella et al., 2000).

- *Interferencia con la expresión de citocinas.* Las células infectadas por VHS expresan rápidamente una señal supresora de citoquina-3 (SOCS3), que es un regulador negativo de la vía JAK/STAT. SOCS3 inhibe varias citocinas incluyendo a los IFNs, interleucinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, hormona del crecimiento, prolactina, insulina, eritropoyetina y factor neurotrópico (Tortorella et al., 2000; Yokota et al., 2005).

3.1.10. Epidemiología y Transmisión.

La infección por VHS-1 se adquiere generalmente durante la niñez, presentándose una mayor incidencia de seroconversión los dos primeros años de edad, llegando al 90% de seropositividad en personas mayores de 60 años.

Los anticuerpos frente al VHS-2 raramente se presentan antes de la pubertad, la seroprevalencia varía entre el 25 y 60% según el nivel socio-económico y cultural de la población que se estudie (Figura 5). Entre el 60 y 80% de las infecciones genitales por VHS-2 son asintomáticas (OMS, 2001; Fields et al., 2004; Gatcheva et al., 2004). La prevalencia de VHS-2 es mayor en mujeres comparada con hombres, las infecciones genitales están asociadas con edad temprana de la primera relación sexual y se incrementa con la vida sexual activa, el número elevado de parejas sexuales, la carencia de circuncisión (en hombres) y la existencia de otras infecciones de transmisión sexual (ITS) (Stanberry et al., 1999; Whitley & Roizman, 2001; OMS, 2001; Fields et al., 2004).

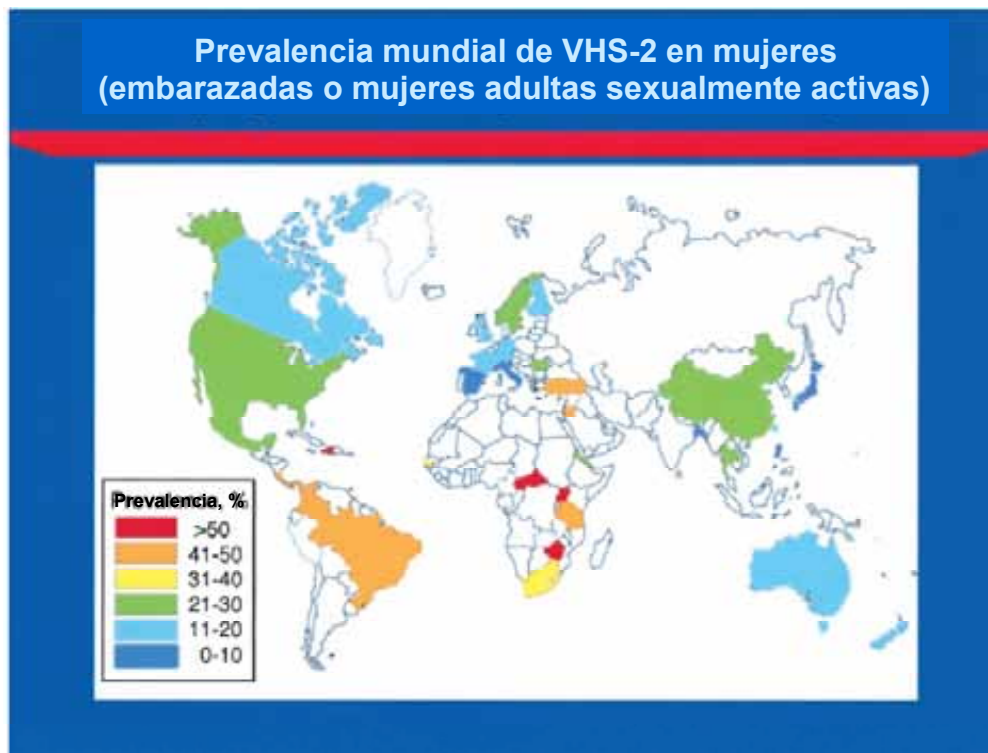


Figura 5. Prevalencia de VHS-2 en mujeres en edad fértil. Las áreas no coloreadas indican regiones donde no existe información de seroprevalencia específica de edad. Las regiones coloreadas representan el porcentaje de sujetos con anticuerpos específicos contra VHS-2 (Corey, 2007a).

Localmente no contamos con datos de seroprevalencia; sin embargo, un estudio reciente estableció que la prevalencia del VHS en población femenina con diagnóstico clínico de patología herpética es de un 84%, siendo la edad promedio de 38 años para los casos de herpes genital (15 a 60 años) (Terceros & Terrazas, 2007).

La mayoría de los eventos de transmisión de VHS-2 no están asociados con manifestaciones clínicas de recurrencias en la pareja infectada, como ocurre en otras ITSs. El riesgo de adquisición de VHS-2 es alto en mujeres, esto puede relacionarse con el alto número de recurrencias en hombres infectados (alrededor de 20% más alto que en mujeres), además de factores biológicos como la morfología y extensión de la superficie de la mucosa femenina (Stanberry et al., 1999).

En los últimos años las infecciones herpéticas han cobrado gran importancia debido a que existe una interacción bi-direccional entre VHS-2 y VIH, las infecciones causadas por VHS-2 incrementan la eficiencia de la adquisición y transmisión de VIH (Severson & Tyring, 1999; McClelland et al., 2002; Corey, 2007a; Corey, 2007b). Mientras que VIH incrementa la susceptibilidad a VHS-2 e incrementa la propagación y el grado de severidad de las manifestaciones clínicas (Moriuchi et al., 2000; OMS, 2001; McClelland et al., 2002; Nagot et al., 2007)

3.1.11. Tratamiento y Prevención.

Debido a que VHS no puede ser eliminado del organismo, por establecer infecciones latentes, la terapia antiviral se limita a reducir los síntomas, la frecuencia de las recurrencias, la liberación asintomática de partículas virales y la transmisión de la infección. Para esto, se han diseñado dos estrategias en el manejo de las infecciones herpéticas: la terapia episódica, que consiste en el tratamiento de una infección primaria y de las recurrencias, y la terapia supresiva, que esta destinada a prevenir las recurrencias (OMS, 2001).

3.1.11.1. Fármacos anti-VHS.

El agente antiviral de referencia para el tratamiento de infecciones causadas por VHS es el aciclovir (ACV), análogo de nucleósido que inhibe selectivamente la replicación del ADN, al interaccionar con la timidin-cinasa viral evitando la elongación del ADN, con baja toxicidad celular (De Clercq, 2001; De Clercq, 2004). Moléculas derivadas del ACV, como valaciclovir (VACV), y famciclovir (FCV), incrementan la biodisponibilidad oral comparada con el ACV (Giménez, 1993; De Clercq, 2001; Wood, 2003; Coen & Schaffer, 2003).

Frecuentemente, en pacientes inmunocomprometidos, surgen cepas análogo de nucleósido-resistentes, después de una terapia antiviral. Para el tratamiento de estos pacientes Foscarnet (PFA), un análogo de pirofosfato, mostró ser efectivo; PFA ejerce su actividad independiente de la timidin-cinasa viral o celular, interviene en la elongación del ADN viral inhibiendo la ruptura del grupo pirofosfato de los deoxinucleótidos (dNTPs) (Snoeck, 2000; Snoeck & De Clercq, 2002; Wood, 2003; De Clercq, 2004).

Otro agente recientemente descrito Cidofovir (CDV), un derivado de fosfonato, mostró ser un potente agente selectivo anti-VHS, de cepas que presenten mutaciones en la timidín-cinasa y la polimerasa viral (Aduma et al., 1995; Balfour, 1999; Beadle et al., 2002; Snoeck & De Clercq, 2002; De Clercq, 2003; De Clercq, 2004; De Clercq & Holy, 2005).

3.1.11.2. Microbicidas anti-VHS-2.

Debido a que una de las patologías herpéticas más frecuentes a nivel mundial es el herpes genital, se han desarrollado nuevas estrategias de prevención que emplean agentes denominados microbicidas. Los agentes microbicidas permiten reducir la transmisión de la infección viral por diferentes estrategias: por inactivación directa de la partícula viral, bloqueo de las interacciones ligando-receptor esenciales para la infección o por alteración de las condiciones de las mucosas para reducir la susceptibilidad a esta infección (McCormack, 2002; Gonga et al., 2005; Keller et al., 2005).

Diferentes agentes microbicidas han sido descritos por varios autores; por ejemplo, espermicidas como el N-9 y menfegol demostraron ser activos contra infecciones *in vitro* de VHS-2, pero que carecen de evidencia de efecto protector *in vivo* (OMS, 2001). Por otro lado, Pro-2000, dextrán sulfato, carragenina y polisacáridos sulfatados poseen actividad protectora *in vitro* y en modelos murinos de infección vaginal (Bourne et al., 1999; Keller et al., 2005).

SPL7013, una nueva generación de dendrímeros de plomo, posee actividad preventiva y de tratamiento contra VHS-1 y 2, con actividad estable pese a variaciones en el pH (Gonga et al., 2005). Un polímetro de ácido mandélico (SAMMA) demostró inhibir el proceso de unión y entrada de VIH y VHS (Herold et al., 2002). Pruebas clínicas de los agentes anteriormente citados están actualmente en desarrollo.

3.1.11.3. Productos Naturales anti-VHS.

Los productos naturales derivados de plantas y microorganismos proveen a la industria farmacéutica de una de la más importante fuente de compuestos en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas (Vlieyincx & Vanden Berghe, 1991; Domingo & López-Brea, 2003; Jassim & Naji, 2003). Se estima que al menos un 75% de los fármacos antivirales aprobados desde 1981 al 2002 son de origen natural o producto del conocimiento obtenido del estudio de productos naturales (Anderson et al., 2000; Hassan Khana et al., 2005). Varios estudios indican que compuestos aislados de plantas medicinales pueden

suprimir la replicación del VHS, un ejemplo es el *n*-doconasol, agente natural aprobado por *Food & Drug Administration* como tratamiento tópico para herpes labial (Hassan Khana et al., 2005).

A nivel mundial, se pueden citar numerosas especies con actividad anti-VHS. Extractos metanólicos y acuoso-metanólicos de plantas medicinales nepalesas mostraron actividad antiviral en sistemas *in vitro*, VHS/células Vero. *Holoptelia integrifolia* y *N. indicum* mostraron considerable actividad anti-VHS, ninguno de estos extractos mostraron efectos citotóxicos (Rajbhandari & Wegner, 2001).

Extractos de *Scaevola sericea*, *Psychotria hawaiiensis*, *Pipturus albidus* y *Eugenia malaccensis*, utilizadas en la medicina tradicional polinesia mostraron actividad antiviral selectiva contra VHS 1 y 2 (Martin & Ernst, 2003).

De veinte extractos de plantas medicinales tailandesas evaluados en su actividad biológica contra VHS-1, once de ellos inhiben más del 50% de las placas virales. Entre estos extractos vegetales, los obtenidos de *Aglaia odorata*, *Moringa oleifera* y *Ventilago denticulata* fueron además efectivos contra cepas de VHS-1 timidin-cinasa deficientes (TK⁻) y fosfonoacetato-resistentes (Lipipun et al., 2003).

Varias plantas medicinales provenientes de Norte y Sud América tienen promisorio actividad anti-VHS. Un estudio que examinó la actividad antiviral de extractos acuosos de especies argentinas *Polygonum punctatum*, *Lithraea molleoides*, *Sebastiania brasiliensis* y *Sebastiania klotzschiana* mostró que poseen actividad *in vitro* anti-VHS-1 (Kott et al. 1999). *Trixis praestans* y *Cunila spicata* Benth, plantas medicinales brasileras, mostraron actividad antiviral *in vitro* anti-VHS 1 y 2 (Martin & Ernst, 2003). Extractos provenientes de 10 especies del género *Euphorbia* (Euphorbiaceae), usadas por curanderos tradicionales colombianos en el tratamiento de úlceras, cáncer, tumores y otras enfermedades, fueron evaluados para determinar la actividad anti-VHS, se encontró elevada actividad en el extracto hidroalcohólico hojas/tallo de *E. cotinifolia* & *E. tirucalli* (Martin & Ernst, 2003).

En cuanto a los modelos de evaluación *in vitro*, se han utilizado líneas de variado origen; entre estas se citan HeLa, Vero, BHK-21, entre otras (Tabla 1) (Ahmad et al., 1996; Cullen et al., 2001; Hassan Khana et al., 2005; Cos et al., 2006).

Tabla 1. Relación de los modelos más utilizados para la evaluación de actividad *in vitro* de plantas anti-VHS.

Planta		Extracto o principio activo	Modelo de evaluación <i>in vitro</i>
<i>A. catechu</i> (Palmae)	Linn.	Extracto acuoso y metanolico	Inhibición de formación de placas de VHS-1; células Vero
<i>B. trinervis</i> (Compositae)	Pers.	Extracto acuoso	Inhibición de la infección de VHS; células HeLa
<i>E. articulatum</i>		Extracto acuoso	Inhibición de la infección de VHS-2; células HeLa
<i>Limonium sinense</i>		Extracto etanolico, flavonoides	Inhibición de formación de placas de VHS-1; células Vero
<i>Withania somnifera</i> L. (Solanaceae)		Extracto metanolico	Inhibición de formación de placas de VHS-1; células Vero
<i>Opuntia streptacantha</i>		Extracto acuoso	Inhibición de formación de placas de VHS-2; células BHK-21
<i>Eucheuma striatu</i>		Polisacarido	Reducción del MTT y Reducción del Efecto citopático de VHS-1; células Vero
<i>Geranium sanguineum</i> L.		Extracto acuoso	Reducción del MTT y Reducción del Efecto citopático de VHS-1; células Vero
<i>Spirulina maxima</i>		Extracto acuoso	Reducción del Efecto citopático de VHS-1 y 2; células Vero
<i>Terminalia</i> Linn.	<i>arjuna</i>	Taninos	Inhibición de formación de placas y Reducción del MTT de VHS; células Vero
<i>Plantago lanceolata</i>		Extracto etanolico	Inhibición de formación de placas de VHS-2; células BHK-21

En el contexto nacional, extractos acuosos y etanólicos de siete plantas, utilizadas por la medicina tradicional boliviana, fueron evaluados en su actividad contra la infección *in vitro* de VHS-1; se encontró actividad antiviral ejercida por *Satureja boliviana* (Khoa) y *Baccharis genistelloides* (Quimsba-Kuchu) (Abad et al., 1999).

En cuanto a los mecanismos de acción antiviral propuestos para diferentes productos y compuestos de origen natural, se pueden citar plantas que ejercen actividad directamente sobre la partícula viral; por ejemplo *Euphorbia thymifolia* (Yang et al., 2005b), *Terminalia arjuna* Linn (Cheng et al., 2002) y *Phyllanthus urinaria* (Yang et al., 2005a; Yang et al., 2007c) reducen la infectividad de VHS-2.

Especies como *Geranium sanguineum* (Serkedjieva & Ivancheva, 1999), *Phyllanthus orbicularis* (Barrio & Parra, 2000), *Annona muricata* (Padma & Pramod, 1998) y *Barleria lupulina* (Yoosook & Panpisutchai, 1999) demostraron tener efecto sobre el proceso replicativo de VHS 1 y 2.

Psychotria serpens (Kuo & Chen, 2001) y *Limonium sinense* (Kuo et al., 2002) inhiben la síntesis de proteínas virales. *Santonina insularis* inhibe la transmisión de célula a célula (de Logu et al., 2000).

Especies como *Plantago major* (Chiang et al., 2002), *Caesalpinia pulcherrima* (Chiang et al., 2003), *Spirulina maxima* (Hernández & Nieves, 2002), *Prunella vulgaris* (Xu, 1999), *Spirulina platensis* (Hayashi et al., 2006) y *Terminalia arjuna* (Cheng et al., 2002) inhiben selectivamente la adsorción y penetración viral. Interesantemente, *Terminalia arjuna* también inhibe las etapas tardías de la replicación de VHS-2.

Por otro lado, varias especies vegetales mostraron ejercer un efecto protector de la célula huésped contra las infecciones causadas por VHS, *Spirulina platensis* y *Arthospora platensis* son capaces de ejercer su efecto protector inclusive con solo 3 horas de pretratamiento (Hayashi et al., 2006; Rechter et al., 2006). Productos derivados del hongo *Ganoderma lucidum*, polisacarido (Kug & Kim, 2002) y proteoglicano (Liu & Yang, 2004), y el extracto acuoso de *Opuntia streptacantha* (Ahmad et al., 1996) demostraron poseer un efecto dual preventivo de la infección y durante el ciclo replicativo viral, en células infectadas.

Posteriores estudios fitoquímicos y de fraccionamiento bio-dirigido, han sido conducidos para determinar los componentes o principios activos responsables de los efectos anteriormente citados, Las

características moleculares y estructurales de estos componentes están en directa relación con el blanco y mecanismo de acción. Por ejemplo, una preparación tópica popular para la prevención y tratamiento de brotes de herpes contiene un componente terpenoide proveniente de *Glycyrrhiza glabra* que mejora la resistencia a infecciones por VHS-1 a través de la inducción de células T CD4⁺ (Hassan Khana et al., 2005). La tabla 2 muestra un resumen de los compuestos de origen natural con sus respectivos mecanismos de acción descritos.

Tabla 2. Resumen de los mecanismos de actividad antiviral de compuestos provenientes de plantas medicinales (Jassim & Naji, 2003).

Clase de componentes	Blancos y mecanismo de acción	Ejemplos de especies vegetales
Polisacaridos	Bloqueo de la unión del virus	<i>Achyrocline flaccida</i> , <i>Bostrychia montagnei</i> , <i>Cedrela tubiflora</i> , <i>Prunella vulgaris</i> , <i>Sclerotium glucanicum</i> , <i>Stevia rebaudiana</i> , <i>Rhizophora mucronata</i>
Tiofenos	Interacción con membrana celular	<i>Aspilia</i> , <i>Chenactis douglasii</i> , <i>Dyssodia anthemidifolia</i> , <i>Eclipta alba</i> , <i>Eriophyllum lanatum</i>
Flavonoides	Inhibición de la síntesis de ARN	<i>Agastache rugosa</i> , <i>Euphorbia grantii</i> , <i>Barleria prionitis</i> , <i>Calophyllum cerasiferum</i> , <i>Cal. inophyllum</i> , <i>Cal. teysmannii</i> , <i>Camellia sinensis</i> , <i>Garcinia multiflora</i> , <i>Helichrysum aureonitens</i> , <i>Maclura cochinchinensis</i> , <i>Markhamia lutea</i> , <i>Monotes africanus</i> , <i>Pterocaulon sphacelatum</i> , <i>Rhus succedanea</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Selaginella sinensis</i> , <i>Sophora moorcroftiana</i> , <i>Sophora tomentosa</i> , <i>Tephrosi sp.</i>
Terpenoides: sesquiterpenos, triterpenoides	Interacción con la envoltura viral y membrana celular. Inhibición de la síntesis de ADN	<i>Acokanthera sp.</i> , <i>Anagallis arvensis</i> (Primulaceae), <i>Cannabis sativa</i> , <i>Geum japonicum</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza radix</i> , <i>Glyptopetalum sclerocarpum</i> , <i>Gymnema sylvestre</i> , <i>Maesa lanceolata</i> , <i>Olea europaea</i> , <i>Quillaja saponaria</i> , <i>Rhus javanica</i> , <i>Strophanthus gratus</i>
Lectinas	Interacción con la envoltura viral	<i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Lens culinaris</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Triticum vulgaris</i>

Posteriores estudios de efectividad en modelos animales reportan a compuestos como carragenina lambda tipo IV, cineole, curcumin y eugenol, que mostraron protección significativa ($P < 0,05$) en modelo murino de infección intravaginal de VHS-2 y además, eugenol mostró significativa protección contra VHS-2 en el modelo de infección genital en cobayos (Bourne et al., 1999). La tabla 3 resume los resultados de evaluación de la actividad antiviral *in vivo*.

Tabla 3. Evaluación de extractos vegetales contra infecciones herpéticas (Martin & Ernst, 2003) en modelos animales.

Virus	Planta	Animal	Ruta de infección	Resultados
VHS-2	<i>Rhus javanica</i>	Cobayos	Intravaginal	Reduce la incidencia, severidad o recurrencia de las lesiones
VHS-1	<i>Geranium sanguineum</i> L	Cobayos	Cutánea	Demora en el desarrollo de las vesículas
VHS-1	<i>Rhus javanica</i> (ácidos purificados)	Ratones	Cutánea	El ácido morónico mostró eficacia terapéutica
VHS-1	<i>Melaleuca leucadendron</i> , <i>Nephelium lappaceum</i>	Ratones	Cutánea	Demora en el desarrollo de las vesículas y reduce la mortalidad
VHS-1	<i>Melia azedarach</i> L	Ratones	Corneal	Reducción de la severidad de la clínica y daño a la córnea
VHS-1	<i>Stephania cepharantha</i>	Ratones	Cutánea	Reducción de la severidad de lesiones y prolongación del tiempo medio de supervivencia

Las evidencias citadas anteriormente, han conducido a la posterior ejecución de pruebas clínicas aleatorias. Por ejemplo, una evaluación clínica doble-ciego mostró resultados positivos del uso de una crema con 1% del extracto obtenido de hojas de *Melissa officinalis* L para el tratamiento de lesiones herpéticas. Demostró una rápida curación de las lesiones de piel y mucosas, producto de una aplicación de la crema de dos a cinco veces por día. La actividad antiviral *in vitro* de *M. officinalis* fue atribuida a polifenoles y taninos (Martin & Ernst, 2003).

Una evaluación clínica doble-ciego realizada en Tailandia, utilizó una crema al 5% de *Clinacnatus nutans* en el tratamiento de herpes genital y en herpes zoster, con resultados positivos. Se observó una significativa cicatrización rápida de las lesiones en comparación con el grupo placebo; la aplicación de la crema se realizó 3 veces al día (Martin & Ernst, 2003).

Syded *et al.* condujo dos evaluaciones clínicas con *Aloe vera* para el tratamiento de lesiones genitales en hombres. La primera evaluación incluyó 120 hombres, seleccionados al azar, dentro de tres grupos para evaluar la eficacia y tolerancia del extracto hidrofílico de *A. vera* en crema o gel, comparado con preparaciones de placebo. Los productos evaluados fueron aplicados tres veces al día por cinco días por semana, con un máximo de 30 aplicaciones por dos semanas. Ambas preparaciones de *A. vera* fueron efectivas en la cicatrización y reducción de la duración de las lesiones, pero el tiempo de cicatrización fue significativamente más corto en pacientes que usaron la preparación en crema. La segunda evaluación clínica involucró a 60 hombres y comparó la efectividad del extracto hidrofílico de *A. vera* al 0,5% en crema; el protocolo de aplicación fue el mismo al anterior estudio. Se encontró que un 33% de pacientes usando la crema con *A. vera* curó después de una semana. El grupo tratado tuvo un significativo tiempo promedio de cicatrización de 4,9 vs. 12 días; $p < 0,01$ (Martin & Ernst, 2003).

A pesar de la cantidad de información acerca de extractos y compuestos con actividad anti-VHS, no todas las moléculas bioactivas anti-VHS han sido identificadas, aisladas, sintetizadas o evaluadas. Esto se considera un punto crucial para el desarrollo de nuevos agentes antivirales. Es conveniente que todas las especies promisorias sean incorporadas en futuros análisis para identificar el principio(s) activo(s), clarificar la naturaleza química y el mecanismo(s) de acción.

3.2. *Opuntia soehrensii*.

Opuntia soehrensii planta de origen andino, pertenece a la familia de las cactáceas, subfamilia *Opuntoide*. Comúnmente crece en zonas áridas, con precipitación pluvial anual de menos de 250 mm, y zonas semiáridas (250-450 mm de precipitación anual). En cuanto a su distribución se extiende desde el norte y el oeste de Bolivia, hasta el norte de Chile.

Alcanza los 15 cm de altura, presenta tallo suculento con cladodios aplanados y de forma arriñonada, de color verde hasta verde morado, presenta flores hermafroditas de color amarillo y fruto de color rojo

escarlata. Florece en primavera y se la encuentra en laderas y cimas de cerros, formando densas colonias, junto a torales y pajonales (Figura. 6) (Camaqui, 2007; De Lucca, 1992).



Figura. 6. *Opuntia soehrensii* Britt & Rose. Especie localizada en Bolivia departamento de La Paz, Provincia Aroma, comunidad Chiarumani (Beck, 1995).

Las semillas se emplean para la preparación de algunos alimentos (mazamorras, chichas) y como colorante natural para teñir prendas de un color violeta. Entre sus usos medicinales, la infusión se emplea como analgésico, antidiabético, hipotensor y febrífugo; además, la inhalación de vapores es útil en afecciones del tracto respiratorio (De Lucca, 1992; Camaqui, 2007). Su uso como infusión es indicado útil para niños y adultos, en procesos febriles que afectan a la boca provocando “aftas”. La solución acuosa para evitar el brote de la viruela y sarampión, además alivia el dolor y la inflamación producida por el herpes bucal (Girault, 1999; Stintzing & Carle, 2005; Camaqui, 2007).

3.3. Métodos usados para el estudio de agentes antivirales.

El tratamiento de las infecciones virales es una de las áreas de más rápido avance en el estudio de las enfermedades infecciosas. Debido al desarrollo tecnológico se cuenta en la actualidad con nuevos agentes antivirales que demuestran ser seguros y efectivos (Wood, 2003; De Clercq, 2004).

Si bien se cuenta con un amplio número de agentes antivirales, los estudios destinados a la evaluación preclínica y clínica de nuevos agentes antivirales continúan en desarrollo, destinados a mejorar la efectividad y reducir la toxicidad de agentes ya conocidos o a desarrollar nuevos agentes que se constituyan en una respuesta al tratamiento y prevención de infecciones emergentes o infecciones causadas por especies resistentes (De Clercq, 2004).

En cuanto a la evaluación preclínica, los estudios *in vitro* están destinados a demostrar la selectividad y especificidad de un nuevo agente antiviral y además deben incluir una exploración de las condiciones de cultivo que puedan afectar la evaluación de la actividad antiviral, la determinación de las posibles interacciones, y generar información sobre el mecanismo de acción y el potencial desarrollo de la resistencia al agente evaluado (Anónimo, 1997; Cos et al., 2006).

Entre los ensayos de evaluación de la actividad antiviral *in vitro* la prueba estándar de referencia (Gold Standard) recomendada por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCCLS) es el ensayo de reducción de placas de lisis (Hodinka & Swierkosz, 2000). Este monitor biológico evalúa la reducción en el número de placas virales resultado del tratamiento con el agente a evaluar, en referencia con las placas virales formadas en cultivos infectados, que no reciben tratamiento. Colorantes vitales son empleados para la visualización de las placas virales (Burleson, 1992; Payment, 1993; Murphy, 1999; Leary et al., 2002).

En estudios preliminares y en caso de evaluación de un amplio número de moléculas/extractos se recomienda como monitor el ensayo de reducción del efecto citopático (RECP). Ensayo que permite evaluar microscópicamente el efecto de daño celular producto de la infección viral, en cultivos tratados con el agente antiviral, comparados con los efectos citopáticos de los controles de infección (Burleson, 1992; Payment, 1993; Cotarelo et al., 1999; Murphy, 1999). Esta evaluación tiene cierto componente subjetivo, por lo que es necesario que el operador tenga experiencia en el reconocimiento de las alteraciones morfológicas debidas a la infección viral; pero, permite evaluar un amplio número de productos, con una menor cantidad de reactivos e insumos. Modificaciones a este ensayo han sido descritas, incorporando colorantes, como cristal violeta y rojo neutro, que permiten hacer objetiva la evaluación (Kott et al., 1999).

Otro procedimiento rápido y sensible se basa en la cuantificación colorimétrica de la actividad enzimática celular. Las deshidrogenasas mitocondriales son las principales responsables de la

reducción del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2-difeniltetrazolio (MTT) a cristales de formazán, producto coloreado, cuya absorbancia o densidad óptica (DO) es proporcional a la actividad de las células viables en cultivo. Esta reducción es un indicador del efecto del agente antiviral, al permitir detectar la presencia de células viables, en cultivos infectados tratados con el producto a evaluar (Berridge & Tan, 1996; Buttke, 1993; Hassan Khana et al., 2005).

Los estudios preclínicos *in vivo*, incluyen estudios de toxicidad sistémica y tópica, de acuerdo al posible uso terapéutico, además de la evaluación del efecto antiviral en modelos experimentales de infección; estos estudios, juntamente con la evaluación farmacológica (absorción, distribución, metabolismo, excreción y farmacodinamia) deben ser realizados previos a la evaluación clínica (Anónimo, 1997; Cos et al., 2006).

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Material Vegetal.

Frutos de *Opuntia soehrensii* (*O. soehrensii*), fueron colectados en las cercanías de la comunidad de Guaqui, La Paz-Bolivia, en Marzo del 2004. La especie fue autenticada por el Herbario Nacional (Instituto de Ecología, Carrera de Biología) Facultad de Ciencias Puras de la Universidad Mayor de San Andrés.

4.2. Extracto vegetal.

El extracto vegetal se preparó al 4% (peso/volumen) de las semillas y la pulpa anexa desecada en agua destilada y desionizada por maceración durante 48 horas. Luego de eliminar las sustancias insolubles por filtración con papel Wattman No.1, alícuotas del mismo fueron concentradas por liofilización (Labconco, Freeze Dry System). Para su uso en los ensayos, el material liofilizado fue reconstituido en medio de mantenimiento celular [RPMI 1640 (SIGMA, Chemical Co.) suplementado con 5 % de suero fetal bovino inactivado (SFB ICN, Biomedicals. Inc.), penicilina sódica, sulfato de estreptomicina y anfotericina B (10000 UI, 0.01g y 0.0025g respectivamente)] (RPMI-S) y esterilizado por filtración a través de una membrana milipore con poro de 0.22 μ m de diámetro (Mamani et al., 2004).

4.3. Células.

4.3.1. Cultivo de células BHK-21.

La línea celular BHK-21 (ATCC) de fibroblastos provenientes de riñón de hámster sirio, susceptible a la infección por virus Herpes simplex (Mamani et al., 2004; Terceros & Terrazas, 2002), fue cultivada en medio RPMI-S de modo continuo a 37°C y ambiente saturado de humedad. Para su uso en los diferentes ensayos, las células fueron colectadas por tratamiento de la monocapa celular con solución buffer fosfato-EDTA (PBS-EDTA) (Terceros & Terrazas, 2002) y se determinó la viabilidad y concentración celular.

4.3.2. Cultivo de Linfocitos Humanos.

Linfocitos humanos, provenientes de sangre periférica fueron aislados por gradiente de densidad. Para esto, 10 ml de sangre periférica fue colectada por punción venosa en un tubo conteniendo heparina (50 U/ml). Posterior a una centrifugación por 5 minutos a 1500 rpm, la interfase del paquete globular con el plasma fue colectada y diluida 1:1 con solución de HANK'S (SIGMA, Chemical Co.) y transferida cuidadosamente sobre 3 ml de Medio de Separación de Linfocitos [LSM ICN, Biomedicals. Inc. (densidad 1,007)] para la separación celular. Luego de centrifugar por 30 minutos a 1500 rpm, los linfocitos fueron colectados con ayuda de una pipeta pasteur, lavados con buffer fosfato salino (PBS) y cultivados en RPMI-S a una concentración de 2×10^6 /ml en policubetas de 96 pozos a 37 °C, 5% de CO₂ y saturación de humedad (Claros et al., 2007).

4.4. Virus.

El virus Herpes simplex nativo (VHS-LV11) utilizado en este trabajo, fue aislado en el laboratorio a partir de una lesión oral y cultivado de manera estable bajo condiciones de laboratorio (Mamani et al., 2004). La cepa viral fue identificada y tipificada por Inmunofluorescencia directa (IFD), empleando antisueros monoclonales de ratón marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Dako Cytomation), que permiten reconocer antígenos gG-1 y gG-2 específicos de VHS tipo 1 o tipo 2, respectivamente (Fang et al., 1999; Rekabdar et al., 1999). La cepa viral fue adicionalmente tipificada por Reacción en Cadena de la Polimerasa (Diagnostics Chemicon) utilizando sondas específicas para la identificación de VHS tipo 1 o tipo 2 (Terceros & Terrazas, 2007).

4.4.1. Titulación Viral.

El título viral fue determinado en cultivos de células BHK-21 infectadas con diluciones en serie del virus. Brevemente, monocapas celulares cultivadas en policubetas de 96 pozos a una concentración de 3×10^5 /ml fueron infectadas, por triplicado, con 50 µl de diluciones seriadas del *stock* viral. Luego de 1 hora a 37 °C, el inóculo fue removido y las células cultivadas en medio RPMI-S a 37 °C por 48 y 72 horas (Burlison, 1992; Kott et al., 1999). Para este diseño experimental el título viral fue determinado por dos métodos:

(a) por microscopia, el cultivo viral fue monitoreado cada 24 horas evaluando cualitativamente el desarrollo de efectos citopáticos celulares provocados por la infección viral en comparación con los cultivos control de células no infectadas de acuerdo con los parámetros descritos en la tabla 4 (Mamani et al., 2004). La dosis infectiva media en cultivo celular (TCID₅₀/ml) fue calculada por el método de Reed y Muench (Reed & Muench, 1938; Cotarelo et al., 1999).

Tabla 4. Cuantificación de efecto citopático en función a las alteraciones morfológicas celulares.

Alteraciones morfológicas celulares	Efecto Citopático (%)
Ausencia de alteraciones	0
Inclusiones intracelulares	25
Inclusiones intracelulares y vacuolas intracelulares	50
Inclusiones intracelulares, vacuolas intracelulares y pérdida de adherencia celular	75
Destrucción total de la monocapa celular	100

(b) por el ensayo enzimático-colorimétrico de reducción del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2-difeniltetrazolio (MTT SIGMA, Chemical Co.) a cristales de Formazán. Para esto, posterior al tiempo de cultivo (48 y 72 horas) el medio de cultivo fue reemplazado por 100 µl de MTT (1 mg/ml) en RPMI sin indicador Rojo Fenol (SIGMA, Chemical Co.) y las placas fueron incubadas por 4 horas adicionales a 37 °C (Terrazas et al., 1993). El producto reducido fue disuelto por adición de 150 µl de Isopropanol:HCl 0.04 N y la densidad óptica fue medida con un lector de ELISA a 545 nm y 620 nm de filtro diferencial. Los resultados fueron expresados en porcentaje de reducción de la sal de los cultivos infectados, en referencia a los controles no infectados (Kott et al. 1999; Chiang et al., 2002).

Por otro lado, el ensayo de formación de placas de lisis fue también empleado para la titulación viral (Burleson, 1992). Brevemente, monocapas de células BHK-21 (3x10⁵/ml) cultivadas en cajas petri de 60 mm, fueron infectadas con 200 µl de diluciones en serie del *stock* viral. Luego de 1 hora a 37 °C, el inóculo fue removido, las monocapas lavadas dos veces con PBS y cultivadas por 48 y 72 horas a 37 °C en medio RPMI-S concentrado al doble en sus constituyentes (RPMI-2X-S) y mezclado con agar-agar al 2%, en proporción 1:1 (Mamani et al., 2004). Pasado el período de cultivo la placas virales se

fijaron con formol al 1% y se revelaron con Cristal violeta al 0,5% (Leary et al., 2002), el recuento de áreas de lisis se realizó visualmente y confirmado por microscopía; el título viral se expresó en unidades formadoras de placas (ufp/ml) (Payment, 1993).

4.5. Evaluación del efecto biológico de *O. soehrensii* sobre cultivos celulares.

4.5.1. Efecto citotóxico.

Cien microlitros de la suspensión de células BHK-21 con concentraciones celulares de 5×10^4 , 3×10^5 y 1×10^6 /ml de RPMI-S, fueron cultivadas en policubetas de 96 pozos con diferentes diluciones del producto vegetal (0,00021 - 42 mg/ml), por períodos de 24, 48 y 72 horas. El efecto sobre la viabilidad celular (efecto tóxico agudo) fue inicialmente monitoreado por observación directa de las alteraciones morfológicas y por el ensayo de exclusión de colorante azul tripán. Para esto último, 50 μ l del colorante fueron adicionados en cada pozo y se cuantificaron las células viables y no viables en 5 campos microscópicos (Mamani et al., 2004). Células no tratadas con el producto fueron incorporadas por triplicado en cada ensayo. La concentración del producto requerida para inducir un 50% de efectos citotóxicos (CC_{50}) fue calculada empleando el Microsoft Excel para regresión lineal y expresada como la media aritmética ± 1 DS, de por lo menos tres ensayos independientes realizados cada uno por triplicado (De Logu & Loy, 2000; Cheng et al., 2002).

Adicionalmente, el efecto citotóxico de *O. soehrensii* fue evaluado por el ensayo de reducción del MTT (Rodríguez, 1997), en cultivos de linfocitos humanos (2×10^6 /ml) y en monocapas de células BHK-21 (3×10^5 /ml). Ambos tipos celulares fueron cultivados en policubetas de 96 pozos con diferentes concentraciones del producto (0,21 - 21 mg/ml) por 24, 48 y 72 horas. (Xu, 1999). Los resultados fueron expresados en porcentaje de viabilidad proporcional al porcentaje de reducción de la sal de tetrazolio por los cultivos tratados en referencia a los cultivos no tratados con el producto (Buttke, 1993; Serkedjieva & Ivancheva, 1999; Barrio & Parra, 2000; De Logu & Loy, 2000).

4.6. Evaluación de la actividad antiviral de *O. soehrensii*.

La actividad antiviral de *O. soehrensii* fue evaluada utilizando el modelo de infección *in vitro* del VHS-2 en células BHK-21. Como todo proceso de infección viral es el producto de la interacción del agente infeccioso y el huésped celular; en este trabajo se exploró la actividad biológica de *O.*

soehrensii por un lado, durante el proceso de infección (VHS: células: *O. soehrensii*) y el efecto en el huésped celular previo a la infección viral. No se incluyeron estudios de actividad sobre el agente infeccioso, debido a que estudios previos demostraron ausencia de actividad virucida (Mamani et al., 2004).

Los monitores que permitieron evaluar la actividad antiviral de *O. soehrensii* fueron el ensayo de reducción de la infectividad (RIV-MTT), el ensayo de reducción de efectos citopáticos (RECP) y el ensayo de reducción de placas de lisis (PRA) (Burleson, 1992; Anónimo, 1997; Kott et al., 1999; Cotarelo et al., 1999; Hodinka & Swierkosz, 2000; Leary et al., 2002; Hassan Khana et al., 2005).

4.6.1. Evaluación de la actividad de *O. soehrensii* durante el proceso de infección activa.

4.6.1.1. Evaluación de la actividad de *O. soehrensii* sobre las etapas iniciales de la cinética de infección viral.

Células BHK-21 (3×10^5 /ml) fueron infectadas con 50 μ l de una dilución que corresponde a 100 TCID₅₀ del *stock* viral en presencia del producto (0,21 - 21 mg/ml) (0h) o seguido de la adición del producto a intervalos de 1, 2, 3 y 6 h después de la infección. A las 48 horas de cultivo la actividad antiviral fue evaluada por RIV-MTT. Como controles positivos se incorporaron en triplicado, células infectadas y cultivadas en ausencia del producto y como controles negativos células no infectadas y no tratadas con el producto (Cheng et al., 2002; Chiang et al., 2002; Chiang et al., 2003; Hernández & Nieves, 2002).

4.6.1.2. Evaluación de la actividad de *O. soehrensii* sobre el proceso de adsorción viral.

Células BHK-21 (3×10^5 /ml) previamente atemperadas a 4 °C por 1 hora, fueron infectadas con 50 μ l de una dilución que corresponde a 100 TCID₅₀ (100 ufp/ml) del *stock* viral en presencia del producto a diferentes concentraciones (0,021 - 21 mg/ml) a 4 °C por 1 hora. Luego de este periodo el virus no adsorbido y el producto fueron descartados por lavados con PBS y las células cultivadas por 48 horas; la actividad antiviral fue evaluada por RIV-MTT y PRA. Células infectadas en ausencia del producto (controles positivos) y células no infectadas y no tratadas con el producto (controles negativos) fueron incluidas en cada ensayo por triplicado (De Logu & Loy, 2000; Cheng et al., 2002; Hernández & Nieves, 2002).

4.6.1.3. Evaluación de la actividad de *O. soehrensii* sobre el proceso de penetración viral.

Células BHK-21 (3×10^5 /ml) previamente atemperadas a 4 °C por 1 hora fueron infectadas con 50 µl de una dilución que corresponde a 100 TCID₅₀ (100 ufp/ml) del *stock* por 1 hora a 4 °C, luego el virus fue descartado por lavados con PBS y diluciones en serie del producto (0,021 - 21 mg/ml) fueron adicionadas a los cultivos por 1 hora a 37 °C, temperatura que permite maximizar la penetración viral. Pasado este periodo el virus no penetrado fue inactivado por adición de PBS a pH 3 por 1 minuto, luego el medio fue neutralizado con PBS a pH 11 y las células se cultivaron por 48 horas; la actividad antiviral fue evaluada por RIV-MTT y PRA. Como en los anteriores ensayos, células infectadas en ausencia del producto (controles positivos) y células no infectadas y no tratadas con el producto (controles negativos) fueron incluidas en cada ensayo por triplicado (De Logu & Loy, 2000; Cheng et al., 2002; Hernández & Nieves, 2002).

4.6.1.4. Evaluación de la actividad antiviral de *O. soehrensii* después de la infección viral.

Células BHK-21 (3×10^5 /ml) fueron infectadas a 37 °C con 50 µl de una dilución que corresponde a 100 TCID₅₀ (100 ufp/ml) del *stock* viral por 1 hora a 37 °C, luego el inoculo viral fue eliminado por lavados con PBS y las células cultivadas con el producto (0.0021 - 21mg/ml) por períodos de 48 y 72 horas. Células infectadas pero no tratadas con el producto (controles positivos) y células no infectadas y no tratadas con el producto (controles negativos) fueron incluidas en cada ensayo por triplicado; la actividad antiviral fue evaluada por RIV-MTT, RECP y PRA (Xu, 1999; Serkedjieva & Ivancheva, 1999; Barrio & Parra, 2000; De Logu & Loy, 2000; Chiang et al., 2002; Cheng et al., 2002).

4.6.2. Evaluación de la actividad protectora antiviral de *O. soehrensii* en las células blanco de infección.

4.6.2.1. Evaluación de la infección viral en células pretratadas con *O. soehrensii*.

Monocapas de células BHK-21 (3×10^5 /ml) fueron tratadas con diluciones en serie del producto (0.0021 - 21mg/ml) por períodos de 24 y 48 horas previos a la infección viral. Luego del tratamiento, el producto vegetal fue descartado por lavados exhaustivos con PBS y las células fueron infectadas con 50 µl de una dilución que corresponde a 100 TCID₅₀ (100 ufp/ml) del *stock* viral y fueron cultivados por 48 horas. Controles de infección positivos (células infectadas pero no pretratadas previamente con

el producto) y controles negativos (células no infectadas y no pretratadas) fueron incluidas en cada ensayo por triplicado; la actividad antiviral fue evaluada por RIV-MTT, RECP y PRA.

Posteriores ensayos destinados a determinar el tiempo mínimo de pretratamiento suficiente para evidenciar actividad biológica, fueron realizados con tiempos de tratamiento de 1, 3, 6 y 24 horas previas a la infección viral. La actividad protectora se evaluó como se describió anteriormente por RIV-MTT.

4.6.2.2. Evaluación del mecanismo de protección antiviral.

La capacidad de prevenir la infección por VHS-2 como efecto del pretratamiento con *O. soehrensii* fue evaluada *a)* utilizando el sobrenadante de cultivo proveniente de células pretratadas con el producto y *b)* utilizando el sobrenadante del lisado de células pretratadas con el producto. Para esto, células BHK-21 (3×10^5 /ml) cultivadas en policubetas de 24 pozos fueron pretratadas con el producto vegetal (0.021 - 2.1 mg/ml) por 48 horas. Luego los cultivos fueron lavados exhaustivamente con PBS para eliminar el producto vegetal remanente y cultivados adicionalmente por 48 horas con medio de cultivo en ausencia del producto, al cabo de este tiempo los sobrenadantes fueron colectados y conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su evaluación. Paralelamente, células pretratadas en las mismas condiciones, luego de ser lavadas, para eliminar el producto, fueron lisadas por períodos de congelación ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y descongelación ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) sucesivas (3X), los detritos celulares fueron descartados por centrifugación a 1000 rpm por 5 minutos y los sobrenadantes colectados y conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La actividad protectora antiviral por pretratamiento de 48 horas se evaluó por RIV-MTT y RECP, de modo similar al que se describió en el acápite 4.6.1.4.

4.6.3. Monitores para la evaluación de la inhibición de la infección viral mediada por *O. soehrensii*.

La inhibición de *O. soehrensii* sobre la infección por VHS-2 fue evaluada utilizando monitores biológicos que permiten evaluar potenciales productos antivirales *a)* RIV-MTT, *b)* RECP y *c)* PRA.

a) El ensayo de Reducción de la Infectividad Viral por el ensayo del MTT (RIV-MTT). Consistió en cuantificar las modificaciones de la actividad enzimática celular producto de la infección viral en cultivos infectados tratados con el producto vegetal y en cultivos tratados con el producto previo a la

infección. La actividad antiviral fue calculada según la siguiente fórmula: $(DO_{vt}-DO_{vc})/(DO_{cc}-DO_{vc}) \times 100\%$. Donde, DO_{vt} indica la densidad óptica de los cultivos tratados con el producto; DO_{vc} y DO_{cc} indican la densidad óptica del control positivo de infección y el control negativo, respectivamente.

b) El ensayo de Reducción del Efecto citopático (RECP), consistió en determinar la reducción de los efectos citopáticos inducidos por el virus en cultivos infectados tratados con el producto vegetal y en cultivos pretratados con el producto. La cuantificación de este efecto se realizó de acuerdo a los parámetros citados en la tabla 4 (acápito 4.4.1) y la actividad antiviral fue calculada según la siguiente fórmula: $(ECP_v - ECP_{vt})/(ECP_{vc} - ECP_{cc}) \times 100\%$. Donde, ECP_{vt} indica el efecto citopático observado en cultivos tratados con el producto; ECP_{vc} y ECP_{cc} indican el efecto citopático observado en el control positivo de infección y el control negativo, respectivamente.

c) El ensayo de Reducción de Placas de Lisis (PRA), consistió en evaluar la reducción en el número de placas virales como resultado del tratamiento con el producto vegetal de cultivos infectados y cultivos tratados previo a la infección ($No.P_{vt}$) en referencia a las placas formadas en cultivos infectados no tratados (controles positivos) ($No.P_{vc}$). La actividad antiviral fue calculada según la siguiente fórmula: $1 - [(No.P_{vt})/(No.P_{vc})] \times 100$.

4.7. Análisis Estadístico.

La concentración efectiva media (CE_{50}), requerida por un lado, para reducir la infección viral en un 50% o proteger los cultivos contra la infección en un 50%, fue calculada empleando Microsoft Excel para regresión lineal y expresada como la media aritmética ± 1 Desviación Estándar (DS), de por lo menos tres ensayos independientes realizados cada uno por triplicado. El índice selectivo (IS), la relación de actividad tóxica y la actividad antiviral de *O. soehrensii*, se determinó por división de la concentración citotóxica media y la concentración efectiva media (CC_{50}/CE_{50}). El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para contrastar la diferencia de medias de cada tratamiento y la significancia estadística entre los tratamientos comparados con el grupo control fue determinada por la prueba *t* (student's *t-test*) con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$, el paquete estadístico empleado fue el SPSS 14.0.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de la cepa viral.

5.1.1. Identificación del virus.

El virus Herpes simplex VHS-LV11 utilizado en este estudio, cepa nativa circulante en nuestro medio, fue identificado y tipificado por inmunofluorescencia directa. La figura 7 muestra un patrón de fluorescencia nuclear positivo para VHS-2.

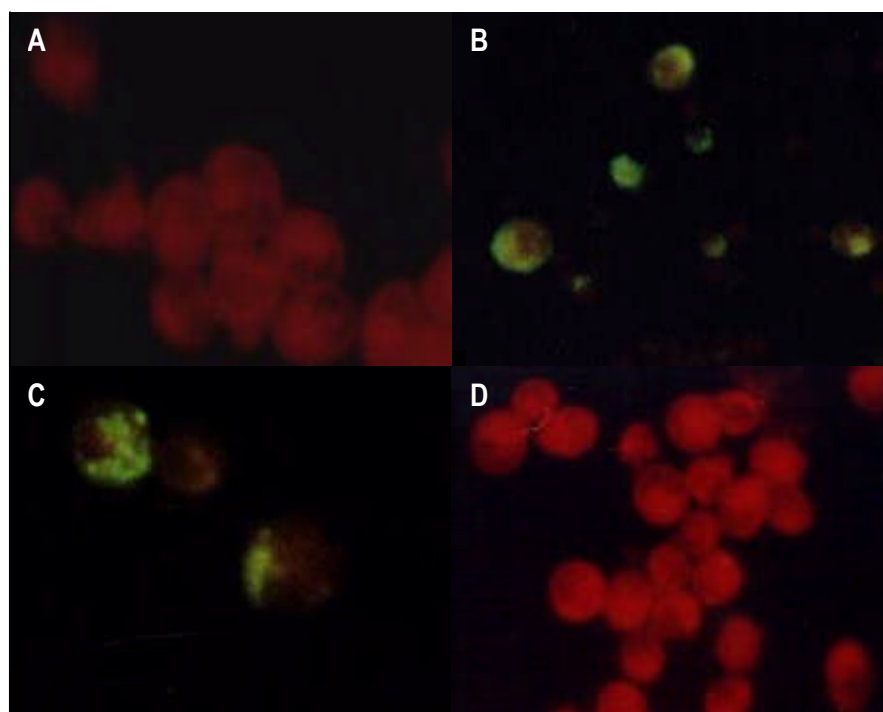


Figura 7. Identificación y Tipificación por Inmunofluorescencia directa de la cepa de laboratorio VHS-LV11. Células BHK-21 infectadas con la cepa nativa de VHS al cabo de 72 horas de cultivo, fueron cosechadas y preparadas en portaobjetos para su análisis por inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales para reconocer antígenos de VHS-1 (A) ó VHS-2 (B). Como controles, se utilizaron placas con células infectadas, provistas por el fabricante (C); placas con células no infectadas (D) fueron también incorporadas.

Adicionalmente, estos resultados se confirmaron por PCR-ELISA en el que se obtuvo valores altos de densidad óptica, en los pocillos que contenían sondas, para la identificación del VHS-2.

5.1.2. Titulación viral.

La cuantificación del inóculo viral, es un paso básico importante previo a los ensayos de evaluación del producto como agente antiviral anti-VHS; a partir de la cuantificación del virus se define la proporción de virus con respecto al número de células para cada sistema en particular, esta relación es fundamental para el desarrollo del proceso infeccioso en condiciones controladas y reproducibles para cada determinación. De este modo, la visualización microscópica de los efectos citopáticos generados por el virus en los cultivos infectados, permitió realizar una cuantificación porcentual de los mismos en comparación con los controles no infectados (Figura 8), y de este modo calcular el TICD₅₀/ml por el método de Reed y Muench.

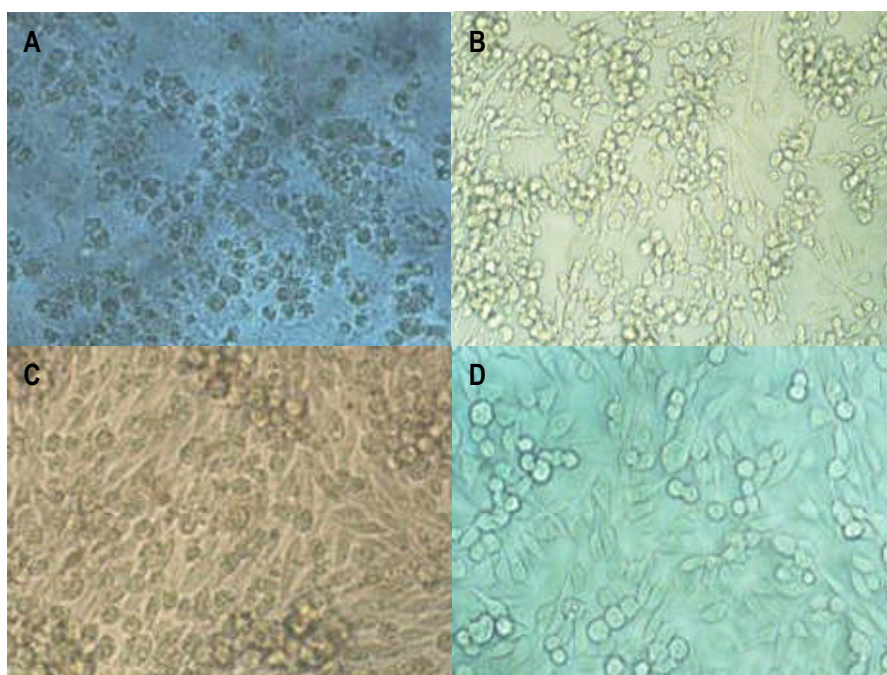


Figura. 8. Efecto citopático producto de la infección por VHS-2. Observación microscópica (aumento 20X) de células BHK-21 infectadas con diferentes diluciones de la cepa viral 10^{-1} (A), 10^{-3} (B), 10^{-6} (C) y células no infectadas (D).

En la figura 8 se observan los efectos citopáticos inducidos debido a la infección viral, en comparación a la ausencia de efectos citopáticos en el panel D, de células no infectadas. En el panel A, células infectadas con una dilución 10^{-1} del stock viral, se observa una destrucción total de la monocapa celular, con pérdida de la adherencia celular, presencia de inclusiones y vacuolas citoplasmáticas. Este efecto disminuye a medida que se diluye la carga viral (diluciones 10^{-3} y 10^{-6} , paneles B y C).

De acuerdo con estas observaciones y el método de Reed y Muench se encontró que la dilución del virus requerida para infectar los cultivos en un 50% fue de $10^{-8,07}$ /ml. Esta determinación fue complementada por el ensayo de reducción del MTT que permitió correlacionar los efectos citopáticos observados microscópicamente con el porcentaje de viabilidad remanente posterior a la infección viral (Figura 9).

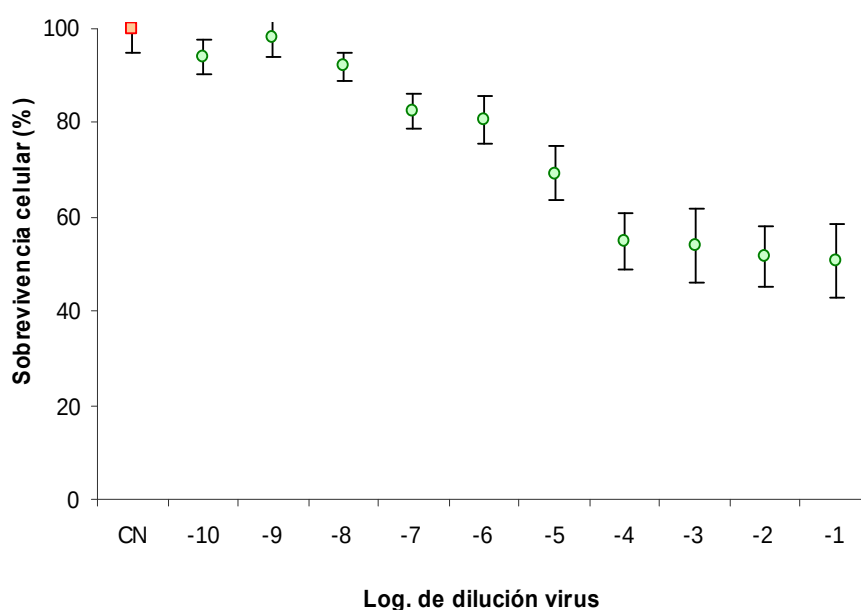


Figura 9. Sobrevivencia celular luego de la infección por VHS-2. Células BHK-21 fueron infectadas con diluciones en serie de la cepa viral, la sobrevivencia celular fue determinada por el ensayo de reducción del MTT en referencia a controles de células no infectadas. Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

En la figura 9 se observa una disminución del porcentaje de sobrevivencia celular a medida que la concentración del virus se incrementa, llegando a alcanzar valores cercanos al 50% de sobrevivencia celular en la máxima concentración del virus empleada.

Por otro lado, debido a que la actividad biológica del producto vegetal fue también estudiada en el modelo de reducción de placas virales, el título viral también fue determinado en el mismo sistema. Se determinó que la dilución del virus requerida para formar placas virales contables, entre 80 a 100 placas fue de 10^{-6} , dilución con la que se obtuvo en promedio de tres experimentos un título de $9,7 \times 10^7$ ufp/ml.

Para los ensayos de actividad antiviral la dilución del virus empleada correspondía a 100 veces el $TICD_{50}$, que corresponde a una dilución 10^{-6} del stock viral, dilución que a su vez es óptima para obtener placas virales contables en el modelo de reducción de placas virales.

5.2. Efecto biológico de *O. soehrensii* sobre sistemas de cultivo celular.

5.2.1. Efecto de *O. soehrensii* sobre la viabilidad de células BHK-21.

Los estudios diseñados para evaluar un producto con posible actividad farmacológica antiviral deben considerar e inicialmente descartar, efectos citotóxicos en el huésped celular que, indirectamente, podrían influir en el resultado final. Así, células infectadas en presencia de un agente tóxico celular, no podrían sostener una replicación viral activa y por consiguiente se obtendrían resultados falso-positivos de actividad antiviral (Anónimo, 1997; Jassim & Naji, 2003; Wood, 2003).

De acuerdo con esto, se diseñaron ensayos destinados a determinar el posible efecto tóxico de *O. soehrensii* sobre los sistemas de cultivo celular, susceptibles a la infección por VHS-2. Para esto, diferentes concentraciones de células BHK-21, fueron incubadas con el producto por diferentes periodos de tiempo (Figura 10). Se observó un efecto citotóxico claramente dependiente de la concentración del producto y del tiempo de exposición; también se pudo apreciar que el grado de toxicidad varía en función de la densidad celular puesta en cultivo. Como se había anticipado, el efecto tóxico es evidente en concentraciones mayores a 0,21 mg/ml del producto en cultivos con menor densidad celular, mientras que se requieren 42 mg/ml del producto para inducir un efecto tóxico en cultivos con mayor concentración celular.

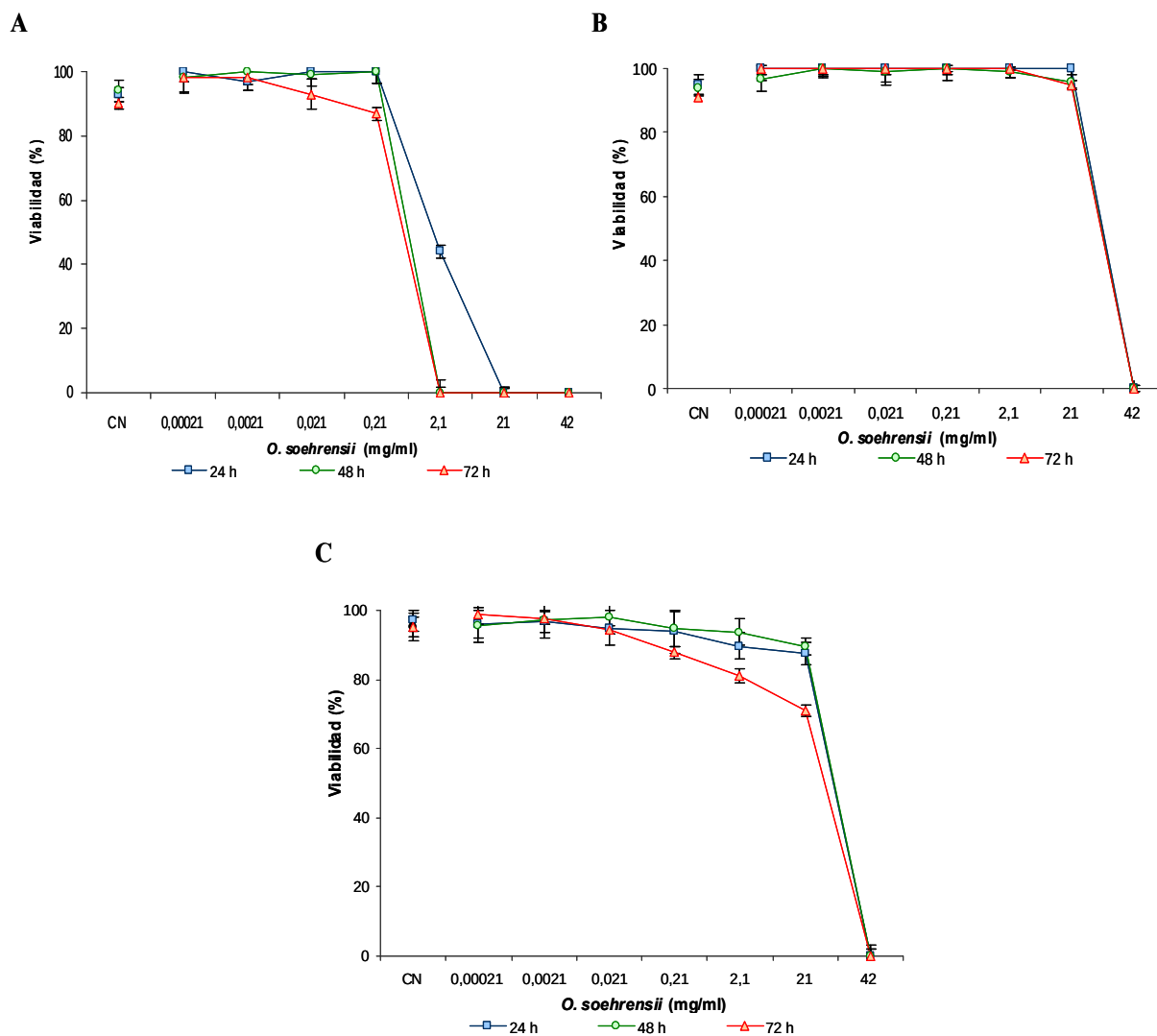


Figura 10. Efecto de *O. soehrensii* sobre la viabilidad de células BHK-21. Células BHK-21 a 5×10^4 /ml (A), 3×10^5 /ml (B) y 1×10^6 /ml (C), fueron cultivadas con el producto vegetal por 24, 48 y 72 horas. El porcentaje de viabilidad celular se determinó por ensayo de exclusión de colorante azul tripán. Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

El monitoreo microscópico del efecto tóxico, concuerda claramente con los resultados sobre la viabilidad, determinada por el ensayo de exclusión de colorante vital. En la figura 11 se puede observar una comparación entre ambos métodos, en cultivos expuestos al producto.

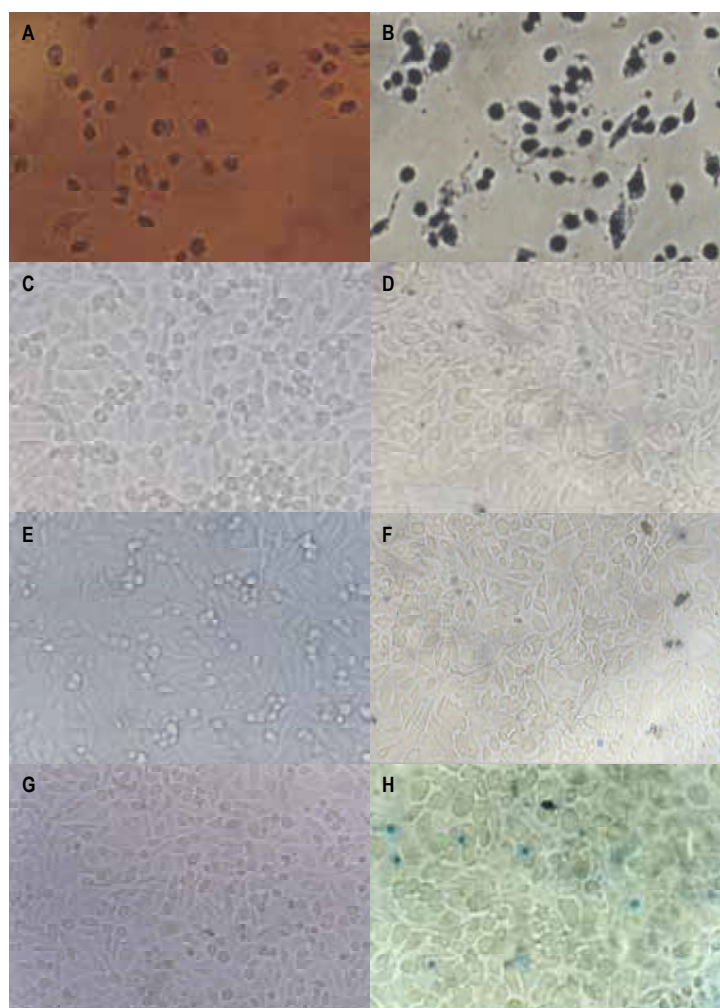


Figura 11. Visualización microscópica del efecto biológico de *O. soehrensii* sobre cultivo de células BHK-21. Células BHK-21 ($3 \times 10^5/\text{ml}$) fueron cultivadas con 42 mg/ml (A y B), 21 mg/ml (C y D) y 2,1 mg/ml (E y F) del producto vegetal por 48 horas. En el panel derecho se muestra la observación microscópica (aumento 20X) y en el panel izquierdo la viabilidad celular determinada por ensayo de exclusión de colorante azul tripán. G y H controles negativos respectivos.

En el panel derecho se observa la morfología de los cultivos expuestos al producto. Existe pérdida total de la monocapa celular en cultivos expuestos a la máxima concentración del producto (42 mg/ml, A). Mientras que no se observan alteraciones morfológicas en cultivos tratados con menores concentraciones (C y E). Esta observación se correlaciona con el ensayo de exclusión de colorante azul

tripán (panel izquierdo), donde células que adquirieron el colorante, citoplasma azul, son células no viables, mientras que las que permanecen refringentes reflejan la viabilidad del cultivo.

Adicionalmente, se determinó la concentración citotóxica media (CC_{50}) del producto vegetal sobre células BHK-21, para establecer con mayor precisión las condiciones óptimas para el estudio de la actividad biológica *in vitro* de *O. soehrensii*. Para esto, se realizaron diluciones intermedias del producto vegetal entre un rango de concentraciones, particular para cada concentración de células en estudio. La figura 12 muestra el efecto del producto en las diferentes condiciones de cultivo.

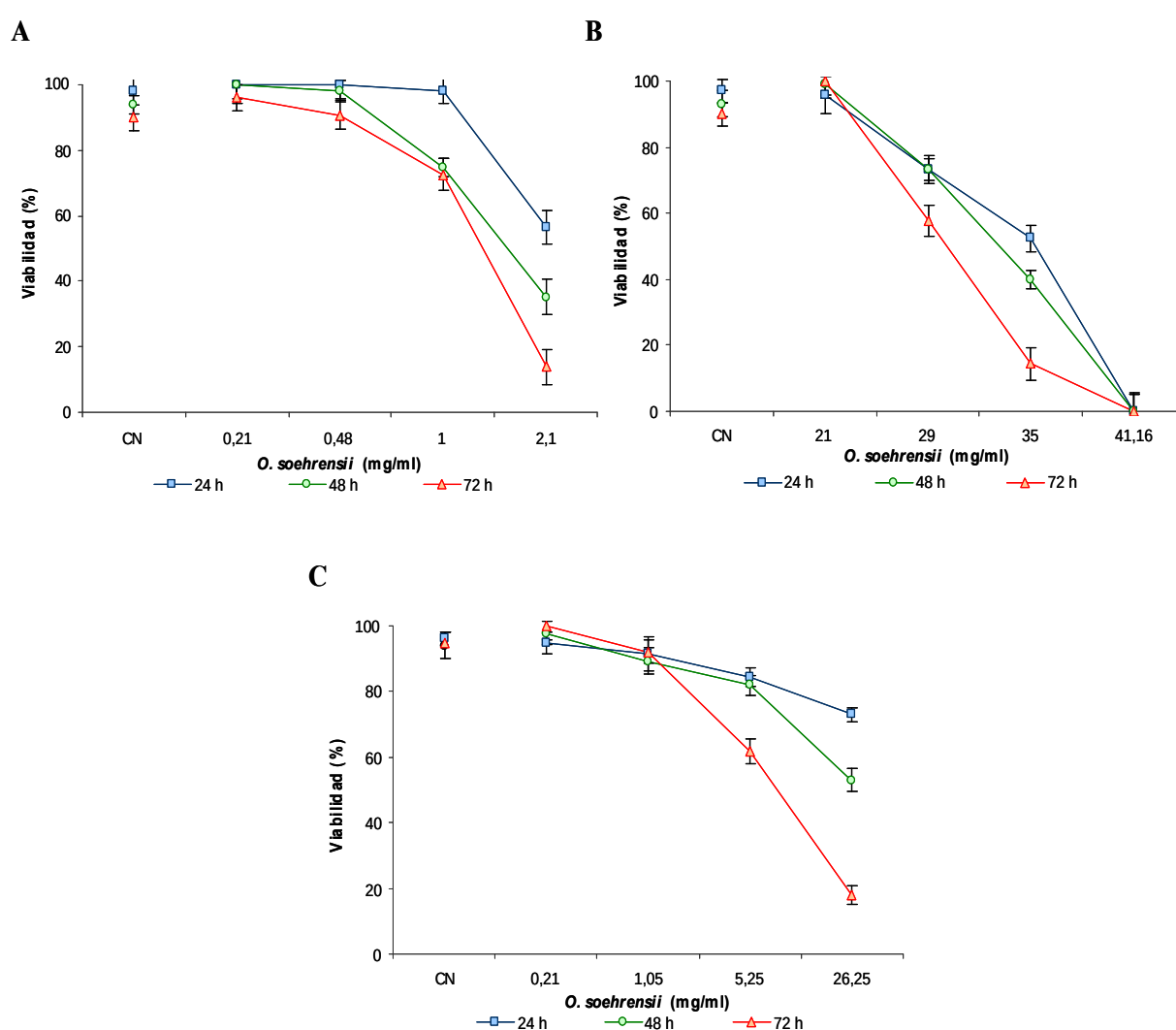


Figura 12. Determinación de la concentración citotóxica al 50% de *O. soehrensii* sobre cultivo de células BHK-21. Células BHK-21 a 5×10^4 /ml (A), 3×10^5 /ml (B) y 1×10^6 /ml (C), fueron cultivadas con diluciones intermedias del producto vegetal por

24, 48 y 72 horas. El porcentaje de viabilidad celular se determinó por ensayo de exclusión de colorante azul tripán. Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

Para cada sistema con diferente densidad celular, expuestos con el producto por 24 y 48 horas, se observó una disminución gradual dosis dependiente, debido a las diluciones empleadas, permitiendo así calcular la concentración citotóxica media por regresión lineal. Para un tiempo de exposición prolongado (72 horas), la saturación del cultivo sobredimensionó el efecto tóxico propio del producto, por lo que no se calcularon las CC_{50} para estos cultivos. Las CC_{50} en función al tiempo de exposición al producto se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Concentración citotóxica media *O. soehrensii* en cultivo de células BHK-21.

Densidad celular/ml	Concentración citotóxica media CC_{50} (mg/ml) ^a		
	Tiempo (h)		
	24	48	72
5 x 10 ⁴	2,41 $\pm$ 0,10	1,60 $\pm$ 0,04	1,31 $\pm$ 0,007 ^b
3 x 10 ⁵	35,70 $\pm$ 0,41	31,44 $\pm$ 0,56	ND ^b
1 x 10 ⁶	52,46 $\pm$ 0,30 ^c	26,27 $\pm$ 0,43	ND ^b

^a Valores expresados como la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado

^b Viabilidad del cultivo comprometida tanto en cultivos tratados y no tratados debido a la saturación del mismo por proliferación celular.

^c Valor obtenido por progresión de la regresión lineal.

De acuerdo con estos resultados, los estudios posteriores se desarrollaron utilizando cultivos con densidad celular de 3x10⁵/ml, en los que se evidencia ausencia de efecto citotóxico de *O. soehrensii* hasta una concentración de 21mg/ml, en cultivos continuos de hasta 72 horas.

El efecto tóxico de *O. soehrensii* fue adicionalmente determinado utilizando el ensayo de reducción del MTT, que permitió evaluar la viabilidad celular por medición de la actividad de las enzimas oxido-

reductoras, principalmente de enzimas mitocondriales, responsables de la reducción del MTT a cristales de Formazán (Berridge & Tan, 1996). La figura 13 muestra que el efecto sobre la viabilidad celular es mínimo, con valores próximos al 85% de viabilidad a una concentración de 21 mg/ml y 72 horas de exposición.

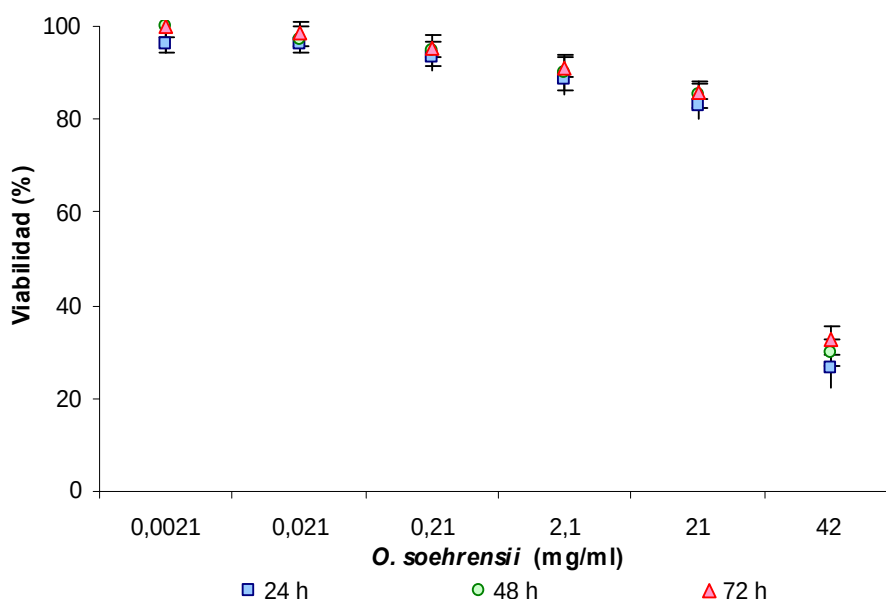


Figura 13. Efecto citotóxico de *O. soehrensii* sobre células BHK-21 evaluado por ensayo de reducción del MTT. Células BHK-21 fueron cultivadas con diferentes concentraciones del producto vegetal por 24, 48 y 72 horas. La viabilidad celular se determinó por ensayo de Reducción del MTT en referencia a los controles cultivados en ausencia del producto. Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

En el marco de los estudios de toxicidad *in vitro* de productos con actividad antiviral, la evaluación del efecto tóxico sobre sistemas de cultivo primarios es un parámetro importante que permite completar el perfil de toxicidad para su posterior uso terapéutico en ensayos *in vivo* (Anónimo, 1997; Cos et al., 2006). Con base en lo anteriormente citado, se evaluó también el efecto tóxico de *O. soehrensii* sobre cultivos de linfocitos humanos provenientes de sangre periférica. Para esto, linfocitos humanos fueron cultivados con el producto vegetal por 24, 48 y 72 horas y el efecto citotóxico evaluado por ensayo de reducción del MTT (Figura 14).

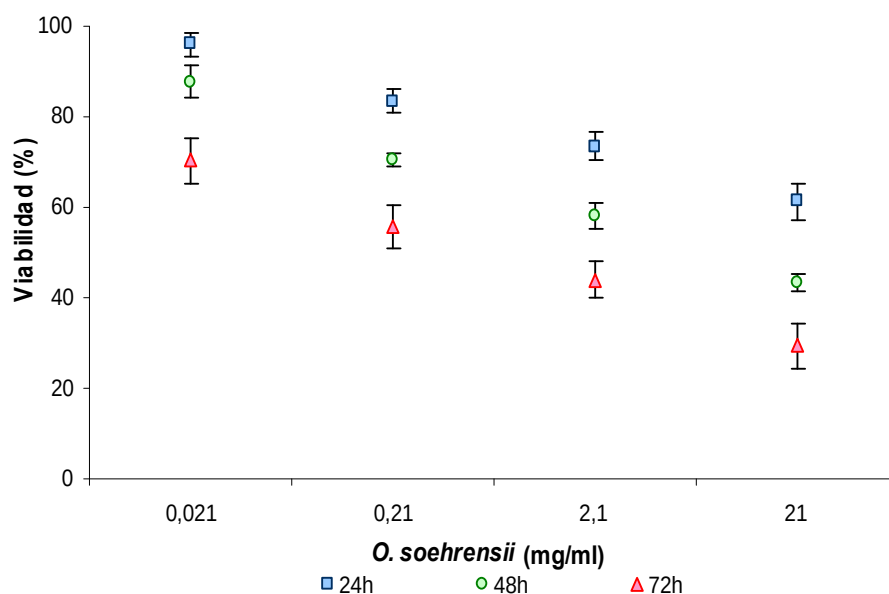


Figura 14. Efecto citotóxico de *O. soehrensii* sobre cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica. Linfocitos humanos (2×10^6 /ml) fueron cultivados con el producto vegetal por 24, 48 y 72 horas. La viabilidad celular se determinó por ensayo de Reducción del MTT en referencia a los controles cultivados en ausencia del producto vegetal. Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de dos experimentos independientes realizados cada uno por triplicado, con células provenientes del mismo donador.

Como se había anticipado, el producto vegetal presenta un mayor efecto tóxico concentración-dependiente en un cultivo primario. A 21 mg/ml del producto vegetal, dosis no tóxica en los ensayos con células BHK-21, los cultivos de linfocitos humanos presentan solo un 61% de viabilidad en relación a los controles negativos a 24 horas de exposición; este efecto tóxico es proporcional al tiempo de exposición.

5.3. Actividad antiviral de *O. soehrensii* durante el proceso de infección activa de VHS-2.

5.3.1. Inhibición de las etapas tempranas de la infección viral de VHS-2 por *O. soehrensii*.

Como se describió en el capítulo correspondiente al Marco teórico (3.1.3), el proceso de infección de VHS es complejo. En términos básicos, en el ciclo replicativo lítico que ocurre *in vitro*, se distinguen las fases de adherencia, penetración, replicación del ADN, ensamblaje y brote de partículas virales.

Con la evidencia de que *O. soehrensii* es capaz de inhibir la infección activa de VHS (Mamani et al., 2004), se exploró la posibilidad de identificar la fase del ciclo replicativo en la que interviene el producto vegetal. Para esto, se diseñaron experimentos de infección con adición del producto vegetal a diferentes tiempos a lo largo del ciclo replicativo viral; se tomó como tiempo cero la adición concomitante del extracto y del virus a los cultivos celulares, infección en presencia del producto, y la adición posterior del producto a diferentes periodos después de la infección.

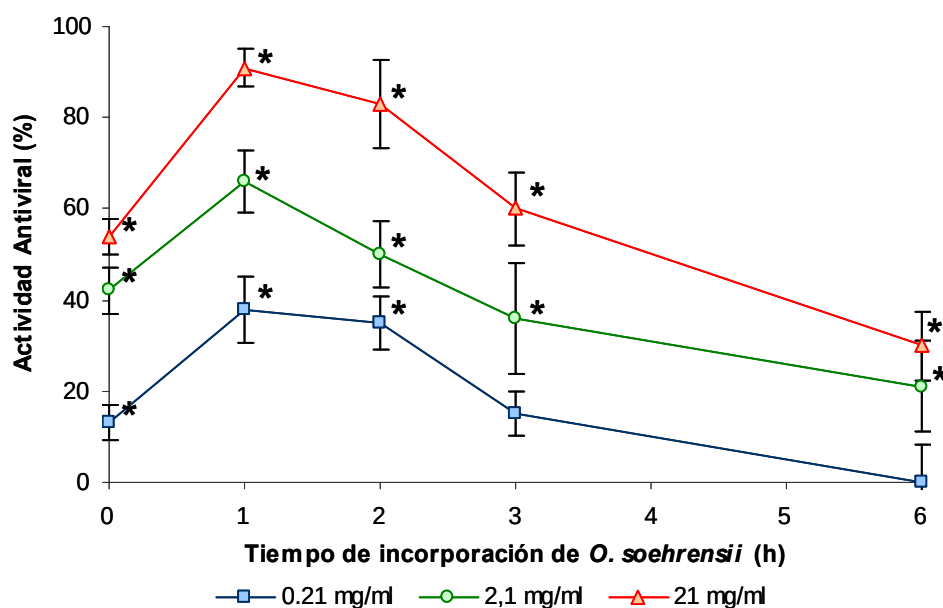


Figura 15. Cinética de infección de VHS-2 en presencia de *O. soehrensii*. Células BHK-21 fueron infectadas con VHS-2 en presencia del producto vegetal (0 h), ó el producto fue adicionado a 1, 2, 3 y 6 horas después de la infección. La actividad antiviral fue determinada por ensayo de Reducción de la Infectividad viral-MTT (RIV-MTT). Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. El asterisco indica diferencia significativa entre el tratamiento con el producto y el control no tratado ($p \leq 0,05$).

Como se observa en la figura 15, el tratamiento con 21 mg/ml del producto a tiempo cero produce una reducción de la infección mayor al 50 %, mientras que la adición del producto 1 hora después de la infección con VHS-2 reduce el 91% de la infección. Luego de este tiempo la actividad antiviral tiende a disminuir a medida que la adición del producto se retrasa.

Sobre la base de estos resultados que indican que *O. soehrensii* ejerce efecto anti-VHS-2 en etapas tempranas de la infección viral, se exploró el efecto antiviral durante los dos eventos tempranos de la replicación viral: la adsorción y la penetración viral. La figura 16, muestra el efecto del producto vegetal sobre la adsorción (A) y penetración (B) de VHS-2 en células BHK-21 (ver Materiales y Métodos). Se muestra un efecto mínimo sobre la adsorción viral (produce alrededor de un 35% de inhibición viral), mientras que *O. soehrensii* ejerce mayor actividad sobre la penetración viral con un efecto de hasta el 80% de inhibición medida por RIV-MTT y un 77% de inhibición por PRA.

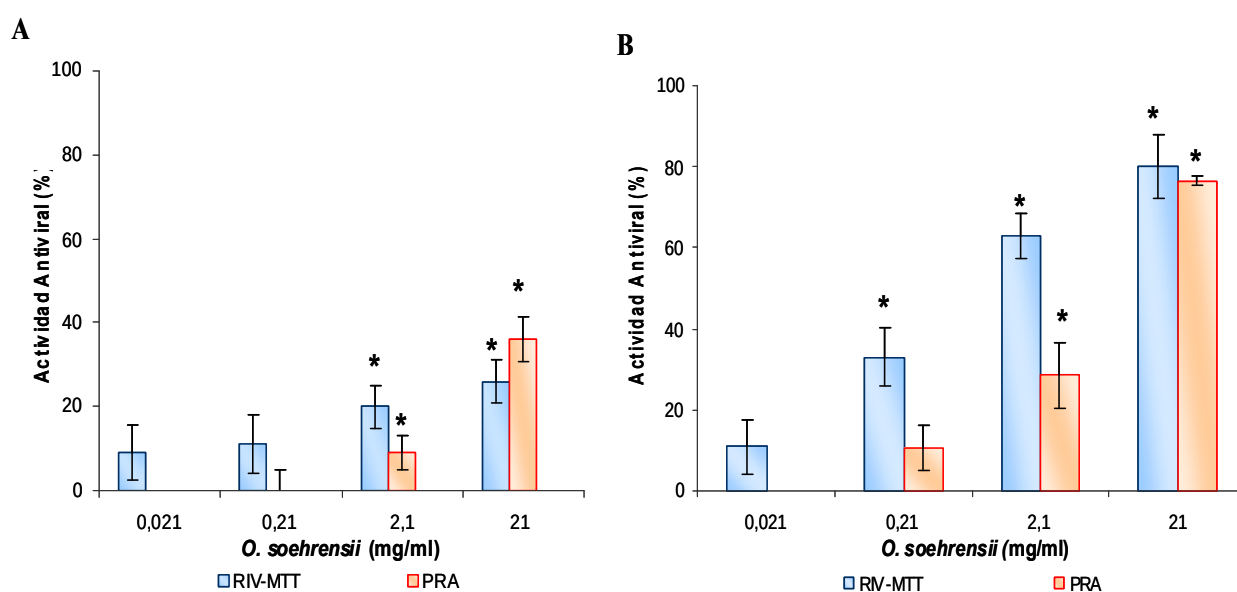


Figura 16. Efecto de *O. soehrensii* sobre la adsorción y penetración de VHS-2.

(A) Células BHK-21 fueron infectadas con VHS-2 en presencia del producto vegetal por 1 hora a 4°C, luego el remanente de virus no adsorbido fue descartado por lavados con PBS y las células cultivadas por 48 horas. (B) A células BHK-21 infectadas previamente con VHS-2 por 1 hora a 4°C, se adicionó el producto vegetal por 1 hora a 37 °C, luego el remanente de virus no penetrado fue eliminado por adición de PBS a pH 3 por 1 minuto (la neutralización del medio se realizó adicionando PBS pH 11) y las células fueron posteriormente cultivadas por 48 horas. La actividad antiviral contra la infección fue determinada por el ensayo de Reducción de la Infectividad viral-MTT (RIV-MTT) y el de Reducción de Placas de lisis (PRA). Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. El asterisco indica diferencia significativa entre el tratamiento y el control no tratado ($p \leq 0,05$).

5.3.2. Actividad antiviral de *O. soehrensii* después de la infección de VHS-2.

La actividad antiviral de *O. soehrensii* después de la infección de VHS-2 fue también evaluada en períodos prolongados de exposición, 48 y 72 horas. En este modelo experimental, se encontró un efecto antiviral concentración-dependiente con valores de inhibición de la replicación viral por encima del 85% a la máxima concentración evaluada (21 mg/ml), independientemente del ensayo aplicado RIV-MTT, RECP o PRA (Figura 17). El tratamiento de 48 horas fue seleccionado como suficiente para observar el efecto anti-VHS-2.

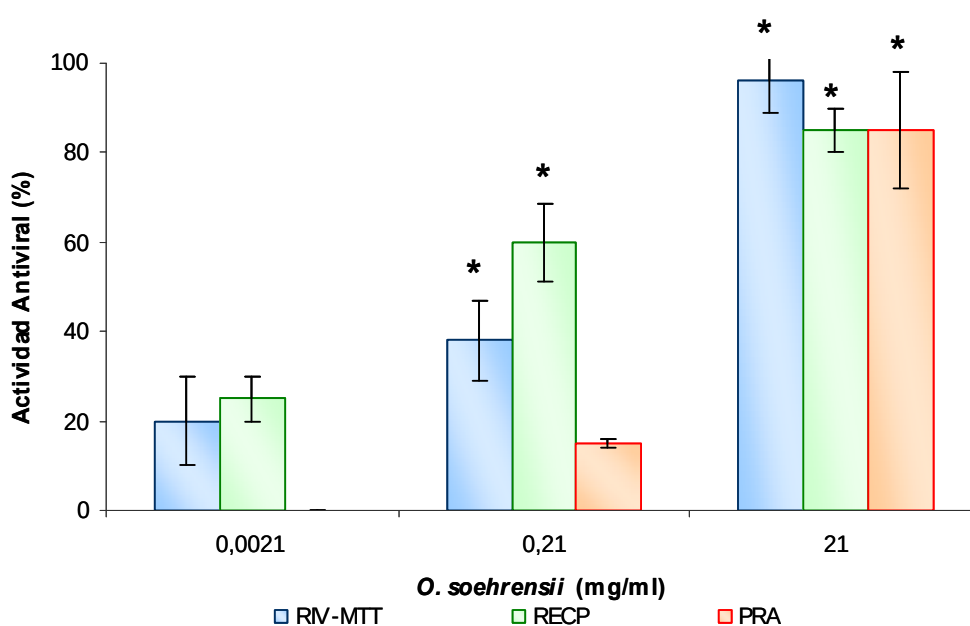


Fig. 17. Actividad antiviral de *O. soehrensii* después de la infección de VHS-2.

Células BHK-21 infectadas por 1 hora a 37°C con VHS-2 fueron cultivadas con el producto vegetal por 48 horas. El porcentaje de actividad antiviral fue determinado por los ensayos de Reducción de la Infectividad viral-MTT (RIV-MTT), Reducción del Efecto Citopático (RECP) y el de Reducción de Placas de lisis (PRA). Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. El asterisco indica diferencia significativa entre el tratamiento y el control no tratado ($p \leq 0,05$).

Los valores medios de actividad antiviral y el índice selectivo, de acuerdo al ensayo empleado y al periodo de tratamiento con el producto vegetal se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Actividad Antiviral media (CE₅₀) de *O. soehrensii* después de la infección de VHS-2 en cultivo de células BHK-21.

Tiempo de exposición (h)	Actividad Antiviral (mg/ml) ^a			Índice Selectivo ^b		
	RIV-MTT	RECP	PRA	RIV-MTT	RECP	PRA
48	6,70 ± 0,56	3,80 ± 0,07	12,0 ± 0,80	4,70	8,27	2,62
72	4,83 ± 0,46	2,45 ± 0,30	ND ^c	6,50	12,83	ND ^c

^a Valores expresados como la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

^b Índice Selectivo, concentración citotóxica media/actividad antiviral media (CC₅₀/CE₅₀).

^c ND, no determinado.

Los valores medios de actividad antiviral varían de acuerdo a la sensibilidad de cada ensayo y al tiempo de exposición al producto. La evaluación a 72 horas por PRA se realizó debido a que tiempo prolongados de cultivo permiten un mayor desarrollo de las placas virales, favoreciendo contacto entre ellas y dificultando la discriminación de cada una. Los valores de índice selectivo muestran que *O. soehrensii* ejerce su efecto en ausencia de efectos tóxicos para el huésped celular.

5.4. Actividad preventiva-protectora de *O. soehrensii* contra la infección de VHS-2.

En el estudio preliminar realizado en nuestro laboratorio, se observó que *O. soehrensii* presenta no solo actividad antiviral sobre células infectadas, sino que también ejerce actividad protectora contra la infección por VHS en el huésped celular; se demostró que al incubar células con el producto vegetal por 48 horas previas a la infección se inhibía la replicación del virus en un 30% (Mamani et al., 2004).

En el presente trabajo se caracterizó esta actividad mediante la evaluación de diferentes concentraciones del producto vegetal en función al tiempo de pretratamiento. Así, se evidenció una

actividad protectora celular proporcional a la concentración del producto; a 2.1 mg/ml de *O. soehrensii* se observó la máxima protección por los tres métodos utilizados en este estudio RIV-MTT, RECP y PRA (Figura 18).

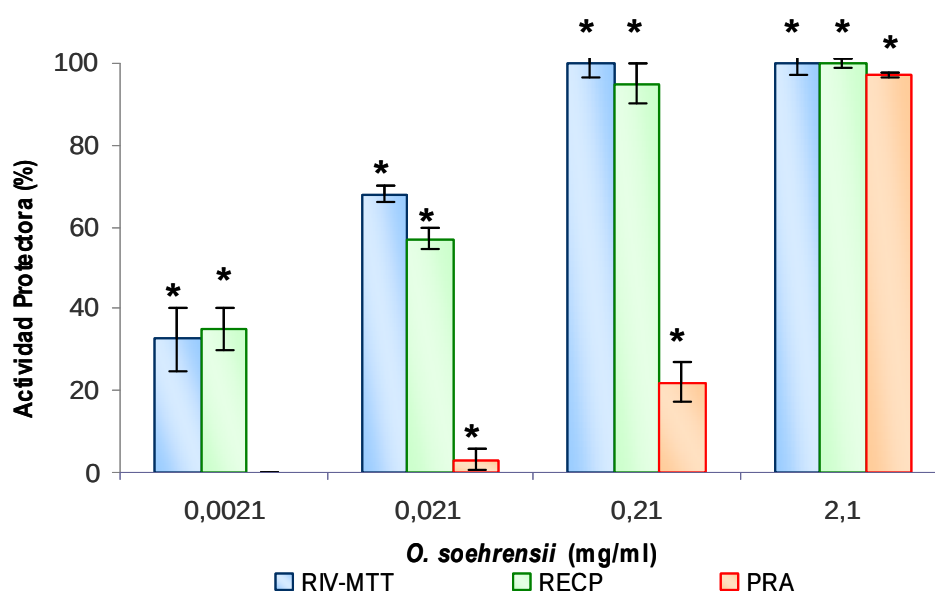


Figura 18. Actividad preventiva-protectora antiviral de *O. soehrensii* sobre células BHK-21. Células BHK-21 fueron cultivadas con diluciones en serie del producto vegetal por 48 horas, luego de este periodo el producto fue descartado por lavados con PBS y los cultivos se infectaron con VHS-2. La actividad protectora antiviral se determinó por el ensayo de Reducción de la Infectividad viral-MTT (RIV-MTT), Reducción del Efecto Citopático (RECP) y el de Reducción de Placas de lisis (PRA). Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. El asterisco indica diferencia significativa entre el pre-tratamiento con el producto y el control no tratado ($p \leq 0,05$).

Períodos de pretratamiento de las células de 24 y 48 horas confieren ambos la máxima protección a 2,1 mg/ml del producto vegetal. Períodos mayores de tratamiento no pueden evaluarse adecuadamente por la característica de cultivo continuo de las células huésped utilizadas en este modelo; así la viabilidad del cultivo se ve comprometida tanto en cultivos no infectados y no tratados como en cultivos tratados con el producto debido a la saturación del mismo por la proliferación celular. Los valores medios de protección antiviral y el índice terapéutico se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Actividad protectora media (CE₅₀) de *O. soehrensii* sobre el huésped celular contra la infección por VHS-2 en cultivo de células BHK-21.

Tiempo de pretratamiento (h)	Actividad Protectora (mg/ml) ^a			Índice Selectivo ^b		
	RIV-MTT	RECP	PRA	RIV-MTT	RECP	PRA
24	0,034 ± 0,01	0,10 ± 0,5	ND ^c	925	314	ND ^c
48	0,012 ± 0,02	0,029 ± 0,71	0,95 ± 0,11	> 2000	> 1000	33

^a Valores expresados como la media ⁺/ ⁻ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado.

^b Índice Selectivo, concentración citotóxica media/actividad protectora media (CC₅₀/CE₅₀).

^c ND, no determinado.

Los valores de protección antiviral media son proporcionales al tiempo de exposición al producto, siendo el pretratamiento por 48 horas el más eficiente. Los valores de índice selectivo reflejan una actividad protectora en completa ausencia de efectos tóxicos.

5.4.1. Condiciones del pretratamiento de células huésped con *O. soehrensii* para una efectiva protección antiviral.

Con el objetivo de determinar las condiciones mínimas de pretratamiento, que permiten evidenciar actividad protectora, se diseñaron ensayos que incorporaron el producto vegetal en períodos menores a 24 horas (Figura 19). Se evidenció que la actividad preventiva-protectora de *O. soehrensii* es claramente dependiente del tiempo de tratamiento. Así, dosis bajas o altas del producto vegetal exhiben actividad protectora limitada (5 a 25% de protección celular) si el pretratamiento se reduce a 1 hora antes de la infección. Del mismo modo, la actividad protectora se reduce al 71% si las células son preincubadas solo por tres horas con la mayor concentración del producto (2,1 mg/ml).

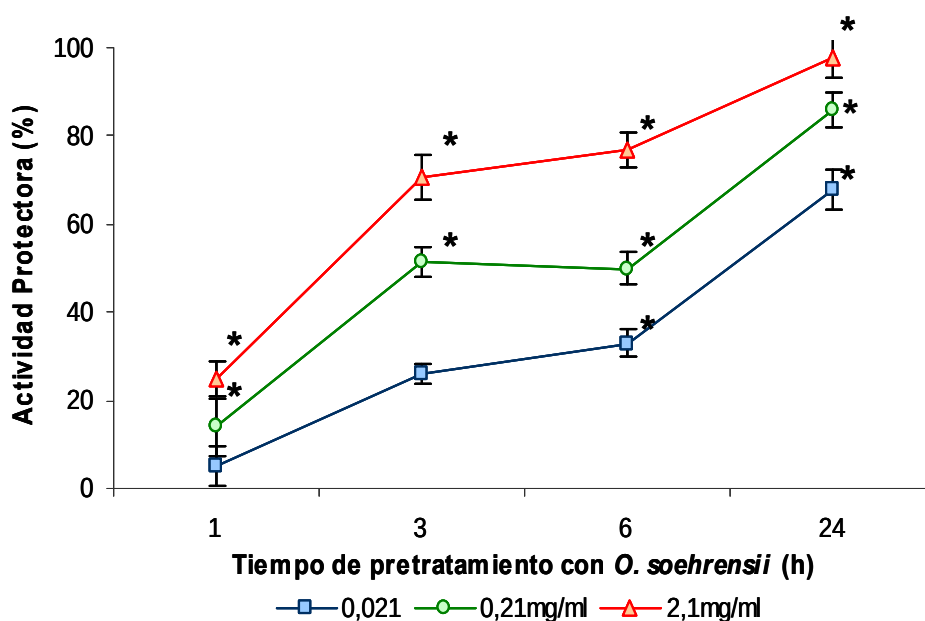


Figura 19. Cinética de pretratamiento con *O. soehrensii*. Células BHK-21 fueron cultivadas en presencia del producto por periodos de 1, 3, 6 y 24 horas, luego el producto fue descartado por lavados con PBS y las células se infectaron con VHS-2. La actividad protectora se determinó por ensayo de Reducción de la Infectividad viral-MTT (RIV-MTT). Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. El asterisco indica diferencia significativa entre el pretratamiento con el producto y el control no tratado ($p \leq 0,05$).

5.4.2. Inducción de componentes antivirales por *O. soehrensii* como factores de protección.

La caracterización de la actividad preventiva-protectora mostró la posibilidad de que *O. soehrensii* induzca la producción de componentes antivirales secretorios y/o no secretorios celulares que medien la actividad preventiva de la infección por VHS. Esta hipótesis fue evaluada buscando esta actividad en el sobrenadante de cultivos proveniente de células pretratadas, así como en el sobrenadante del lisado de células pretratadas.

Para esto, células BHK-21 se trataron con ambos sobrenadantes por 48 horas previas a la infección por VHS-2. Se encontró que el sobrenadante del cultivo tratado con la mayor concentración de *O.*

soehrensii (2,1 mg/ml) protege un 50% de las células en cultivo si se evalúa por RECP, mientras que no se detectó actividad enzimática relevante, en comparación con los cultivos control de células infectadas pero no tratadas, medida por RIV-MTT, lo que evidencia una actividad antiviral reducida (Figura 20A). Por el contrario, se encontró que el sobrenadante del lisado de células pretratadas con 2.1 mg/ml del producto, protege contra la infección de VHS-2 en un 95% evaluada por RECP y un 46 % por RIV-MTT (Figura 20.B). En ambos casos, la actividad encontrada es proporcional a la concentración del producto vegetal empleada en el pretratamiento.

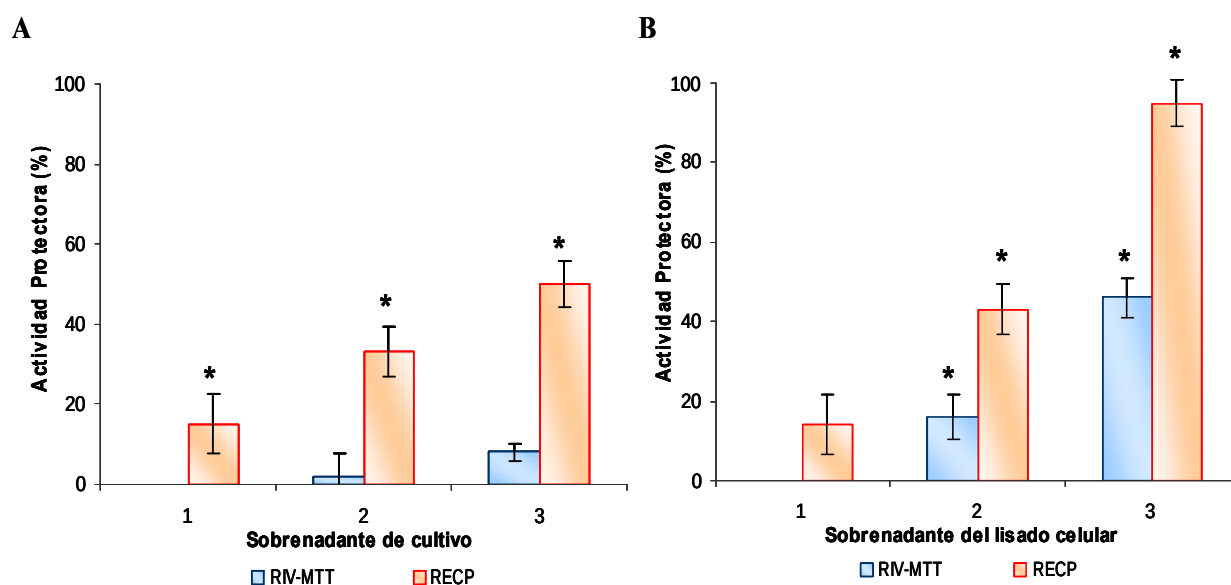


Figura 20. Protección antiviral de componentes antivirales inducidos por efecto del tratamiento con *O. soehrensii*. Células BHK-21 tratadas por 48 horas con el producto vegetal (1 = 0.021 mg/ml, 2 = 0.21 mg/ml y 3 = 2.1 mg/ml), luego de lavados con PBS, para eliminar el remanente del producto, fueron por un lado (A) cultivados por 48 horas adicionales en ausencia del producto, posterior a este periodo el sobrenadante de cultivo fue colectado y conservados a -20 °C hasta su evaluación; y alternadamente (B) las células fueron lisadas por congelación y descongelación sucesivas, los detritos celulares eliminados por centrifugación y el sobrenadante colectado y conservados a -20 °C. Ambos sobrenadantes fueron evaluados en la capacidad de prevenir la infección por pretratamiento de nuevos cultivos por 48 horas empleando el ensayo de Reducción de la Infectividad viral-MTT (RIV-MTT) y de Reducción del Efecto Citopático (RECP). Cada punto representa la media $\pm$ 1DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. El asterisco indica diferencia significativa entre el tratamiento y el control no tratado ($p \leq 0,05$).

Con el propósito de confirmar y caracterizar los resultados de protección antiviral utilizando el lisado de células pretratadas con el producto, se exploró la actividad biológica en relación a la concentración de los componentes presentes en el lisado celular. Para esto, cultivos de células BHK-21 tratados con 2,1 mg/ml del producto vegetal por 48 horas fueron lisados en *a)* volumen similar al volumen del cultivo inicial (lisado 1X) y *b)* en volumen 10 veces menor al del cultivo inicial (lisado 10X). A partir de ambos preparados se realizaron diluciones semilogarítmicas y se evaluó, por un lado, la actividad protectora antiviral en células tratadas con el preparado por 48 horas *previo* a la infección y por otro, la actividad antiviral *después* de la infección, en células infectadas una hora antes y cultivadas con el preparado (Figura 21).

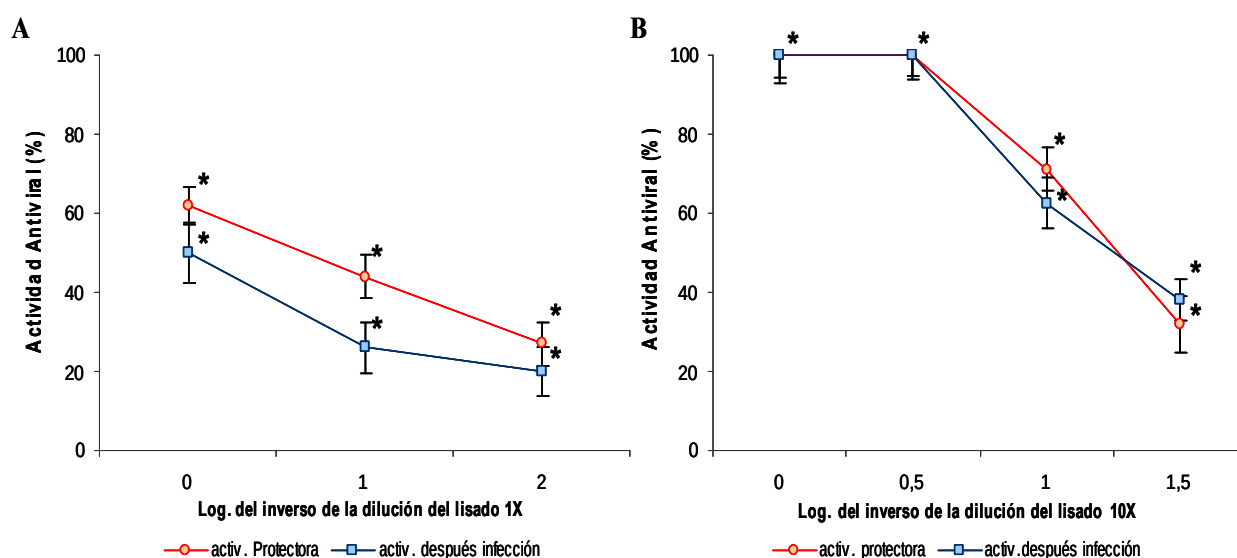


Figura 21. Relación concentración-respuesta de la actividad del lisado de células pretratadas con *O. soehrensii*. Células BHK-21 pretratadas por 48 horas con 2,1 mg/ml de *O. soehrensii*, luego de eliminar el producto por lavados, fueron lisadas en (A) volumen igual al del cultivo inicial (lisado 1X) y, (B) en volumen 10 veces menor al del cultivo inicial (lisado 10X). La actividad antiviral de protección previa a la infección y durante el proceso infeccioso fue evaluada por el ensayo de Reducción de la Infectividad-MTT (RIV-MTT). Cada punto representa la media $\pm$ 1 DS de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado. El asterisco indica diferencia significativa entre el tratamiento y el control no tratado ($p \leq 0,05$).

Como se puede observar en la figura 20.A, la actividad antiviral del lisado 1X esta en relación directa con la concentración del lisado, la misma que es encontrada tanto en pretratamiento como durante el proceso infeccioso. Estos resultados se confirmaron por concentración de los componentes antivirales en el lisado 10X; encontrando valores de 100 % de actividad antiviral en el lisado sin diluir (Figura 20.B). Asimismo, valores similares de actividad antiviral fueron observados en la dilución 1/10 del lisado 10X y el lisado 1X utilizado sin diluir.

6. DISCUSIÓN.

El presente estudio describe la actividad biológica antiviral del extracto acuoso de *O. soehrensii*, planta de origen andino que posee actividad antiviral contra la infección *in vitro* causada por el virus Herpes simplex tipo 2.

Como se mencionó en el acápite (3.1.11), la actual terapia antiviral anti-VHS emplea al aciclovir y sus derivados como las drogas de elección; su uso se limita en el tratamiento de infecciones causadas por cepas resistentes, principalmente en pacientes VIH-positivos y en menor grado de pacientes inmunocompetentes (Snoeck, 2000; Field, 2001). Por otro lado, el incremento de la prevalencia del herpes genital, las reactivaciones asintomáticas y la asociación del VHS-2 con la transmisión y adquisición de VIH, resaltan la urgente necesidad de contar con nuevas estrategias para el control y tratamiento del VHS (Severson & Tying, 1999; Moriuchi et al., 2000; Snoeck & De Clercq, 2002; Herold et al., 2002; McClelland et al., 2002).

Diversos estudios destinados a la búsqueda de nuevos agentes antivirales anti-VHS han revelado la existencia de un amplio número de agentes con actividad *in vitro* e *in vivo* (Balfour, 1999; de Clercq, 2001). (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) adenina (HPMPA) y sus derivados como el Cidofovir (HPMPC) son eficaces para el tratamiento de infecciones causadas por virus ADN; estos mostraron una eficiencia en la inhibición de la replicación viral con concentraciones 1000 veces menores de la concentración tóxica, para el huésped celular; sin embargo a nivel sistémico, presentan un efecto nefrotóxico (Aduma et al., 1995; Beadle et al., 2002; Snoeck & De Clercq, 2002).

En respuesta a la necesidad de contar con nuevas estrategias antivirales, se plantea el uso de los recursos naturales como fuente potencial de productos con actividad farmacológica (Domingo & López-Brea, 2003; Vermani & Garg, 2002; Vidaurre de la Riva, 2006). Varios estudios documentan compuestos aislados de plantas que poseen actividad anti-VHS en cultivos *in vitro* y en animales de experimentación y algunos se evalúan actualmente en estudios preclínicos y clínicos, por lo que se asume que existen grandes perspectivas de encontrar nuevos agentes antivirales (Vlieyincx & Vanden Berghe, 1991; Domingo & López-Brea, 2003; Jassim & Naji, 2003; Martin & Ernst, 2003; Hassan Khana et al., 2005).

En este sentido, se aprovechó la amplia diversidad biológica boliviana y su reconocido conocimiento ancestral (Carvajal, 2003; Gimenez & Ibisch, 2003; Vidaurre de la Riva, 2006) para seleccionar a *O. soehrensii*; planta ampliamente utilizada por la medicina tradicional kallawaya en la resolución de estados eruptivos febriles y respiratorios (Camaqui, 2007; Girault, 1999). Estudios previos, realizados en nuestro laboratorio, demostraron que el extracto acuoso de *O. soehrensii* presenta un efecto inhibidor de la replicación viral, no solo al ser adicionado a los cultivos infectados por VHS; sino también al ser preincubado con las células por 48 horas antes de la infección (Mamani et al., 2004). Con base en estos resultados, el presente estudio planteó caracterizar esta actividad antiviral durante el proceso de replicación viral activa de VHS-2 y en las células huésped previo a la infección viral.

6.1. Efecto biológico sobre sistemas de cultivo celular.

El estudio de los nuevos agentes antivirales esta destinado a demostrar, además de su eficacia y eficiencia, la ausencia de efectos tóxicos. Los estudios de citotoxicidad se deben conducir de manera previa a la medición de la actividad antiviral, debido a que, de existir un efecto tóxico por parte del producto a evaluar, los cultivos infectados no serían capaces de sostener una replicación viral y se obtendrían resultados falso-positivos de actividad antiviral; a su vez permiten conocer la franja de seguridad entre la concentración tóxica y la concentración terapéutica (Anónimo, 1997; Hassan Khana et al., 2005).

De acuerdo con esto, se diseñaron ensayos que permitieron evaluar la concentración y el tiempo de exposición al extracto acuoso de *O. soehrensii* que permita mantener a los cultivos estables en ausencia de efectos tóxicos. Para esto, se incubaron con el producto vegetal cultivos con diferentes concentraciones celulares durante períodos de 24, 48 y 72 horas de exposición, para establecer además la relación óptima entre la concentración celular y el producto vegetal.

Se determinó que cultivos de células BHK-21 con una concentración celular de 3×10^5 /ml, permiten mantener los cultivos con una viabilidad superior al 90% hasta una concentración de 21 mg/ml del producto. En cultivos con concentración celular menor (5×10^4 /ml) existe una mayor proporción del producto con respecto a la población celular por lo que la viabilidad se mantiene estable solo en concentraciones menores a 2,1 mg/ml, mientras que lo opuesto ocurre en cultivos con concentración celular de 1×10^6 /ml que requieren concentraciones menores a 42 mg/ml para mantenerse viables.

En cuanto al tiempo de exposición, se encontró que las 48 horas constituyen un tiempo óptimo para caracterizar el efecto tóxico; periodos menores a este pueden enmascarar el efecto tóxico debido al corto tiempo de contacto con el producto y periodos mayores a 48 horas llevan a la saturación del cultivo y a la carencia de nutrientes por consumo del medio, efecto que sobre dimensiona el efecto tóxico propio del producto. Los valores medios de citotoxicidad CC_{50} determinados por regresión lineal a 48 horas de exposición con *O. soehrensii* fueron 1,60 mg/ml para una concentración celular de 5×10^4 /ml, 31,44 mg/ml para una concentración celular de 3×10^5 /ml y 26,27 para una concentración celular de 1×10^6 /ml.

Una completa caracterización del efecto tóxico, es aquella que incluye diferentes ensayos que permitan confirmar el efecto observado y proporcionen información que conduzca a explicar el efecto biológico (Anónimo, 1997; de Logu & Loy, 2000). Para esto se evaluó el efecto tóxico de *O. soehrensii* por el ensayo de reducción del MTT. Este ensayo permite evaluar la viabilidad celular por medición de la actividad de las enzimas oxido-reductoras (Berridge & Tan, 1996; Buttke, 1993; Cheng et al., 2002). Se observó un leve efecto sobre la viabilidad celular en concentraciones menores a 21 mg/ml, con aproximadamente un 85% de viabilidad celular en cultivos expuestos por 48 horas con el producto vegetal. Estos resultados se correlacionan con el perfil de toxicidad observado por el ensayo de exclusión de colorante azul tripán.

Adicionalmente, se evaluó el efecto biológico de *O. soehrensii* sobre cultivo de linfocitos de sangre periférica, sistema que al margen de ser de origen humano, por su característica de cultivo primario es más sensible a condiciones diferentes a las fisiológicas (Terrazas, 1993). Se encontró que el margen de seguridad se reduce, con una viabilidad celular, evaluada por ensayo de reducción del MTT, de un 80% en cultivos tratados con 0,21 mg/ml del producto vegetal expuestos por 48 horas. Esta diferencia del efecto citotóxico en cultivos continuos y primarios debe ser considerada para los posteriores ensayos de evaluación de la efectividad *in vivo*.

Los hallazgos anteriormente citados permitieron determinar los parámetros de toxicidad *in vitro*: concentración citotóxica media y tiempo de exposición al producto, en las que no se observó efecto tóxico; estas variables que fueron consideradas para la posterior evaluación de la actividad antiviral *in vitro*.

6.2. Actividad antiviral de *O. soehrensii* durante la infección viral activa *in vitro* de VHS-2.

El modelo experimental utilizado para la evaluación de la actividad antiviral de *O. soehrensii* durante el proceso de infección activa permitió explorar el efecto biológico del producto vegetal desde el reconocimiento de la célula blanco por parte del virus (infección viral), hasta los eventos de replicación viral al interior de la célula infectada.

La línea celular BHK-21 empleada en este estudio, como huésped de infección, se utilizó en conocimiento de que este modelo es útil para la evaluación de productos anti-VHS (Mouttet et al., 1980; Teh & Sacks, 1983; Liuzzi et al., 2004). Esta línea celular ha sido bien establecida en estudios previos, logrando ser un huésped adecuado para la replicación del VHS, permite la visualización de los efectos citopáticos y la consecuente lisis celular debida a la infección viral (Terceros & Terrazas, 2002; Alarde et al., 2004).

Los monitores biológicos utilizados para la medición de la actividad antiviral RIV-MTT, RECP y PRA son ampliamente utilizados en la evaluación de potenciales agentes antivirales, siendo el último la prueba de referencia para este tipo de evaluaciones, por ser altamente sensible y específico (Hodinka & Swierkosz, 2000; Hassan Khana et al., 2005). Sin embargo, debido a su complejidad y ante la necesidad de contar con micro métodos de evaluación, los monitores que emplean como principio la reducción de sales de tetrazolio, han sido utilizados ampliamente los últimos años encontrando correlación importante con los resultados obtenidos por PRA (Cos et al., 2006).

Inicialmente, con base en el estudio preliminar en el que se evidenció que *O. soehrensii* presenta un efecto durante el proceso replicativo viral, se consideró necesario caracterizar esta actividad precisando el mecanismo por el cual se inhibe este proceso (Anónimo, 1997), vale decir determinar la etapa del ciclo replicativo viral (adherencia, penetración, replicación del ADN, síntesis de proteínas, ensamblaje o brote de partículas virales) susceptible de inhibición por *O. soehrensii* (De Clercq, 2001; Coen & Schaffer, 2003).

Para esto, se diseñaron experimentos que incorporaron el producto vegetal a diferentes tiempos a lo largo del ciclo replicativo (Chiang et al., 2002; Chiang et al., 2003). Encontrando que *O. soehrensii* presenta mayor actividad antiviral al ser añadido durante las primeras horas del proceso infeccioso; con una actividad de aproximadamente 50% al realizarse la infección en presencia del producto (tiempo 0)

y una actividad del 91% al incorporar el producto (21 mg/ml) 1 hora después de la infección. Del mismo modo, importantes valores de actividad antiviral se observaron en tiempos de adición de 3 y 6 horas después de la infección, que si bien son menores al 60%, a 21 mg/ml del producto vegetal, son evidencia de la existencia de cierto grado de interacción de *O. soehrensii* sobre los eventos tardíos de la replicación viral.

El propósito de los estudios destinados al desarrollo de nuevos agentes antivirales, es la generación de agentes con blancos de acción diferentes a los antivirales de uso actual; los blancos de acción potencialmente ideales aquellos que afectan procesos exclusivos de la replicación viral, sin afectar procesos propios de la célula huésped (Coen & Schaffer, 2003). *O. soehrensii* producto mostró ejercer actividad antiviral en las etapas tempranas de la replicación viral, que involucran los procesos relacionados con la entrada del virus a su célula huésped (adsorción y penetración viral), además de interferir con los eventos replicativos virales en la célula infectada.

De acuerdo con estos resultados, se exploró inicialmente el efecto antiviral sobre los eventos de adsorción y penetración viral; para esto, se diseñaron experimentos que aprovechan las características fisicoquímicas de cada evento en particular. La adsorción viral es una interacción ligando receptor, reconocimiento que, debido a su elevada especificidad, puede ocurrir inclusive a bajas temperaturas (4 °C). Por el contrario la penetración viral que es un proceso de fusión de la envoltura viral con la membrana celular, requiere de una temperatura fisiológica (37 °C) que facilite los cambios conformacionales de las glicoproteínas y la reorganización de los lípidos de ambas membranas (Cheng et al, 2002; Hernández & Nieves, 2002; Longnecker & Spear, 2003). Los resultados mostraron que *O. soehrensii* ejerce su efecto cuando las condiciones experimentales de infección se realizan a 37 °C, lo que demuestra que existe un efecto sobre la penetración viral, con valores de actividad antiviral del 80% medida por RIV-MTT y un 77% de actividad medida por PRA; por el contrario un efecto reducido de alrededor del 35% se observó en la evaluación a 4 °C (adsorción viral).

En las primeras etapas de la infección por VHS, las glicoproteínas virales juegan un papel importante. La adsorción es mediada por la interacción de gC que interactúa con los receptores presentes en la membrana celular, proteoglicanos y heparán sulfato; la posterior fusión de membranas requiere una interacción y posterior cambio conformacional de gD al interactuar con co-receptores específicos, además de la participación de gB, gH y gL (Longnecker & Spear, 2003; Fields et al., 2004). Dado que se demostró el efecto de *O. soehrensii* sobre penetración, planteamos que esta pueda deberse a una

interacción física entre el producto con las glicoproteínas virales y los respectivos co-receptores celulares o una alteración en el cambio conformacional necesario para la fusión de ambas membranas.

Mecanismos de inhibición similares, de la penetración viral de VHS, han sido atribuido a extractos acuosos diferentes especies vegetales *Plantago major*, *Caesalpinia pulcherrima* y *Spirulina platensis* (Chiang et al., 2002; Chiang et al., 2003; Hayashi et al., 2006); la posterior identificación y evaluación de los componentes presentes en estos extractos revelaron que este es debido a la presencia de taninos, flavonoides, terpenos, taninos hidrolizables, antraquinones, polifenoles y polisacaridos, moléculas que por sus características estructurales son capaces de interferir en esta etapa (Sydiskis, 1991; Jassim & Naji, 2003; Martin & Ernst, 2003; Hassan Khana et al., 2005).

Respecto al producto en estudio, se cuenta con resultados del análisis fitoquímico de extractos acuosos de especies del género *Opuntia*, que contienen flavonoides, antocianinas, taninos, saponinas, terpenos y lectinas (Park et al., 2001; Park & Chun, 2001; Stintzing & Carle, 2005), varios de ellos descritos como potenciales moléculas antivirales. Ante esta evidencia surge la necesidad de realizar una caracterización fitoquímica de *O. soehrensii*, para establecer la presencia de dichos componentes (Murphy, 1999; Hassan Khana et al., 2005).

La evidencia hasta ahora citada, muestra que *O. soehrensii* presenta un efecto inhibitorio de la penetración viral. Sin embargo, los hallazgos de actividad encontrados al adicionar el producto vegetal después de la infección, reflejan que *O. soehrensii* puede también inhibir procesos replicativos virales una vez que la célula ha sido infectada, evidencia que concuerda con el estudio preliminar (Mamani et al., 2004).

La caracterización de esta actividad tratando células previamente infectadas por una hora, con diferentes concentraciones del producto vegetal, mostró que *O. soehrensii* presenta una actividad antiviral concentración-dependiente de un 90%, con la mayor concentración evaluada (21 mg/ml), independiente del monitor biológico aplicado.

En cuanto al tiempo de exposición, evaluado por RIV-MTT y RECP, no se observaron diferencias entre el tratamiento por 48 y 72 horas; la evaluación por PRA solo se realizó a las 48 horas, debido a que es el tiempo óptimo para la formación de placas virales contables en los controles de infección

(Mamani et al., 2004). De acuerdo con estos resultados, se seleccionó el tratamiento por 48 horas como tiempo suficiente para conseguir un máximo de efecto inhibitorio anti-VHS-2.

Los valores del CE_{50} y el IS a 48 horas de tratamiento según ensayo fueron 6,7 mg/ml (IS = 4,7) medidos por RIV-MTT, 3,8 mg/ml (IS = 8,3) medidos por RECP y 12 mg/ml (IS = 2,6) medidos por PRA; la variación de estos valores es debida al principio y a la sensibilidad propia de cada ensayo (Burleson, 1992; Hassan Khana et al., 2005). (Burleson, 1992; Hassan Khana et al., 2005). El IS es un valor que refiere el grado selectivo de un agente antiviral para inactivar la infección en ausencia de daños importantes en el hospedero. Existe el criterio propuesto por Wyde et al., 1993 quien refiere que productos con IS mayores de 10 resultan ser adecuados candidatos antivirales. En cambio, otros autores como De Clercq (De Clercq, 1993) consideran suficientes los IS mayores a 2. De acuerdo con estos argumentos, se considera que *O. soehrensii* es un buen candidato antiviral por carecer de efectos tóxicos en las concentraciones que muestran actividad biológica. En este orden, debe destacarse que extractos acuosos de *Spirulina maxima*, *Phyllanthus orbicularis*, *Caesalpinia pulcherrima* *Psychotria serpens* y *Plantago major*, mostraron actividad anti-VHS, evaluada con monitores similares a los utilizados en este estudio) con valores de IS entre 2,2 y 128 (Barrio & Parra, 2000; Eo et al., 2001; Hernández & Nieves, 2002; Chiang et al., 2002; Chiang et al., 2003)

6.3. Actividad preventiva-protectora de *O. soehrensii* sobre la célula huésped contra la infección por VHS-2.

En su mayoría, los estudios destinados a la búsqueda de nuevos agentes antivirales se enmarcan en estudiar el efecto directo sobre la partícula viral (actividad virucida) o el efecto sobre el proceso infeccioso al ser tratados con un determinado producto, dejando de lado un componente importante de la infección viral, el huésped celular.

En cuanto a *O. soehrensii*, de acuerdo con el estudio preliminar en el que *O. soehrensii* es capaz de proteger a las células contra la infección por VHS, con una reducción del 53% del número de placas virales (Mamani et al., 2004), se caracterizó la actividad preventiva-protectora en cultivos de células BHK-21 tratados con *O. soehrensii* por periodos de 24 y 48 horas previas a la infección viral. Se encontró una actividad protectora antiviral concentración-dependiente con valores de protección mayores al 90% a 2,1 mg/ml del producto vegetal, independientemente del monitor biológico aplicado. En cuanto al tiempo de exposición, ambos periodos permiten alcanzar un máximo de protección a 2,1

mg/ml, sin embargo, en términos de eficiencia el pretratamiento por 48 horas se considera óptimo, por requerir menor concentración del producto para proteger los cultivos en un 50%.

Los valores medios de protección (CE_{50}) y el IS a 48 horas de pretratamiento, según ensayo fueron 0,012 mg/ml (IS > 2000) medidos por RIV-MTT, 0,029 mg/ml (IS > 1000) medidos por RECP y 0,95 mg/ml (IS = 33) medidos por PRA; los valores del IS muestran que *O. soehrensii* es un candidato potencial para su uso preventivo, debido a que las dosis efectivas son mucho menores a las posibles dosis tóxicas (Wyde et al., 1993; De Clerq, 1993).

Entre los productos de origen natural que mostraron actividad protectora antiviral podemos mencionar a los extractos acuosos de *Spirulina platensis* y *Arthospora platensis*, plantas de origen latino americano que son capaces de ejercer efecto protector inclusive con solo 3 horas de pretratamiento (Hayashi et al., 2006; Rechter et al., 2006). Similar efecto se atribuye a un proteoglicano y un polisacárido aislados de un hongo *Ganoderma lucidum*, que presentan capacidad protectora contra las infecciones por VHS, con valores de IS entre 30 y 100 (Kug & Kim, 2002; Liu & Yang, 2004).

Posteriores ensayos destinados a definir el tiempo mínimo de pretratamiento necesario para observar actividad protectora mostraron que periodos menores a 24 horas exhiben actividad protectora limitada, con un 71 % de actividad en el pretratamiento por solo 3 horas a la máxima concentración evaluada (2,1 mg/ml); concentración con la que se alcanza el máximo de protección en períodos prolongados de pretratamiento (48 horas).

Diferentes mecanismos pueden ser planteados para explicar el efecto protector observado. Primero, *O. soehrensii* puede inhibir el ingreso del virus a la célula interactuando con los receptores de membrana celular, tal como se describió en los ensayos de penetración viral, efecto que se amplificaría debido al mayor tiempo de contacto con las células, lo que explicaría la mayor eficiencia en el pretratamiento. Algunos estudios que documentan el hallazgo de productos de origen natural con actividad de protección antiviral, muestran que estos inhiben las etapas tempranas de la replicación viral (Hayashi et al., 2006; Rechter et al., 2006); sin embargo, no se pueden descartar la posibilidad de que el producto ingrese a la célula y sea otro el mecanismo responsable de la protección antiviral. Segundo, *O. soehrensii* al ingresar a la célula puede inducir mecanismos celulares que serían los responsables del estado antiviral celular. Esta posibilidad se sustenta en el hecho de que el estado de protección antiviral se encuentra presente incluso en ausencia de contacto directo de las células con el producto vegetal.

Para explorar el mecanismo de protección antiviral de *O. soehrensii*, se diseñaron experimentos que permitieron evaluar la capacidad de inducir la producción de mediadores celulares secretorios responsables de la actividad protectora, presentes en el sobrenadante de cultivos pretratados y/o no secretorios, presentes en el lisado de células pretratadas con el producto. Se encontró que el sobrenadante de los cultivos tratados con el producto, presenta solo un 50% actividad protectora medida por RECP y actividad no detectable medida por RIV-MTT, en los sobrenadantes provenientes del pretratamiento inicial con la mayor concentración del producto (2,1mg/ml). Por el contrario, actividad protectora significativa, proporcional a la dosis inicial del producto vegetal empleada en el pretratamiento, fue encontrada en el lisado de células pretratadas. Los valores actividad protectora del lisado de células pretratadas con 2,1 mg/ml de *O. soehrensii* fueron del 95 % medida por RECP y 46 % medida por RIV-MTT.

Ante la evidencia de contar con mediadores protectores no secretorios, provenientes de las células pretratadas, que son capaces a su vez de proteger a otras células contra la infección por VHS-2, se podría pensar que esta protección esta mediada por citocinas antivirales. Uno de los mecanismos más conocidos de protección frente a la infección viral es la mediada por los Interferones de tipo 1 (IFN- α y β), la síntesis de estas citoquinas es inducida por la infección viral y establecen un estado antiviral en la propia célula protectora y posterior a su secreción inducen en las células vecinas un estado protector antiviral (Sainz & Halford, 2002). Entre las células productoras de los IFNs de tipo 1 se encuentran los fibroblastos, sin embargo para inducir a la síntesis de IFNs es necesaria la presencia de RNA doble hebra, producto de la replicación viral (Goodbourn, 2000; Samuel, 2001; Sen, 2001; Sainz & Halford, 2002;). Sobre este antecedente, no se puede atribuir el efecto protector de *O. soehrensii* a la inducción de IFNs; además, debido a que el tiempo promedio de los ensayos y el procedimiento de lisis empleado, estas condiciones no permitirían mantener estables a estas citocinas, por tener una vida media corta y requerir condiciones de temperaturas adecuadas para mantener su actividad (Janeway et al., 2005).

Posteriores experimentos destinados a confirmar la presencia de mediadores intracelulares responsables del efecto protector antiviral fueron diseñados. Para esto, tomando en cuenta la dosis de *O. soehrensii* empleada en el pretratamiento con la que se observó mayor efecto protector (2,1 mg/ml), se realizó la lisis celular de estos cultivos en dos condiciones *a*) en volumen similar al del cultivo inicial (lisado 1X) y *b*) en volumen 10 veces menor al del cultivo inicial (lisado 10X), esto con el objetivo de concentrar los componentes presentes en el lisado. Posteriores diluciones semilogarítmicas,

de ambos preparados, fueron realizadas para verificar si el efecto protector observado obedecía un patrón concentración de lisado-dependiente.

Los resultados de la evaluación de actividad protectora del lisado 1X, mostraron que el efecto es directamente proporcional a la dilución del lisado, con un máximo de protección del 62 % en el lisado sin diluir, medida por RIV-MTT. Del mismo modo, similar efecto se observó con el lisado 10X, con un 71% de actividad protectora medida por RIV-MTT en la dilución 1/10, dilución que corresponde al lisado 1X sin diluir. La capacidad protectora alcanza valores del 100% con el lisado 10X, sin diluir, efecto que se explica debido a una mayor concentración de los mediadores protectores presentes en este preparado.

Adicionalmente, se evaluó la actividad antiviral de ambos preparados (lisado 1 y 10X) sobre células previamente infectadas por una hora. Se encontró valores de actividad protectora del 50% en el lisado 1X sin diluir y del mismo modo que en la evaluación de la capacidad protectora, un 100 % de actividad antiviral en el lisado 10X, sin diluir.

Estos hallazgos son interesantes considerando que en previos análisis de actividad antiviral en células infectadas, se requerían dosis del producto de 21 mg/ml para obtener un máximo de actividad. Mientras que, en las últimas evaluaciones utilizar el lisado de células pretratadas con 2,1 mg/ml del producto es suficiente para observar un máximo de actividad. Se sugiere entonces que *O. soehrensii* ejerce su efecto a través de mediadores antivirales de tipo no secretable, responsables del establecimiento del estado antiviral al interior de la célula, que eventualmente y en menor grado, pueden secretarse y proteger a células adyacentes; estos mediadores pueden explicar su efecto debido a la inhibición del proceso replicativo viral, inclusive en células infectadas.

6.4. *O. soehrensii* efectivo agente natural anti-VHS-2.

La caracterización del extracto acuoso de *O. soehrensii*, reveló que nos encontramos frente a un efectivo agente contra la infección *in vitro* de VHS-2. Se plantea que *O. soehrensii* presenta un efecto dual: protector-preventivo *previo* a la infección viral y *durante* la infección viral activa, inhibiendo la penetración viral e interfiriendo alguno de los eventos replicativos virales en células infectadas. Similar efecto se ha atribuido a extractos acuosos de diversas plantas, el análisis del mecanismo de acción en la mayoría de ellos concuerda en que, además de prevenir las etapas tempranas del ciclo replicativo,

adhesión o penetración, son capaces de proteger a las células contra la infección viral (Serkedjieva & Ivancheva, 1999; Kug & Kim, 2002; Liu & Yang, 2004; Hayashi et al., 2006; Rechter et al., 2006); sin embargo, no se cuentan con estudios destinados a explicar el mecanismo de protección.

El producto vegetal empleado en este estudio, al ser un extracto crudo, puede presentar en su composición varios componentes que pueden ser responsables, por separado, del efecto dual observado (Hassan Khana et al., 2005). Por un lado, cierto(s) componente(s) puede(n) interactuar con los receptores y co-receptores celulares determinantes para el proceso de fusión de membranas durante la penetración, unión estable que persiste aún después de los lavados, interacción inmediata a la adición del producto que requeriría una elevada concentración del producto para una eficaz actividad. Asimismo, cierto(s) otro(s) componente(s) del producto que ingresan a la célula puede(n) inducir mediadores moleculares intermedios no secretables responsables de la protección antiviral, que son resistentes al proceso de lisis celular e inducen mecanismos celulares responsables de la eficiente protección del huésped celular contra la infección; mecanismo debido a una inhibición del proceso replicativo viral.

El género *Opuntia*, es ampliamente utilizado en la medicina tradicional y formal por presentar propiedades, anti-inflamatorias, cicatrizantes, hipoglucemiantes, entre otras (Park et al., 2001; Park & Chun, 2001). En cuanto a propiedades antivirales, el extracto acuoso de una especie de origen mexicano *O. streptacantha* utilizada para el tratamiento de la diabetes mellitus, mostró como resultado adicional, una disminución en la recurrencia de herpes genital, en pacientes que recibieron este tratamiento. Posteriores estudios demostraron que posee un efectivo inhibidor de la replicación *in vitro* de VHS-1 e interesantemente, además presenta actividad protectora, por tratamiento previo a la infección viral (Ahmad et al., 1996).

Interesantemente, un estudio previo en nuestro laboratorio, que exploró la propiedad antiviral de *O. soehrensii* en el modelo de infección *in vitro* del virus Respiratorio Sincitial (VRS), reveló que para este sistema *O. soehrensii* presenta también un efecto dual, previo y durante la infección viral, siendo esta última la más eficiente con una CE_{50} de 0.078 mg/ml (SI = 402) medida por RIV-MTT (Guarachi et al., 2006; Zambrana et al., 2006). La coincidencia de los hallazgos en ambos sistemas de infección, permiten proponer que el mecanismo de acción pueda ser el mismo en ambos casos debido a la existencia de características similares entre ambos virus. El hecho de que ambos virus posean envoltura sustenta la hipótesis de que el mecanismo de acción común para ambos podría ser la inhibición de la

penetración viral. Posteriores estudios de caracterización de la actividad anti-VRS permitirán contrastar esta hipótesis.

Los resultados expuestos en este trabajo proporcionan un soporte científico al uso empírico de *O. soehrensii* contra infección *in vitro* causada por VHS-2. Esto permite por un lado, responder a la urgente necesidad de contar con nuevas estrategias de tratamiento de una de las más frecuentes ITS a nivel mundial (Kimberlin & Rouse, 2004) e interesantemente la actividad preventiva protectora de *O. soehrensii* se enmarca dentro de las nuevas estrategias de prevención, como potencial agente microbicida contra el herpes ano-genital.

7. CONCLUSIONES.

7.1. CONCLUSIÓN GENERAL

El extracto acuoso de *Opuntia soehrensii* es un efectivo agente antiviral no tóxico contra la infección *in vitro* del virus Herpes simplex tipo 2.

7.2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS.

O. soehrensii no presenta actividad tóxica sobre cultivos de células BHK-21 en concentraciones menores a 21mg/ml y sobre cultivos de linfocitos humanos en concentraciones menores a 0,021 mg/ml. La concentración citotóxica media para cultivos de células BHK-21, de densidad celular de 3×10^5 /ml, es de 31,44 mg/ml a 48 horas de exposición al producto.

O. soehrensii presenta actividad antiviral no tóxica contra la infección *in vitro* de VHS2. La caracterización de esta actividad demostró que *O. soehrensii* ejerce su actividad antiviral sobre la penetración viral, con un 80 % de actividad medida por RIV-MTT a 21 mg/ml; y además, ejerce un efecto inhibitorio de los proceso de replicación viral en células infectadas; siendo los valores del CE_{50} y el IS a 48 horas de tratamiento de 6,7 mg/ml (IS = 4,7) medidos por RIV-MTT, 3,8 mg/ml (IS = 8,3) medidos por RECP y 12 mg/ml (IS = 2,6) medidos por PRA.

O. soehrensii presenta actividad preventiva-protectora no tóxica de la célula huésped contra la infección *in vitro* de VHS-2. Los valores medios de capacidad de protección a 48 horas de pretratamiento según ensayo fueron 0,012 mg/ml (IS > 2000) medidos por RIV-MTT, 0,029 mg/ml (IS > 1000) medidos por RECP y 0,95 mg/ml (IS = 33) medidos por PRA. El mecanismo de protección es compatible con la existencia de mediadores celulares no secretables inducidos por el producto vegetal.

8. RECOMENDACIONES.

A raíz de los hallazgos importantes de este trabajo se sugiere evaluar el producto con otras cepas virales, aisladas de muestras clínicas, entre las que se pueden considerar además trabajar con cepas resistentes a los antivirales empleados comúnmente en el tratamiento.

A fin de homogenizar los sistemas de valuación de actividad anti-VHS, el huésped celular comúnmente utilizado en este tipo de evaluaciones son las células Vero, por lo que se sugiere contrastar los resultados más relevantes de este trabajo bajo este sistema celular.

En cuanto a la evaluación del efecto citotóxico, se sugiere incluir otros tipos celulares, como líneas celulares de origen humano, para establecer un rango de concentraciones no tóxicas para un amplio tipo de células.

De acuerdo con el posible mecanismo de acción descrito para *O. soehrensii*, se debe considerar el incluir controles de antivirales conocidos que presenten un similar mecanismo de acción para comparar la eficiencia y potencia de nuestro producto.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abad, J. M., P. Bermejo, E. Gonzáles, I. Iglesias, A. Irurzun & L. Carrasco (1999). Antiviral Activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology* **32**, 499-503.
- Aduma, P., M. C. Connelly, R. V. Srinivas & A. Fridland (1995). Metabolic diversity and antiviral activities of acyclic nucleoside phosphonates. *Molecular Pharmacology* **47**, 816-822.
- Aguirre, G. (2006). Plantas medicinales utilizadas por los indígenas Moseten-Tsimane' de la comunidad de Asunción de Quiquibey, en la RB-TCO Pílon Lajas, Beni, Bolivia. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Mayor de San Andrés, Beni. 49 p.
- Ahmad, A., J. Davies, S. Randal & G.R.B. Skinner (1996). Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Research* **30**, 75-85.
- Andel-Malek, S., W. F. Bastien, Q. Mahler, M. G. Jia, W. E. Reinecke, Jr, Y. Robinson & J. Zalles-Asin (1996). Drug leads from the Kallawayas herbalists of Bolivia. Background, rationale, protocol and anti-VIH activity. *Journal of Ethnopharmacology* **50**, 157-166.
- Anderson, L., D. Briggs, F. Cardini, P. Chan & S. Chandra (2000). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Organización Mundial de la Salud. 70 p.
- Anónimo (1997). The Clinical Evaluation of Antiviral Agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **40**, 1-67.
- Arrázola, R. S. (1999). Diversidad etnobotánica y potencial etnofarmacológico de los valles secos de Cochabamba, Bolivia. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba. 94 p.
- Balfour, H. (1999). Antiviral Drugs. *Drug Therapy* **340**, 1255-1266.
- Kott, V., V. Barbini, M. Cruaños, J de D. Muñoz, E. Vivot, J. Cruaños, V. Martino, G. Ferraro, L. Cavallaro & R. Campos (1999). Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **64**, 79-84.
- Barrio G. & F. Parra (2000). Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *Journal of Ethnopharmacology* **72**, 317-322.
- Beadle, J., C. Hartline, K. A. Aldern, N. Rodriguez, E. Harden, E. R. Kern & K. Y. Hostetler (2002). Alkoxyalkyl Esters of Cidofovir and Cyclic Cidofovir Exhibit Multiple-Log Enhancement of Antiviral Activity against Cytomegalovirus and Herpesvirus Replication In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 2381-2386.

- Beck, G. (1995). *Opuntia soehrensii* Britt & Rose. Colección de Cactáceas. Herbario Nacional de Bolivia.
- Berridge, M., & A. Tan (1996). The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* **4**, 14-19.
- Beuscher, N. (1994). Antiviral activity of African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **42**, 101-109.
- Bourne, K. Z., N. Bourne, S. F. Reising & L. R. Stanberry (1999a). Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research* **42**, 219–226.
- Bourne, N., J. Ireland, D. I. Bernstein & L. R. Stanberry (1999b). Effect of undecylenic acid as a topical microbicide against genital herpes infection in mice and guinea pigs. *Antiviral Research* **40**, 139–144.
- Brutkiewicz R. & M. Welsh (1995). Major Histocompatibility Complex Class I Antigens and the Control of Viral Infections by Natural Killer Cells. *Journal of Virology* **69**, 3967–3971.
- Burleson, F. T. M. Chambers & D. L. Wiedbrauk (1992). Viruses: Properties and Quantification. pp. 39-118. En: *Virology a Laboratory Manual*. Academic Press. California.
- Buttke, T. M. (1993). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent. *Journal of Immunology Methods* **157**, 40-45.
- Calvo, L. M. (2003). Diversidad cultural y principales actores en el aprovechamiento de la biodiversidad. pp. 162-190. En: *Biodiversidad: La Riqueza de Bolivia*. Estado de Conocimiento y Conservación. Ministerio de Desarrollo Sostenible, Editorial FAN, Santa Cruz de la Sierra.
- Camaqui, A. (2007). *Opuntia soehrensii*. pp. 28-31. En: *Plantas Medicinales de Tinguipaya*. Biblioteca de Salud Intercultural. Cooperación Italiana. La Paz.
- Carrasco, L., V. Robin, A. Irurzun, M. Amoros & J. Boustie (2002). Antipoliiovirus flavonoids from *Psiadia dentata*. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **12**, 283–291.
- Carvajal, R. (2003). Prioridades de Investigación Científica sobre Recursos Naturales Renovables para el Desarrollo Sostenible. pp. 133-146. En: *Ciencia, Innovación y Desarrollo: La Biodiversidad en el Eje del Proceso*, Memorias del Simposio Internacional. Ministerio de Desarrollo Sostenible. Editorial FAN. La Paz
- Cheng, H. Y., C. C. Lin & T. C. Lin (2002). Antiherpes simplex virus type 2 of casuarinin from the bark of *Terminalia arjura* Linn. *Antiviral research* **55**, 447-455.

- Chiang, L. C., W. Chiang, M. Y. Chang, L. T. Ng & C. C. Lin (2002). Antiviral activity of *Plantago mayor* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research* **55**, 53-62.
- Chiang, L., W. Chiang, M. C. Liu & C. C. Lin (2003). *In vitro* antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 194-198.
- Claros, G., S. Zambrana, M. Curcuy & R. Carvajal (2007). Seguridad preclínica y actividad biológica de *Aphyllocladus spartioides weddell* en procesos gigivoperiodontales. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. 160 p.
- Coen D. M. & P. A. Schaffer (2003). Antiherpesvirus drugs: A promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nature* **2**, 278-287.
- Corey, L. (2007a). Herpes Simplex Virus Type 2 & HIV-1: The Dialogue between the 2 Organisms Continues, Editorial Commentary. *Journal of Infectious Diseases* **195**, 1242-1244.
- Corey, L. (2007b). Synergistic Copathogens — HIV-1 and HSV-2, Editorial Commentary. *New England Journal of Medicine*, 356-358.
- Cos, P., N. Hermans, T. De Bruyne, S. Apers, J. B. Sindambiwe, D. Vanden Berghe, L. Pieters & A. J. Vlietinck (2002). Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology* **79**, 155–163.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., D. Vanden Berghe & L. Maes (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". *Journal of Ethnopharmacology* **106**, 290-302.
- Cotarelo, M., P. Catalán, C. Carrillo-Sánchez, A. Menasalvas, E. Cercenado, T. Antonio & E. Bouza (1999). Cytopathic effect inhibition assay for determining the in-vitro susceptibility of herpes simplex virus to antiviral agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **44**, 705-708.
- Cullen, A., Kelly, J., J.K. Barnett & E. McCloud (2001). Inhibition of Herpes Simplex Virus 1 by Plant Extract Y from *Plantago lanceolata*. Memorias de Sigma Zeta National Convention University of Indianapolis. Indiana, USA.
- Cunningham, A. & Z. Mikloska (2001). The Holy Grail: Immune Control of Human Herpes Simplex Virus Infection & Disease. *HERPES* **8** 1.
- De Clercq, E. (1993). Therapeutic potential of HPMPC as an antiviral. *Drugs Review Medical Virology* **3**, 85-96.
- De Clercq, E. (2001). Molecular Targets of Antiviral Agents. *Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* **297**, 1-10.

- De Clercq, E. (2003). Clinical Potencial of the Acyclic Nucleoside Phosphonates Cidofovir, Adefovir, and Tenofovir in Treatment of DNA Virus and Retrovirus Infections. *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 569-596.
- De Clercq, E. (2004). Antiviral drugs in current clinical use. *Journal of Clinical Virology* **30**, 115-133.
- De Clercq, E. (2005). Acyclic Nucleoside Phosphonates: A Key Class of Antiviral Drugs. *Nature* **4**, 928-940.
- De Logu, A., G. Loy, M. L. Pellerano, L. Bonsignore & M. L. Schivo (2000). Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral research* **48**, 177 -185.
- De Lucca, M. (1992). *Opuntia soehrensii*. pp. 76. En : Enciclopedia Boliviana, Flora Medicinal Boliviana. Los Amigos del Libro, La Paz.
- De Lucca, M. F. (2004). Plantas medicinales del trópico boliviano. Programa de Apoyo a la Estrategia de Desarrollo Alternativo en el Chapare (PRAEDAC), Cochabamba. 192 p.
- Domingo, D. & M. López-Brea (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* **16**, 385-393.
- Efstathiou, S. & C. M. Preston (2005). Towards and understanding of the molecular basis of herpes simples virus latency. *Virus Research* **111**, 108-119.
- Fang, X. F., B. Song, Y. Y. Tu, J. Z. Tong, J. L. Faul & H. Bai (1999). Rapid detection of glycoprotein G gene for the diagnosis and typing of herpes simplex virus infection in genital herpes. *Sexual Transmition Infections* **75**, 396-397.
- Field, H. J. (2001). Herpes simplex virus antiviral drug resistance-current trends and future prospects. *Journal of Clinical Virology* **21**, 261-269.
- Fields, N., M. Howley & D. Knipe (2004). Herpes Simplex Viruses and Their Replication. pp. 2400-2443. En: Virology (Fields). Lippincott-Raven Publishers, London.
- Flemington, E. K. (2001). Herpesvirus Lytic Replication and the Cell Cycle: Arresting New Developments. *Journal of Virology* **75**, 4475-4481.
- Gatcheva, N., G. Francois, N. Andrews, D. Brown, R. Gopal, H. Melker & R. G. Pebody (2004). The seroepidemiology of herpes simplex virus type 1 and 2 in Europe. *Sexual Transmitted Infectious* **80**, 185-191.
- Giménez, A. & P. L. Ibisch (2003). Uso de la biodiversidad como recurso genético. pp. 313-323. En: Biodiversidad: La riqueza de Bolivia. Estado de Conocimiento y Conservación. Ministerio de Desarrollo Sostenible. Editorial FAN, Santa Cruz de la Sierra.

- Giménez, A. M. (1993). Agentes Antivirales. Conceptos Actuales y prácticos aplicables a la dermatología. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* **4**, 3-11.
- Girault, L. (1999). Kallawaya: Curanderos Itinerantes de los andes, Investigación sobre prácticas medicinales y mágicas. UNICEF-OPS-OMS, La Paz. 670 p.
- Gonga, E., B. Matthews, J. Chua, G. Holan, J. Raff, T. McCarthy & S. Sacks (2005). Evaluation of dendrimer SPL7013, a lead microbicide candidate against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* **68**, 139–146.
- Goodbourn, S. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* **81**, 2341-2364.
- Guarachi, M., K. Terrazas & R. Carvajal (2006). Actividad antiviral de *Opuntia soehrensii* sobre la infección por virus sincitial respiratorio, in vitro. *Revista Médica* **12**, 19-24.
- Hassan Khan, M. T., A. Ather, K. D. Thompson & R. Gambari (2005). Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* **67**, 107-119.
- Hayashi, K., T. Hayashi, N. Morita & I. Kojima (2006). An extract from *Spirulina platensis* is a selective inhibitor of herpes simplex virus type 1 penetration into HeLa cells. *Phytotherapy Research* **7**(1), 76-80.
- Hernández-Corona, A., I. Nieves, M. Meckes, G. Chamorro & B. L. Barron (2002). Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Research* **56**, 279-285.
- Hernández-Urzúa, M. A. (2001). Interleucinas e Inmunidad innata. *Rev. Biomed* **12**, 272-280.
- Herold, B. C., I. Scordi-Bello, N. Cheshenko, D. Marcellino, M. Dzuzelewski, F. Francois, R. Morin, V. Mas Casullo & M. E. Klotman (2002). Mandelic Acid Condensation Polymer: Novel Candidate Microbicide for Prevention of Human Immunodeficiency Virus and Herpes Simplex Virus Entry. *Journal of Virology* **76**(22), 11236-11244.
- Hodinka R. L. & E. M. Swierkosz (2000). Antiviral Susceptibility Testing; Proposed Standard. pp. 35-45. En: NCCLS document M33-P. New York.
- Howett, K., M. Krebs & E. B. Neely (1999). A Broad-Spectrum Microbicide with Virucidal Activity against Sexually Transmitted Viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 314–321.
- Jacobs A. & C. Fraefel (1999). HSV-1-Based Vectors for Gene Therapy of Neurological Diseases and Brain Tumors: Part I. HSV-1 Structure, Replication and Pathogenesis. *Neoplasia* **1**, 387-401.
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport & M. Shlomchik (2005). Failures of Host Defense Mechanisms. pp. 461-512. En: Immuno Biology. Garland Science, London.
- Jassim, A. & M. Naji (2003). Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 412-427.

- Keller, M. J., A. Tuyama, M. J. Carlucci & B. C. Herold (2005). Topical microbicides for the prevention of genital herpes infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**, 420–423.
- Kimberlin, D. W. & D. J. Rouse (2004). Genital Herpes. *New England Journal of Medicine* **350**, 1970–1977.
- Kudi, A. & S. Myint (1999). Antiviral activity of some Nigerian medicinal extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **68**, 289–294.
- Eo, K-S. Y-S. Kim, C-K. Lee & S-S. Han (2002). Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex virus. *Journal of Ethnopharmacology* **72**, 475–481.
- Kuo, Y-C., C-C. Chen, W-J. Tsai & Y-H, Ho (2001). Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero Cells by *Psychotria serpens*. *Antiviral research* **51**, 95–109.
- Kuo, Y-C., L. Lin, W-J. Tsai, C. Chou, S. Kung & Y. Ho (2002). Samarangenin B from *Limonium sinense* Suppresses Herpes Simplex Virus Type 1 Replication in Vero Cells by Regulation of viral Macromolecular Synthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 2854–2864.
- Leary, J., J. Levin, A. Weinberg, R. Sarisky & R. Wittrock (2002). Susceptibilities of Herpes Simplex Viruses to Penciclovir and Acyclovir in Eight Cell Lines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 762–768.
- Lipipun, V., M. Kurokawa, R. Suttisri, P. Taweechotipatr, P. Pramyothin, M. Hattori & K. Shiraki (2003). Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro & in vivo. *Antiviral Research* **60**, 175–180.
- Liu, J., F. Yang, L-B. Ye, X-J. Yang, K. A. Timani, Y. Zheng & Y-H Wang (2004). Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* **95**, 265–272.
- Liuzzi, M., Kibler, P., Bousquet, Ch., Harji, F., Bolger, G., Garneau, M., Lapeyre, N., McCollum, R.S., Faucher, A. M., B. Simoneau & M. G. Cordingley (2004). Isolation and Characterization of herpes simplex virus type 1 resistant to aminothiazolylphenyl-based inhibitors of the viral helicase-primase. *Antiviral Research* **64**, 161–170.
- Longnecker, R. & P. G. Spear (2003). Herpesvirus Entry: an Update. *Journal of Virology* **77**, 10179–10185.
- Lopez, A., J. B. Hudson & G. H. N. Towers (2001). Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **77**, 189–196.
- Lubinski, J., T. Nagashunmugam & H. M. Friedman (1998). Viral interference with antibody and complement. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **9**, 329–337.

- Macía, M. J., E. García & P. J. Vidaurre (2005). An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology* **97**, 337-350.
- Malmgaard, L. & S. R. Paludan (2003). Interferon (IFN)- α/β , interleukin (IL)-12 & IL-18 coordinately induce production of IFN- γ during infection with herpes simplex virus type 2. *Journal of General Virology* **84**, 2497–2500.
- Mamani, G., S. Zambrana, K. Terrazas & R. Carvajal (2004). Actividad Antiviral anti-Herpes simplex de *Opuntia spp.*, un producto natural andino. *Biofarbo* **XII**, 21- 26.
- McClelland, R. S., C. C. Wang, J. Overbaugh, B. A. Richardson, L. Corey, L. Rhoda, K. Mandalay, J. Ndinya-Acholag, J. J. Bwayog & J. K. Kreiss (2002). Association between cervical shedding of herpes simplex virus and HIV-1. *AIDS* **16**, 2425–2430.
- McCormack, S. (2002). Vaginal microbicides. *Current Opinion in Infectious Diseases* **15**, 57-62.
- McCutcheon, A. (1995). Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **49**, 101-110.
- Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus Assembly and Egress. *Journal of Virology* **76**(4), 1537-1547.
- Moriuchi, M., R. Williams, H. Moriuchi & S. E. Straus (2000). Herpes Simplex Virus Infection Induces Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Ideallibrary* **278**, 534=540.
- Mouttet, M. E., J. M. Béchet & L. Montagnier (1980). Enhanced replication of herpes simplex virus type 1 in BHK-21 cells transformed by hamster sarcoma virus. *Intervirology* **14**, 78-83.
- Murphy, M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 564–582.
- Myscofski, D., A. Zago, C. Jogger, S. Manoj, M. Yoon & P. Spear (2006). Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology* **344**, 17 – 24.
- Nagot, N., A. Ouédraogo, V. Foulongne, I. Konaté, H. A. Weiss, L. Vergne, M. Defer, D. Djagbaré, A. Sanon, J. Andonaba, P. Becquart, M. Segondy, R. Vallo, A. Sawadogo, P. Van de Perre & P. Mayaud (2007). Reduction of HIV-1 RNA Levels with Therapy to Suppress Herpes Simplex Virus. *New England Journal of Medicine* **356**, 790-799.
- OMS (2001). Herpes simplex virus type 2. Programmatic and research priorities in developing countries. Report of WHO/ UNAIDS/LSHTM WORKSHOP. London. 20 p.
- Padma, N. & P. Pramod (1998). Effect of the extract *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. *Journal of Ethnopharmacology* **61**, 81-83.

- PAHO (1998). Kallawayas: The Nomadic Medicine Men of Bolivia. Pan American Health Organization - PAHO. 5 p.
- Park, E-H. & M-J. Chun (2001). Wound healing activity of *Opuntia ficus-indica*. *Fitoterapia* **72**, 165-167.
- Park, E., S. H. Leeb, J. Kahng & K. Shin (2001). An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia* **72**, 288-290.
- Payment, P. & M. Trudel (1993). Isolation and Identification of Viruses. pp. 19-38. En: Methods and Techniques in Virology. Marcel Dekker, New York.
- Preston, C. M. (2000). Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *Journal of General Virology* **81**, 1-19.
- Rajbhandari, M. & U. Wegner (2001). Screening of Nepalese medicinal plants of antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology* **74**, 251-255.
- Rechter, S., T. Konig, S. Auerchs, S. Thulke, H. Walter, H. Dornenburg, C. Walter & M. Marschall (2006). Antiviral activity of *Arthospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Research* **72**, 197-206.
- Reed, L. J. & H. Muench (1938). A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints. *The American Journal of Hygiene* **27**, 493-497.
- Rekabdar, E., K. Tunba, J. Liljeqvist & T. Bergdtro (1999). Variability of the Glycoprotein G Gene in Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus Type 1. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **6**, 826-831.
- Rodríguez, J. (1997). Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad in vitro de líneas de melanoma. *Patología* **30**, 18-27.
- Sainz, B. & W. Halford (2002). Alpha/Beta Interferon and Gamma Interferon Synergize To Inhibit the Replication of Herpes Simplex Virus Type 1. *Journal of Virology* **76**, 11541-11550.
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral Actions of Interferons. *Clinical Microbiology Reviews* **14**, 778-809.
- Schneider-Schaulies, J. (2000). Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *Journal of general Virology* **81**, 1413-1429.
- Scordi-Bello, B., C. Herold, N. Cheshenko, D. Marcellino, M. Dzuzelewski, F. Francois & M. E. Klotman (2002). Mandelic Acid Condensation Polymer: Novel Candidate Microbicide for Prevention of Human Immunodeficiency Virus & Herpes Simplex Virus Entry. *Journal of Virology* **76**, 11236-11244.
- Sen, G. C. (2001). Viruses and Interferons. *Annual Reviews Microbiology* **55**, 255-281.

- Serkedjieva, J. & S. Ivancheva (1999). Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *Journal of Ethnopharmacology* **64**, 59-68.
- Severson, J. L. & S. K. Tying (1999). Relation between Herpes Simplex Viruses and Human Immunodeficiency Virus Infections. *Archives in Dermatology* **135**, 1393-1397.
- Snoeck, R. (2000). Antiviral therapy of herpes simplex. *International Journal of Antimicrobial Agents* **16**, 157–159.
- Snoeck, R. & E. de Clercq (2002). New treatments for genital herpes. *Current Opinion in Infectious Diseases* **15**, 49-55.
- Stanberry, L., A. Cunningham, G. Mertz, A. Mindel, B. Peters, M. Reitano, S. Sacks, A. Wald, S. Wassilew & P. Woolley (1999). New developments in the epidemiology, natural history & management of genital herpes. *Antiviral Research* **42**, 1-14.
- Stintzing, F. C. & R. Carle (2005). Cactus stems (*Opuntia spp.*): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecules Nutrition Food Research* **49**, 175 – 194.
- Strang, B. L. & N. D. Stow (2005). Circularization of the Herpes Simplex Virus Type 1 Genome upon Lytic Infection. *Journal of Virology* **79**, 12487–12494.
- Sydiskis, R. J. (1991). Inactivation of Enveloped Viruses by Anthraquinones Extracted form Plants. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy* **35**, 2463-2466.
- Teh, C. Z. & S. L. Sacks (1983). Susceptibility of recent clinical isolates of herpes simplex virus to 5-ethyl-2'-deoxyuridine: preferential inhibitions of herpes simplex virus type 2. *Antimicrob Agents Chemotherapy* **5**, 637-640.
- Terceros, P. & K. Terrazas (2002). Virus herpes simplex: Aislamiento y Cultivo *in vitro*. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. 56 p.
- Terceros, P. & K. Terrazas (2007). Aplicación de Procedimientos de Diagnóstico Laboratorial en la identificación de Infecciones causadas por el virus Herpes simples. Tesis de Especialidad en Diagnóstico Clínico. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. 70 p.
- Terrazas, K., L. Sánchez & R. Carvajal (1993). Efectos Biológicos de la *Musa paradisiaca* en el sistema inmunitario. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.
- Thompson, R. & M. Sawtell (2001). Herpes Simplex Virus Type 1 Latency-Associated Transcript Gene Promotes Neuronal Survival. *Journal of Virology* **75**, 6660–6675.
- Todar, K. (2006). Animal Viruses and Viral Diseases of Humans. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology, Wisconsin.

- Tortorella, D., B. E. Gewurz, M. H. Furman, D. J. Schust & H. L. Ploegh (2000). Viral Subversion of the Immune System. *Annual Reviews Immunology* **18**, 861–926.
- Vandebroek, I. (2003). Plantas Medicinales para la atención primaria de la salud. El conocimiento de ocho médicos tradicionales de Apillapampa (Bolivia). Industrias Graficas Serrano. Cochabamba. 80 p.
- Vermani, K. & S. Garg (2002). Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. *Journal of Ethnopharmacology* **80**, 49-66.
- Vlietinck A. J. & D. A. Vanden Berghe (1991). Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *Journal of Ethnopharmacology* **32**, 414-426.
- Vidaurre de la Riva, P. J. (2006). Plantas Medicinales en los andes de Bolivia. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 268-284.
- Wald, A. (2006). Genital HSV-1 infections. *Sexual Transmition Infections* **82**, 189-190.
- Wald, A., J. Zeh, S. Selke, T. Warren, A. J. Ryncarz, J. Krieger & L. Corey (2000). Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. *The New England Journal of Medicine* **23**, 844-850.
- Whitley, R. & B. Roizman (2001). Herpes simplex virus infections. *The Lancet* **357**, 1513-1518.
- Wood, A. J. (2003). Antiviral Drugs. *The New England Journal of Medicine* **340**(16), 1255-1266.
- Wyde, P.R., Ambrose, M.W., L.R. Meyerson & E. B. Gilbert (1993). The antiviral activity of SP-303, a natural polyphenolic polymer, against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in cotton rats. *Antiviral Research* **20**, 145-154.
- Xu, H. (1999). Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. *Antiviral research* **44**, 43-54.
- Yang, C., H. Cheng, L. Chiang, T. Lin & C. Lin (2005a). Acetone, ethanol and methanol extracts of *Phyllanthus urinaria* inhibit HSV-2 infection in vitro. *Antiviral Research* **67**, 24–30.
- Yang, C., H. Cheng, T. Lin, L. Chiang & C. Lin (2005b). *Euphorbia thymifolia* suppresses herpes simplex virus-2 infection by directly inactivating virus infectivity. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* **32**, 346–349.
- Yang, C., H. Cheng, T. Lin, L. Chiang & C. Lin (2007c). The *in vitro* activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose isolated from *Phyllanthus urinaria* against herpes simplex virus type 1 and 2 infections. *Ethnopharmacological communication* **110**, 555-558.
- Yokota, S., N. Yokosawa, T. Okabayashi, T. Suzutani & N. Fujii (2005). Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 confers efficient viral replication. *Virology* **338**, 173 – 181.

- Yoosook, C., & Y. Panpisutchai (1999). Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* & *Clinacanthus nutans*. *Journal of Ethnopharmacology* **67**, 197-187.
- Zambrana, S., M. Guarachi, G. Mamani, K. Terrazas & R. Carvajal (2006). Antiviral Activity of an aqueous extract from *Opuntia spp.* a medicinal plant from Los Andes. Memorias de 4th ISDNP, International Conference on Natural Products, Leysin, Switzerland.

ANEXOS

Anexo 1. Evaluación de la significancia estadística de la actividad de *O. soehrensii* en las etapas iniciales de la infección viral.

Análisis de varianza entre las dosis de *O. soehrensii* a los diferentes tiempos de adición del producto

Tiempo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	p
0h	Entre Grupos	2666	1333	42,0	0,0001
	Dentro Grupos	190	31,6		
1h	Entre Grupos	4174,8	2087,4	10	0,01
	Dentro Grupos	1261,3	210,2		
2h	Entre Grupos	3618	1809	36,1	0,0001
	Dentro Grupos	300	50		
3h	Entre Grupos	3042	1521	12	0,008
	Dentro Grupos	764	127,3		
6h	Entre Grupos	1422	711	7,6	0,02
	Dentro Grupos	560	93,3		

Prueba t entre la dosis 0,21 mg/ml de *O. soehrensii* Vs. Control negativo

Tiempo	Media de las diferencias	Error estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0h	10	2,6	2,8	17,2	3,8	0,02
1h	33,3	12,3	-1	67,7	3	0,05
2h	31,6	4,4	19,6	44,0	7,1	0,002
3h	11,6	4,6	-1,3	24,6	2,5	ns
6h	-2	1,5	-6,2	2,2	-1,3	ns

Prueba t la dosis 2,1 mg/ml de *O. soehrensii* Vs. Control negativo

Tiempo	Media de las diferencias	Error estándar	Intervalo de confianza 95%		<i>t</i>	<i>p</i>
			Mínimo	Máximo		
0h	39	4	27,6	50	9,5	0,0001
1h	62,3	4,8	48,7	76	12,7	0,0001
2h	46,6	5,3	31,7	61,5	8,6	0,001
3h	32,6	4,6	19,7	46	7	0,002
6h	19	2,3	12,5	25	8,2	0,001

Prueba t la dosis 21 mg/ml de *O. soehrensii* Vs. Control negativo

Tiempo	Media de las diferencias	Error estándar	Intervalo de confianza 95%		<i>t</i>	<i>p</i>
			Mínimo	Máximo		
0h	51	3,9	40,1	61,8	13	0,0001
1h	86	5,8	69,6	102,3	14,6	0,0001
2h	79,6	1,9	74,2	85	41	0,0001
3h	56,6	9,2	30,9	82,4	6,1	0,004
6h	28	9,6	1,2	54,7	2,9	0,04

Anexo 2. Evaluación de la significancia estadística de la actividad de *O. soehrensii* sobre el proceso de adsorción viral.

Análisis de varianza entre las dosis de *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de adsorción de VHS-2

Ensayo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	p
RIV-MTT	Entre Grupos	567	189	9	0,005
	Dentro Grupos	160	20		
PRA	Entre Grupos	2106	1053	185,8	0,0001
	Dentro Grupos	34	5,6		

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RIV-MTT

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0,021 – CN	6	3,2	-7,8	19,8	1,8	ns
0,21 – CN	8	3	-5,1	21,1	2,6	ns
2,1 – CN	17	4,1	-0,9	35	4	0,05
21 – CN	23	1,1	18	28	20	0,002

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por PRA

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0,21 – CN	-2,3	1,4	-8,5	3,9	-1,6	ns
2,1 – CN	6,6	1,3	0,9	12,4	5	0,04
21 – CN	33,6	3,7	17,5	49,8	9	0,01

Anexo 3. Evaluación de la significancia estadística de la actividad de *O. soehrensii* sobre el proceso de penetración viral.

Análisis de varianza entre las dosis de *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de penetración viral.

Ensayo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	<i>F</i>	<i>p</i>
RIV-MTT	Entre Grupos	8510,2	2836,7	104,1	0,0001
	Dentro Grupos	218	27,2		
PRA	Entre Grupos	6984	3492	112,6	0,0001
	Dentro Grupos	186	31		

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RIV-MTT.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		<i>t</i>	<i>p</i>
			Mínimo	Máximo		
0,021 – CN	7,6	3,7	-8,3	23,6	2	ns
0,21 – CN	29,6	3,5	14,4	44,8	8,4	0,01
2,1 – CN	59,6	4,8	38,8	80,4	12,3	0,006
21 – CN	76,6	4,4	57,6	95,6	17,3	0,003

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por PRA.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		<i>t</i>	<i>p</i>
			Mínimo	Máximo		
0,21 – CN	6	2	-2,9	14,9	2,8	ns
2,1 – CN	24	3,7	7,7	40,2	6,3	0,02
21 – CN	72	3,5	56,8	87,1	20,5	0,002

Anexo 4. Evaluación de la significancia estadística de la actividad antiviral de *O. soehrensii* después de la infección viral.

A. Tratamiento por 48 horas.

Análisis de varianza entre las dosis de *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de evaluación de actividad antiviral

Ensayo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	p
RIV-MTT	Entre Grupos	9464	4732	61,9	0,0001
	Dentro Grupos	458	76,3		
RECP	Entre Grupos	6450	3225	35,2	0,0001
	Dentro Grupos	550	91,6		
PRA	Entre Grupos	9950	4975	74,6	0,0001
	Dentro Grupos	400	66,6		

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RIV-MTT

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0,0021 – CN	15,3	6,1	-10,8	41,4	2,5	ns
0,21 – CN	33,3	4,9	12,2	54,5	6,8	0,02
21 – CN	91,3	4,2	73,4	109,3	21,9	0,02

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RECP

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0,0021 – CN	15,3	7,3	-16,1	46,8	2,1	ns
0,21 – CN	55,3	4,8	34,5	76,2	11,4	0,008
21 – CN	80,3	2,9	67,8	92,8	27,6	0,001

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por PRA

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0,0021 – CN	-1,6	0,9	-5,5	2,1	-1,9	ns
0,21 – CN	8,3	3,5	-6,8	23,5	2,4	ns
21 – CN	73,3	7,1	42,7	104,9	10,3	0,01

B. Tratamiento por 72 horas.

Análisis de varianza entre las dosis de *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de evaluación de actividad antiviral.

Ensayo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	<i>F</i>	<i>p</i>
RIV-MTT	Entre Grupos	4866	2433	25,2	0,001
	Dentro Grupos	580	96,6		
RECP	Entre Grupos	5400	2700	108	0,0001
	Dentro Grupos	150	25		

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RIV-MTT.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		<i>t</i>	<i>p</i>
			Mínimo	Máximo		
0,0021 – CN	25,3	6,0	-0,8	51,4	4,2	0,05
0,21 – CN	44,3	6,7	15,3	73,3	6,6	0,02
21 – CN	80,3	4,0	63,7	100	20	0,003

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RECP.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		<i>t</i>	<i>p</i>
			Mínimo	Máximo		
0,0021 – CN	25,3	3,2	12	39,0	7,9	0,01
0,21 – CN	55,3	2,6	44,1	66,5	21,5	0,002
21 – CN	85,3	3,2	71,7	99,0	26,8	0,001

Anexo 5. Evaluación de la significancia estadística de la actividad preventiva-protectora de *O. soehrensii*.

A. Pretratamiento por 24 horas.

Análisis de varianza entre las dosis de *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de evaluación de actividad preventiva-protectora

Ensayo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	p
RIV-MTT	Entre Grupos	6688,5	3344,2	50,1	0,0001
	Dentro Grupos	400	66,6		
RECP	Entre Grupos	4064	2032	78,1	0,0001
	Dentro Grupos	156	26		

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RIV-MTT

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0,0021 - CN	32,6	7,5	0,03	65,3	4,3	0,05
0,21 - CN	48,2	3,4	33,1	63,2	13,7	0,005
0,21 - CN	96,6	1,6	89,4	103,8	58	0,003
2,1 - CN	93,3	1,7	86,2	100,5	56	0,0001

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RECP

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0,0021 - CN	10,6	4,7	-9,5	30,8	2,2	ns
0,21 - CN	34,6	2,6	23,4	45,8	13,3	0,005
0,21 - CN	62,6	5,3	39,5	85,7	11,6	0,007
2,1 - CN	66,3	1,4	60,6	72	49,7	0,0001

B. Pretratamiento por 48 horas.

Análisis de varianza entre las dosis de *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de evaluación de actividad preventiva-protectora, pretratamiento por 48 horas.

Ensayo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	p
RIV-MTT	Entre Grupos	7074,6	3537,3	150,1	0,0001
	Dentro Grupos	141,3	23,5		
RECP	Entre Grupos	5463,8	2731,4	142,9	0,0001
	Dentro Grupos	114,6	19,1		
PRA	Entre Grupos	8784,8	4392,4	50,2	0,0001
	Dentro Grupos	524,6	87,4		

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RIV-MTT.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0,0021 - CN	29,3	4,7	9,1	49,5	6,2	0,02
0,21 - CN	64,6	2	56	73,3	31,8	0,001
0,21 - CN	98	3,5	82,8	113,1	28	0,001
2,1 - CN	92,3	1,7	85,2	99,5	55,4	0,0001

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RECP.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0,0021 - CN	28,3	4,4	9,3	47,3	6,4	0,02
0,21 - CN	50,3	0,3	48,8	51,7	151	0,0001
0,21 - CN	88	3,5	72,8	103,1	25	0,001
2,1 - CN	90	1,5	83,4	96,5	58,9	0,0001

Prueba t entre las dosis de *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por PRA.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	P
			Mínimo	Máximo		
0,0021 - CN	17	7,6	-15,8	49,8	2,2	ns
0,21 - CN	43	4,3	24,2	61,7	9,8	0,01
0,21 - CN	92,3	2,6	81,1	103,5	35,5	0,001
2,1 - CN	90,6	1,3	85	96,4	68	0,0001

Anexo 6. Evaluación de la significancia estadística de la actividad preventiva-protectora a tiempos cortos de exposición.

Análisis de varianza entre las dosis de *O. soehrensii* en los diferentes tiempos de pretratamiento con el producto.

Tiempo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	p
1h	Entre Grupos	602	301	17,7	0,003
	Dentro Grupos	102	17		
3h	Entre Grupos	2991,5	1496,7	14,3	0,005
	Dentro Grupos	624	104		
6h	Entre Grupos	2954	1477	35,1	0,0001
	Dentro Grupos	252	42		
24h	Entre Grupos	1368	684	24,4	0,001
	Dentro Grupos	168	28		

Prueba t entre la dosis 0,021 mg/ml de *O. soehrensii* Vs. Control negativo

Tiempo	Media de las diferencias	Error estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
1h	2	1,9	-3	7,3	1	ns
3h	21	9,5	-5,5	47,5	2,2	ns
6h	29,6	5,7	13,6	45,6	5,1	0,007
24h	64,6	4,2	52,8	76,4	15,2	0,0001

Prueba t entre la dosis 0,21 mg/ml de *O. soehrensii* Vs. Control negativo

Tiempo	Media de las diferencias	Error estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
1h	11	3,4	1,5	20,4	3,2	0,03
3h	46,5	2,3	40	53	19,6	0,0001
6h	46,6	3	38,2	55	15,4	0,0001
24h	82,6	3,2	73,8	91,4	25,9	0,0001

Prueba t entre la dosis 2,1 mg/ml de *O. soehrensii* Vs. Control negativo

Tiempo	Media de las diferencias	Error estándar	Intervalo de confianza 95%		<i>t</i>	<i>p</i>
			Mínimo	Máximo		
1h	22	2,9	13,8	30,2	7,4	0,001
3h	65,5	2,8	57,6	73,4	23	0,0001
6h	73,6	1,4	69,6	77,7	50,7	0,0001
24h	94,6	1,4	90,6	98,7	65,1	0,0001

Anexo 7. Evaluación de la significancia estadística de los ensayos de exploración del mecanismo de protección antiviral.

A. Lisado de células pretratadas con *O. soehrensii*.

Análisis de varianza entre las dosis del lisado de células pretratadas con *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de evaluación de actividad preventiva-protectora.

Ensayo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	p
RIV-MTT	Entre Grupos	3272	1636	125,8	0,0001
	Dentro Grupos	78	13		
RECP	Entre Grupos	10106	5053	43,2	0,0001
	Dentro Grupos	702	117		

Prueba t entre las dosis del lisado de células pretratadas con *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RIV-MTT.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
1 - CN	-3,3	1,6	-10,5	3,8	-2	ns
2 - CN	12,6	2,6	1,1	24,1	4,7	0,04
3 - CN	42,6	2,1	33,2	52,0	19,5	0,003

Prueba t entre las dosis del lisado de células pretratadas con *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RECP.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
1 - CN	9	4,5	-10,7	28,7	1,9	ns
2 - CN	38	7	7,8	68,1	5,4	0,03
3 - CN	90	6	63,8	116,1	14,7	0,004

B. Sobrenadante de cultivo de células pretratadas con *O. soehrensii*.

Análisis de varianza entre las dosis del sobrenadante de cultivo de células pretratadas con *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de evaluación de actividad preventiva-protectora.

Ensayo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	p
RIV-MTT	Entre Grupos	104	52	19,5	0,002
	Dentro Grupos	16	2,6		
RECP	Entre Grupos	1838	919	27	0,001
	Dentro Grupos	204	34		

Prueba t entre las dosis del sobrenadante de cultivo de células pretratadas con *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RIV-MTT.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
1 - CN	-4,3	2,3	-14,3	5,7	-1,8	ns
2 - CN	-2,3	2	-11	6,3	-1,1	ns
3 - CN	3,6	3,7	-12,4	19,8	1	ns

Prueba t entre las dosis del sobrenadante de cultivo de células pretratadas con *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación por RECP.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
1 - CN	6,6	1,6	-0,5	13,8	4	0,05
2 - CN	24,6	4,8	3,8	45,4	5	0,04
3 - CN	41,6	3,3	27,3	56	12,5	0,006

C. Lisado 1X de células pretratadas con *O. soehrensii*.

Análisis de varianza entre las dosis del lisado 1X de células pretratadas con *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de evaluación de actividad *previa* (protectora) y *después* de la infección viral (antiviral).

Ensayo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	p
Previo a la infección de VHS-2	Entre Grupos	1838	919	19,1	0,002
	Dentro Grupos	288	48		
Después de la infección de VHS-2	Entre Grupos	1512	756	42,7	0,0001
	Dentro Grupos	106	17,6		

Prueba t entre las dosis del lisado 1X de células pretratadas con *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación de la capacidad protectora, previo a la infección viral.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0 - CN	60,3	2,6	49,1	71,5	23,1	0,001
1 - CN	42,3	5	20,6	64	8,3	0,01
2 - CN	25,3	0,8	21,5	29,1	28,7	0,001

Prueba t entre las dosis del lisado 1X de células pretratadas con *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación de la actividad antiviral, después de la infección viral.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0 - CN	45	2,8	32,5	57,4	15,5	0,004
1 - CN	21	1	16,6	25,3	21	0,002
2 - CN	15	2,8	2,5	27,4	5,1	0,03

D. Lisado 10X de células pretratadas con *O. soehrensii*.

Análisis de varianza entre las dosis del lisado 10X de células pretratadas con *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de evaluación de actividad *previa* (protectora) y *después* de la infección viral (antiviral).

Ensayo	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	p
previo	Entre Grupos	9348	3116	534,1	0,0001
	Dentro Grupos	46,6	5,8		
después	Entre Grupos	8325,5	2775,1	110,7	0,0001
	Dentro Grupos	200,5	25		

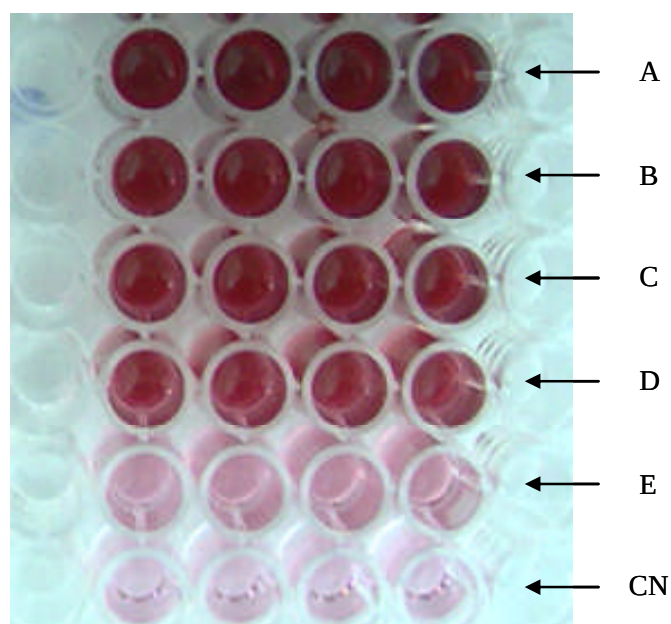
Prueba t entre las dosis del lisado 10X de células pretratadas con *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación de la capacidad protectora, previo a la infección viral.

	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	P
			Mínimo	Máximo		
0 - CN	94,6	0,3	93,2	96,1	284	0,0001
0,5 - CN	94,6	0,3	93,2	96,1	284	0,0001
1 - CN	65,3	2	56,6	74	32,2	0,001
1,5 - CN	26,6	1,7	19	34,2	15,1	0,004

Prueba t entre las dosis del lisado 10X de células pretratadas con *O. soehrensii* Vs. Control negativo, para la evaluación de la actividad antiviral, después de la infección viral.

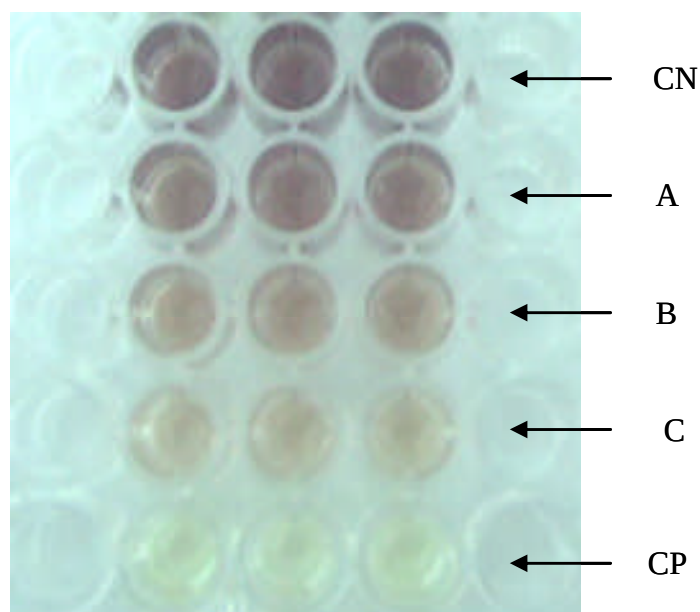
	Media	Error Estándar	Intervalo de confianza 95%		t	p
			Mínimo	Máximo		
0 - CN	95,6	2,3	85,6	105,7	41	0,0001
0,5 - CN	95,6	2,3	85,6	105,7	41	0,0001
1 - CN	58,1	5,9	32,4	83,9	9,7	0,01
1,5 - CN	33,6	1,3	27,9	39,4	25,2	0,001

Anexo 8. Diluciones del extracto acuoso de *O. soehrensii* empleadas en los ensayos de citotoxicidad.



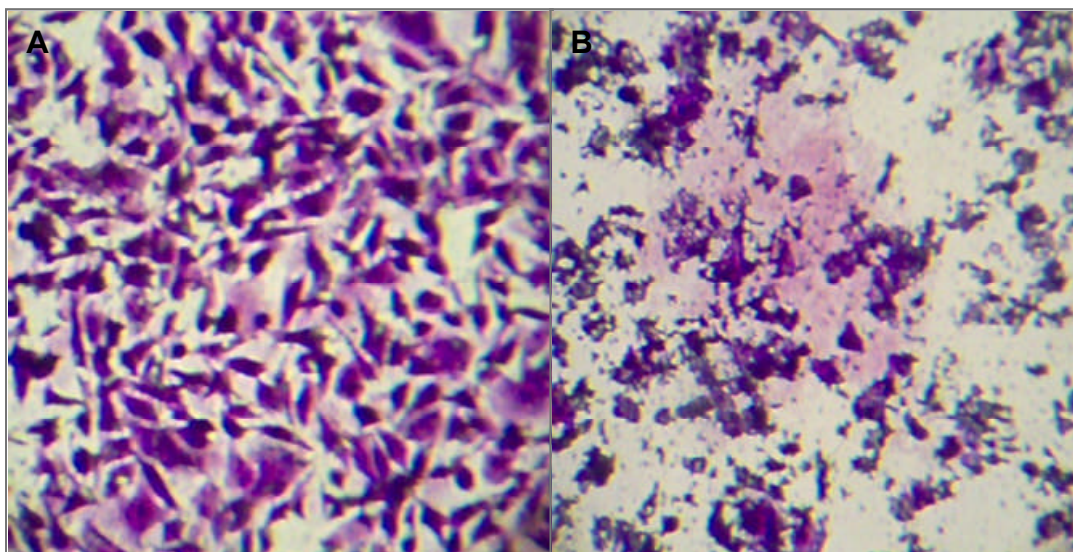
Células BHK-21 ($3 \times 10^5/\text{ml}$) cultivadas con diferentes diluciones de *O. soehrensii*.
(A) 42 mg/ml, (B) 21 mg/ml, (C) 2,1 mg/ml, (D) 0,21 mg/ml (E) 0,021 mg/ml y (CN)
células cultivadas en ausencia del producto vegetal.

Anexo 9. Ensayo de RIV-RIV-MTT de células BHK-21 tratadas con *O. soehrensii* previo a la infección de VHS-2.



Se observa la reducción del RIV-MTT en las diferentes condiciones de tratamiento: (A) 21 mg/ml (B) 0,21 mg/ml y (C) 0,0021 de *O. soehrensii*. Como controles (CN) células no infectadas cultivadas en ausencia del producto vegetal y (CP) células infectadas cultivadas en ausencia del producto vegetal

Anexo 10. Visualización microscópica de las Placas virales producto de la infección por VHS-2.



Posterior al revelado y recuento de las placas virales, se realizó una observación microscópica para verificar la presencia de las regiones de lisis. (A) Control negativo no infectado (aumento 20X), se observan células viables que teñidas con el colorante (B) Control positivo de infección por VHS-2 (aumento 20X), se observan regiones de lisis celular, con muy pocas células viables.